



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Ciências da Saúde

# Relação entre a ineficácia clínica do tratamento da candidose vulvovaginal por azoles e os perfis de suscetibilidade em estirpes isoladas de casos crónicos

Tiago Santos Barata

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Ciências Biomédicas**  
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutora Ana Palmeira de Oliveira  
Co-orientador: Prof. Doutora Ana Sofia Costa de Oliveira

Covilhã, outubro de 2014

Relação entre a ineficácia clínica do tratamento da candidose vulvovaginal por azoles e os perfis de suscetibilidade em estirpes isoladas de casos crónicos

*“Infinity is a great place to start”*

*Bono - U2 (1960 - )*

Relação entre a ineficácia clínica do tratamento da candidose vulvovaginal por azoles e os perfis de suscetibilidade em estirpes isoladas de casos crónicos

## Dedicatória

Dedico esta dissertação e todas as horas de trabalho aos ídolos de uma vida...os meus Pais. Obrigado, pelo apoio por todo o suporte e toda a paciência, ensinamentos e educação que me transmitiram. Obrigado por me aturarem...sei que não sou fácil.

Ao meu irmão e cunhada, por terem estado presentes no dia-a-dia da minha vida e do meu percurso escolar e acadêmico, desde os primórdios portanto. São os melhores irmãos que alguém pode ter.

A duas estrelas que olham por mim, bem lá do alto e que me deram sempre força e crença. Prá vocês Avós!

A toda a família, amigos e conhecidos que fazem com que tudo seja mais fácil e incentivaram sempre com palavras de apoio incondicional.

Por último e o mais importante (e também o mais pequenino) ao meu sobrinho, Rafael. Espero que um dia ao leres esta dedicatória e trabalho possas ter orgulho do teu tio e daquilo que tem feito.

Folha em branco

## Agradecimentos

Primeiramente agradeço a confiança e responsabilidade depositada em mim pelas mentoras deste projecto, Prof<sup>a</sup> Doutora Ana Palmeira de Oliveira, minha orientadora, e Prof<sup>a</sup> Doutora Ana Sofia Costa de Oliveira, minha co-orientadora. Obrigado por me terem confiado este projecto. Obrigado por toda a atenção e disponibilidade prestada, bem como a paciência. Espero ter correspondido.

Adicionalmente gostaria de agradecer também ao Professor Doutor José Martinez de Oliveira pela colaboração prestada. Votos de agradecimento também à Professora Sandra Ferreira e à Dra. Paula Gouveia e restante equipa de Técnicos do Laboratório de Patologia Clínica do Centro Hospitalar da Cova da Beira.

Agradeço também a todos os colegas pertencentes ao grupo de investigação da Doutora Ana Palmeira-de-Oliveira, pelo ambiente excepcional, pelo acolhimento e integração, pelas opiniões e conversas. Tenho que individualizar e referir a paciência do Carlos Gaspar para comigo nas primeiras semanas e dar prova da imensa gratidão para com a Ana Oliveira, pois para além de esclarecimentos e ajuda teve sempre palavras positivas e de incentivo. A Daniela pela constante boa disposição. E aos colegas que continuam o seu trabalho votos de muito sucesso!

Não posso esquecer toda a restante equipa que “faz” o CICS, desde as técnicas Sofia e Margarida até às auxiliares. Bem hajam.

Obrigado ao João pela sua presença, incentivos e por ouvir as minhas dúvidas, ideias e por ajudar nos momentos de menor ímpeto. És como um verdadeiro irmão! Obrigado ao Cláudio por ser sempre direto e mostrar que só há duas hipóteses...lutar e vencer!

À Matilde, porque não esqueço aqueles que são ou foram importantes na minha vida, representas uma parte significativa da mesma e sempre lembrada e revestida de coisas boas. Foste fonte de motivação em todos os dias do trabalho e tu sabes! Agradeço-te todos os ensinamentos, carinho e Amor.

Um enorme, sentido e muito especial obrigado a dois mentores e referências importantes na minha constante evolução humana e científica. Duas pessoas que contribuíram diretamente na minha formação e incentivaram à continuidade do percurso de formação académica. Ao Prof. Dr. Francisco Rodrigues e à Prof. Sílvia Beato, obrigado pela amizade e conselhos. Jamais esquecerei de onde venho e quem me ajudou a formar.

## Folha em branco

## Resumo

Os problemas associados à prevalência e infecção por fungos do género *Candida* nos tempos correntes devem ser um tema de grande preocupação e debate na comunidade científica e dos prestadores de cuidados de saúde.

A candidose vulvovaginal afeta anualmente milhões de indivíduos à escala global. O panorama traçado em estudos epidemiológicos revela uma tendência crescente na incidência da patologia, sobre a qual versa o presente trabalho.

Com a realização deste trabalho de investigação pretendemos contribuir para a identificação das espécies de *Candida spp* prevalentes em casos de candidose vulvovaginal crónica bem como conhecer a relação da dificuldade do tratamento in vivo com o perfil de suscetibilidade in vitro aos antifúngicos azólicos clássicos.

Foram incluídos 118 isolados de casos crónicos de candidose vulvovaginal correspondentes a 48 casos clínicos. Os isolados foram identificados com recurso a cultura em Chromagar ou carta de identificação Vitek® e a sua susceptibilidade aos antifúngicos determinada segundo o método da microdiluição CLSI M27-A3.

Como principais resultados temos o aumento da incidência de Candidose Vulvovaginal mediada por espécies não-*albicans*, verifica-se um aumento das resistências ao fluconazole que é o fármaco de referência no tratamento.

Com base nos dados obtidos pode intuir-se a necessidade de novas abordagens e de medidas de prevenção e controlo.

## Palavras-chave

*Candida spp.*, candidíase vulvovaginal, fluconazol, clotrimazol, suscetibilidade, resistência.

## Folha em branco

## Abstract

The problems associated to the prevalence and infection by fungi of the gender *Candida* in current times should be a topic of great concern and debate in the scientific community and health care providers.

Vulvovaginal candidiasis affects annually millions of people globally. The panorama outlined in epidemiological studies show an increasing trend in the incidence of pathology on which this paper versa.

With the realization of this investigation we intend to contribute to the identification of *Candida spp* prevalent species in cases of chronic vulvovaginal candidiasis as well as knowing the relationship of the difficulty of *in vivo* treatment with the profile of *in vitro* susceptibility to azole antifungals classics.

We included 118 isolates from cases of chronic vulvovaginal candidiasis corresponding to 48 clinical cases. The isolates were identified using culture Chromagar medium or identification cards - VITEK® and their susceptibility to antifungal agents was determined by the microdilution method CLSI M27-A3.

The main results have showed an increased in the incidence of vulvovaginal candidiasis mediated by non-*albicans* species, there is an increasing resistance to fluconazole that is the reference drug treatment.

Based on the data obtained can intuit the need for new approaches and measures for prevention and control.

## Keywords

*Candida spp.*, vulvovaginal candidiasis, fluconazole, clotrimazole, susceptibility, resistance.

## Folha em branco

# Índice

Capítulo I - Introdução .....	1
1. Candidose vulvovaginal.....	1
1.1 Epidemiologia .....	3
1.2 Candida .....	3
1.2.1 Factores de Virulência.....	4
1.2.2 Factores e Mecanismos de patogenicidade.....	5
1.2.3 Mecanismos de Resistência.....	5
1.3 Diagnóstico.....	7
1.3.1 Diagnóstico Clínico .....	7
1.4.2 Diagnóstico Laboratorial .....	8
1.4.3 Diagnóstico Molecular.....	9
1.4 Tratamento.....	9
1.4.1 Suscetibilidade a antifúngicos e resistência .....	12
1.4.2 Fármacos antimicóticos.....	12
Capítulo II - Objectivo(s) .....	14
1. Objectivo(s).....	14
Capítulo III - Material e Metodologias.....	14
1. Material .....	14
1.1 Amostras - origem e colheita.....	14
1.2 Fármacos antifúngicos .....	15
1.3 Reagentes .....	15
2. Metodologias.....	15
2.1 Receção e identificação de amostras.....	15
2.2 Identificação fenotípica de espécies do género Candida .....	16
2.3 Identificação bioquímica de <i>Candida spp</i> .....	16
2.4 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) .....	17
Capítulo IV - Resultados .....	18
1. Resultados da identificação de espécies do género Candida.....	18
2. Distribuição de espécies .....	18
3. Testes Suscetibilidade aos Antifúngicos .....	19
3.1 Resultados da determinação da CMI .....	24
3.2 Resultados da determinação da CMI 50 - fluconazole .....	28

Capítulo V - Discussão .....	29
Capítulo VI - Conclusão.....	32
Anexo I.....	41
Anexo II .....	42
Anexo III .....	44
Anexo IV .....	45

Folha em branco

## Lista de Figuras

### Índice

Figura 1 - Factores de risco na CVV. Esquematização de factores etiológicos que comprometem o trato vaginal e por consequência podem induzir infecções recorrentes	2
Figura 2 - Cartas de identificação de leveduras para o sistema VITEK®	16
Figura 3 - Distribuição percentual por espécie de levedura do total de isolados clínicos	18
Figura 4 - Distribuição percentual por nível de suscetibilidade ao fluconazole no total de isolados testados	19
Figura 5 - Gráfico de barras representativo da distribuição percentual de suscetibilidade por espécie	21
Figura 6 - Distribuição da suscetibilidade ao fluconazole nos 110 isolados clínicos de acordo com a espécie	22
Figura 7 - Gráfico representativo do valor de sensibilidade média por espécie de levedura	23
Figura 8 - Gráfico representativo da percentagem de redução de 50% de crescimento de <i>C. albicans</i>	28
Figura 9 - Representação da microplaca do ensaio para determinação da CMI	41
Figura 10 - Estrutura molecular do fluconazole	44
Figura 11 - Estrutura molecular do fluconazole	44

Folha em branco

## Lista de Tabelas

### Índice

Tabela 1 - Tratamento da CVV. Esquemas de tratamento mediante gravidade da candidose (Sociedade Portuguesa de Ginecologia - Revisão dos consensos em infecções vulvovaginais)	11
Tabela 2 - Distribuição do total de espécies sujeitas a teste de suscetibilidade antifúngica	19
Tabela 3 - Distribuição de espécies alvo de teste de CMI em valor ordinal e percentual por nível de suscetibilidade ao fluconazole	20
Tabela 4 - Resultados da determinação da CMI por espécie e respetivos valores obtidos	24
Tabela 5 - Comparação dos intervalos de CMI obtidas por espécie do género <i>Candida</i>	28
Tabela 6 - Listagem completa das estirpes	45

## Lista de Acrónimos

ADN	Ácido desoxirribonucleico
CDC	Centers for Diseases Control
CDR	Candida Drug Response
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
CMI	Concentração Mínima Inibitória
CVV	Candidiase Vulvovaginal
CVVR	Candidiase Vulvovaginal Recorrente
DMSO	Dimetilsulfóxido
EUA	Estados Unidos da América
MOPS	3- (N-morfolino) propanossulfónico
PCR	Polymerase Chain Reaction
ROS	Espécies reactivas de oxigénio
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
SAD	Sabouraud Dextrose Agar
SAP	Proteinases aspártico secretadas

Folha em branco

# Capítulo I - Introdução

## 1. Candidose vulvovaginal

As infecções causadas pelos fungos de género *Candida* são actualmente, uma das preocupações mais prementes no seio da comunidade científica, devido às elevadas taxas de prevalência e resistência aos antifúngicos (1).

A candidose ou candidíase é uma das infecções vaginais mais frequentemente diagnosticadas, assumindo a designação de Candidose Vulvovaginal (CVV). Esta pode ser causada por diversas espécies de *Candida*, microrganismos que colonizam distintos locais anatómicos e formam parte da população microbiana endógena genito-urinária. Alterações no equilíbrio do ecossistema vaginal podem desencadear um processo infeccioso denominado por candidose vulvovaginal (2-4).

Estudos epidemiológicos revelam nos últimos anos, um aumento da prevalência da candidose vulvovaginal (CVV), com consequências nefastas (5, 6). Embora, a *Candida albicans* (*C. albicans*) seja identificada como o agente etiológico mais frequente de candidose genital, têm sido reportados um número crescente de casos causados por espécies *Candida* não-*albicans* (1, 7).

As espécies não-*albicans*, em particular: *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei*, com elevada taxa de resistência aos azoles, são isoladas de forma cada vez mais frequente. Estas alterações de cariz epidemiológico e etiológico são atribuídas a uma combinação de fatores, sendo o uso generalizado de fluconazole apontado como o principal. No entanto, mudanças na demografia e doenças subjacentes, o diagnóstico incorrecto e a utilização de estratégias terapêuticas inadequadas são outras causas referidas no aumento da taxa de incidência da patologia (8, 9). Outros fatores incluem: situações de cariz genético, comportamentais, causas idiopáticas entre outros (10). A candidose vulvovaginal afeta milhões de mulheres anualmente, à escala global, sendo a causa mais comum de vaginite aguda na Europa e Estados Unidos (11). A sua primeira descrição data de 1949, por J. S. Wilkinson, ao estabelecer uma relação entre a existência de fungos na vagina e o aparecimento de vaginites (12).

A incidência de infecções provocadas por fungos aumentou significativamente, contribuindo para aumentos nas taxas de morbidade e mortalidade. Este panorama deve-se primordialmente a um incremento da resistência aos antibióticos e ao número limitado de fármacos antifúngicos, que produzem muitos efeitos secundários (13).

Segundo Arendrup et al., 2005 e Espinel-Ingroff et al., 2009, a incidência e prevalência de infecções fúngicas invasivas tem aumentado desde a década de 80, especialmente no grupo

dos doentes imunocomprometidos e nos que permanecem hospitalizadas com doenças subjacentes graves (13).

Os sintomas ou manifestações clínicas referidas de forma transversal nos artigos consultados incluem: prurido na zona genital, ardor, disúria, irritação, corrimento vaginal espesso, inflamação, dispareunia, eritema, edema, fissuras vulvares e, por vezes dor (14-16). Porém, todo este quadro clínico não pode ser assumido de forma inequívoca como uma CVV, pois a sintomatologia não é considerada patogênica.

As infeções causadas por *Candida spp* afectam, cerca de 70 a 75% das mulheres, pelo menos uma vez durante a vida, com especial prevalência nas jovens mulheres. Por outro lado, 40 a 50% das mulheres em idade adulta sofrem recidiva e 5 a 8% têm candidose vulvovaginal recorrente (CVVR). Sublinhe-se que o critério associado à CVVR define-a, como a ocorrência de quatro ou mais episódios infecciosos por ano (10). De extrema importância, é também, discernir a patologia quanto à sua cronicidade, isto é, a CVV designa-se como crónica quando ocorrem quatro ou mais episódios diferentes no mesmo ano, sem a evidência de remissão de sintomatologia entre os episódios. Desta forma, verifica-se um estado patológico contínuo, que leva directamente à cronicidade(17).

Importa pois encetar esforços quer ao nível da prevenção, quer ao nível da investigação de modo a conter ou minimizar os efeitos negativos associados à CVV e de forma mais gritante as crescentes resistências aos fármacos disponíveis.

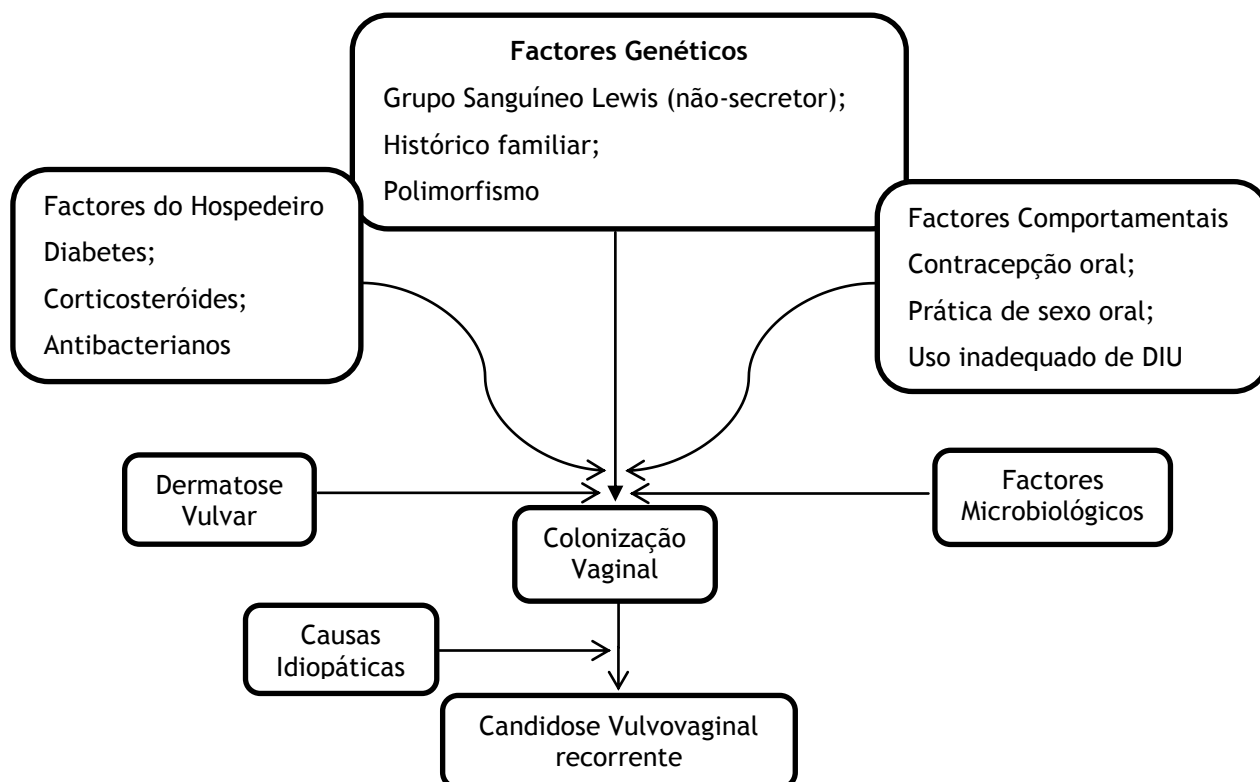


Figura 1 - Fatores de risco na CVV. Esquematizações de fatores etiológicos que comprometem o trato vaginal e por consequência podem induzir infeções recorrentes. Adaptado de: (10)

## 1.1 Epidemiologia

A epidemiologia da candidose vulvovaginal tem sido amplamente descrita no hemisfério Norte, especialmente nos Estados Unidos da América (EUA), Europa Ocidental e Ásia; pese embora a sua distribuição seja a nível planetário (11, 18).

Nos EUA, anualmente são identificados 13 milhões de casos de CVV em consultas de especialidade (19).

Esta infeção é causada maioritariamente por *C. albicans*, responsável por cerca de 90% dos episódios de CVV. No entanto, a incidência crescente do papel de espécies, não-*albicans* como agentes etiológicos desta infeção é cada vez mais marcante, sendo responsáveis por cerca de 10 a 30% dos episódios, em países como a Itália, Inglaterra, Estados Unidos e a Turquia (20-24). As taxas de infeção sintomática, mediada por *C. albicans*, variam de aproximadamente 90%, nos EUA e Austrália, para cerca de 65% na Bélgica, Turquia e Arábia Saudita (25).

Em Portugal os dados epidemiológicos são escassos, sendo que no caso específico da CVV, no nosso conhecimento, não existe nenhum estudo de referência publicado. Contudo, numa investigação de cariz epidemiológico levada a cabo num hospital do grande Porto verificou-se, que existe uma alta taxa de incidência, com 2 em cada 1000 pacientes a serem afetados por surtos de fungos nosocomiais, sendo *C. albicans* a espécie de *Candida* mais prevalente e de entre as espécies não-*albicans* a *C. parapsilosis* (26). Adicionalmente em um outro estudo também de cariz epidemiológico geral de candidíase a espécie *C. albicans* revelou-se mais uma vez como a mais prevalente, seguida neste caso da *C. tropicalis* e só depois pela *C. glabrata* (27).

## 1.2 Candida

O género *Candida* é actualmente enquadrado taxonomicamente no reino *Fungi*, na classe *Ascomycete* e na família *Saccharomycetes*, com base em sequenciamento genético.

As espécies mais comuns são: *C. albicans* (40-85%), *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis* e *C. krusei*, contudo estão identificadas mais de 100 diferentes espécies sendo que apenas 17 são consideradas como agentes etiológicos causadores de processo infeccioso em humanos (28, 29).

Relativamente à morfologia as espécies do género *Candida* assumem formas de leveduras ovaladas (3 a 5 µm) ou filamentosas, que formam gémulas e blastoconídios, podendo na maioria das espécies observar-se a formação de pseudo-hifas e hifas verdadeiras. No caso específico de *C. albicans*, esta tem a capacidade de formar tubos germinativos e clamidoconídios terminais de parede grossa. Em contraste, a *C. glabrata*, caracteriza-se por não ter uma capacidade tão grande de formação de estruturas filamentosas nomeadamente pseudo-hifas, tubos germinais ou hifas na maioria das condições, sendo o pH exemplo de um dos factores que influenciam a sua origem (30).

Relativamente às características macroscópicas em condições *in vitro*, a quase totalidade de espécies deste género originam colónias lisas e bastante mucóides, em forma de disco de cor branca a creme, em meio de *Sabouraud* (30).

### 1.2.1 Factores de Virulência

Os microrganismos do género *Candida spp.* podem estar presentes no ambiente vaginal como comensais ou patogénicos, sendo que alterações no meio vaginal do hospedeiro induzem a sua patogenicidade (31).

São diversos os fatores de virulência descritos para a *Candida*, destacando-se a capacidade de formação de hifas, a expressão de adesinas, a formação de biofilme, o *switching* fenotípico e a secreção de enzimas hidrolíticas (por exemplo: proteases e hemolisinas) (32-34).

A capacidade de formação de hifas é descrita como um dos factores de patogenicidade mais prementes destas leveduras pois medeiam o processo de invasão e colonização de diferentes locais anatómicos (35). Efetivamente a forma de levedura está relacionada com colonização e a forma de hifa com a adesão, invasão tecidual e actividade proteolítica (36).

O *switching* fenotípico é um importante mecanismo, mormente associado aos fungos, que permite uma transição entre diversos estados celulares, constituindo-se como um importante meio para a colonização e infeção do hospedeiro (37). O estudo e consequente artigo publicado por Cullen e Sprague, 2012 comprovam exactamente a afirmação anterior, isto é, mais do que o crescimento em si do fungo, a rápida transição entre os diversos estados celulares e filamentosos tem uma contribuição mais decisiva na implementação e proliferação dos mesmos (38).

As enzimas hidrolíticas, nomeadamente as isoenzimas do grupo das proteinases aspártico secretadas (SAP) desempenham funções na digestão de proteínas do hospedeiro, intervenientes no fornecimento de nutrientes, a invasão do sistema imune do hospedeiro mediante degradação de imunoglobulinas e proteínas do complemento e a digestão de componentes da mucosa (membrana das células do epitélio, colagénio, queratina). Toda esta atividade facilita o processo de formação de hifas e a invasão dos tecidos do hospedeiro (32, 34, 39).

A formação de biofilmes é descrita como outro dos mais importantes fatores de virulência destas leveduras.

Os biofilmes são constituídos por aglomerados de células microbianas que proliferam agregadas a superfícies e promovem, características fenotípicas específicas, como a resistência a fármacos aos quais a sua forma planctónica se revelava suscetível. Estas estruturas tridimensionais mediadas por formas leveduriformes e de hifas incorporadas numa matriz extracelular que constituem um escudo de protecção contra os antimicrobianos (40, 41).

### 1.2.2 Factores e Mecanismos de patogenicidade

No seio da comunidade científica, nas últimas décadas, têm-se engendrado grandes esforços para se progredir na investigação e consequente compreensão da interacção que ocorre entre o sistema imune do hospedeiro e as diversas espécies de *Candida*. Os mecanismos de escape imunológico foram aprofundados, desde conhecimentos no campo do reconhecimento até à transdução de sinal e na capacidade de depuração e eliminação do fungo (42).

Existem diversos mecanismos de evasão ao sistema imune bem identificados.

A transição entre diferentes formas fenotípicas é um deles, sendo que a alteração de levedura para forma de hifa é considerado o principal fator de virulência da *Candida*. Este mecanismo já acima mencionado - *switching* fenotípico - promove uma alteração no estado morfológico induzindo o aparecimento da forma de hifa, forma essa que tem efeitos muito nefastos na barreira epitelial e na acção dos macrófagos. Este processo, que é reversível, consegue mesmo desenvolver-se após a fagocitose, facilitando a fuga e a inibição de algumas das respostas clássicas imunitárias como o sistema do complemento (43, 44).

A invasão epitelial é outro processo fisiopatológico importante, que pode ocorrer de forma ativa ou de maneira passiva através de endocitose. A invasão ativa envolve diferentes etapas como: a adesão epitelial, invasão tecidular e indução de danos tecidulares (45). Já o processo passivo consiste, de forma simplista, na invaginação do microrganismo por parte das células epiteliais, mediando a entrada no sistema hospedeiro potenciando a sua propagação. De referir que este processo não requer uma viabilidade celular total, uma vez, que as unidades formadoras de colónias ao serem introduzidas dentro do organismo do hospedeiro podem formar hifas e desenvolver formas ativas (42, 46).

Para finalizar, refira-se a capacidade de inibição da produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS). As células do género *Candida* possuem diversos mecanismos para contrariar o stress oxidativo. Sendo as ROS um dos principais coadjuvantes na resposta imune, se a sua acção for limitada e contrariada, fica bem patente o poder patogénico inerente ao microrganismo em estudo. Nos estudos consultados são mencionados como processos de inibição das ROS a vacuolização por parte da levedura, a presença da enzima catalase e a superóxido dismutase (42, 47, 48).

### 1.2.3 Mecanismos de Resistência

A resistência aos antifúngicos pode ser avaliada numa perspectiva laboratorial ou numa perspectiva de sucesso clínico da terapêutica, ou seja, *in vivo* (49).

No contexto unicamente laboratorial a resistência de um microrganismo a um fármaco tem em consideração se o crescimento do organismo causador da infecção é inibido por um

agente antimicrobiano com uma concentração mais alta do que a utilizada nas estirpes de controlo - “*wild-type*” (50). Esta é avaliada recorrendo a técnicas laboratoriais clássicas, nomeadamente a determinação da concentração mínima inibitória.

Por outro lado, a ineficácia terapêutica *in vivo*, diz respeito à situação em que o organismo causador da infeção é inibido por uma concentração, de um agente antimicrobiano, que é associada com uma probabilidade de fracasso terapêutico, ou seja, o agente patogénico é inibido por uma concentração antimicrobiana que é superior ao que seria desejável ou que está preconizado (50).

Os mecanismos de resistência a antifúngicos podem ser classificados como primários ou secundários, sendo que estão relacionados com características intrínsecas ou adquiridas pelo agente patogénico. Este, por sua vez, interfere com o mecanismo de ação do fármaco alterando o seu nível de eficácia (51).

No que se refere à resistência ao grupo dos azoles, o seu mecanismo assenta, essencialmente, na capacidade de resistir à ação inibitória exercida pelo fármaco na síntese de ergosterol, por parte da membrana celular do fungo (50, 52). Os principais mecanismos de resistência ao grupo de fármacos, formado pelos azoles, descritos incluem: a sobre-expressão dos transportadores de várias drogas, a modificação da enzima alvo, o citocromo P450 (Erg11) responsável pela 14 alfa-desmetilação do ergosterol, a diminuição da concentração intracelular de fármacos pela activação de bombas de efluxo ou redução da capacidade de penetração do agente terapêutico (52, 53).

A diminuição da concentração dos níveis plasmáticos da droga pela ativação de bombas de efluxo resulta conseqüentemente, na diminuição da concentração nos locais de ação. Estes sistemas de efluxo são codificados essencialmente por dois genes transportadores: CDR e MDR. A ação deste mecanismo resulta numa ação de expulsão do fármaco antifúngico e é bastante expresso em estirpes da espécie de *C. albicans* e *C. glabrata* (51).

A alteração do local alvo é um processo que envolve a enzima lanosterol 14- $\alpha$  desmetilase, esta é um produto resultante da atividade do gene ERG11 e medeia uma reação-chave: a conversão do lanosterol em ergosterol. Os agentes antifúngicos imidazólicos e triazólicos inibem a atividade da enzima supracitada. Por conseguinte, os vários agentes antifúngicos inibem a biossíntese de ergosterol. Como este é essencial para a manutenção da estrutura e funcionalidade da membrana plasmática, estes agentes terapêuticos ao interferirem na síntese de ergosterol comprometem, conseqüentemente, a integridade da membrana fúngica. Os inibidores da síntese de ergosterol bloqueiam o crescimento das células fúngicas na maioria das circunstâncias (efeito fungistático), embora possam, por vezes, provocar morte celular (efeito fungicida) (54).

Já a resistência aos fármacos do grupo das equinocandinas deve-se geralmente ao processo de aquisição de mutações esporádicas nos genes que codificam o FKS, gene codificador da enzima 1,3-B-D glucano sintetase, responsável pela síntese do glucano (50).

A inibição da atividade mediada pela enzima 1,3-β-D glucano sintetase conduz, a um processo de disrupção da parede celular fúngica produzindo um conjunto de efeitos que culminam em alterações de carácter osmótico e lise celular (55).

## 1.3 Diagnóstico

O diagnóstico reveste-se de uma importância particular e indelével, uma que vez, a sua correta execução e interpretação podem levar a uma maior rapidez e eficácia num tratamento.

Convém notar que este não é um processo linear e transversal no campo clínico, pois está condicionado pela subjetividade, e os procedimentos e metodologias aplicadas variam de país para país e dentro do próprio existem diversas abordagens distintas nas várias instituições hospitalares e clínicas.

### 1.3.1 Diagnóstico Clínico

O diagnóstico clínico é parte fulcral num processo terapêutico e no caso particular da CVV, é ainda mais evidente, já que pode evitar respostas erradas baseadas em sintomatologia inespecífica ou característica de outra patologia. Cabe desta forma ao clínico e aos demais profissionais de saúde, manter a perspicácia perante os sinais e sintomas apresentados pelo paciente, todavia é também importante a capacidade de fazer cumprir as orientações respectivas e advogadas internacionalmente ditas *guidelines*.

Aspeto assente é que o diagnóstico deve iniciar-se com a pesquisa e análise do historial clínico, por forma a detetar padrões. Doravante o exame físico deve efetuar-se, não só para a confirmação de CVV como também para o despiste de diagnósticos alternativos. A execução de uma zaratoga vaginal, com intuito de recolha de amostra para análise cultural e posterior diagnóstico diferencial, deve ser igualmente encarada como um acto imperativo e que promove uma prática mais assertiva, diminuindo os erros inerentes ao processo de diagnóstico (56).

Num estudo levado a cabo na Holanda por M.K. Engberts e seus colaboradores, intitulado: “*Vulvovaginal candidiasis: diagnostic and therapeutic approaches used by Dutch general practitioners*” - constatou-se que o diagnóstico efectuado era essencialmente baseado na sintomatologia, redundando sistematicamente num veredicto de CVV e respectiva prescrição de antimicóticos, não tendo sido valorizado, o exame de microscopia e/ou cultural. Esta prática adoptada pelos profissionais de Saúde naquele país, colide com as *guidelines* estabelecidas e recomendadas que referem a necessidade de exames para diagnóstico e confirmação da sintomatologia (57). Estas recomendações são de resto enfatizadas pelo *Centers for Disease Control (CDC)* (58).

A execução de uma zaragatoa vaginal, em mulheres sintomáticas, com intuito de recolha de amostra para análise cultural e posterior diagnóstico diferencial, deve ser encarado como um ato imperativo e que promova uma prática mais assertiva, diminuindo os erros inerentes ao processo de diagnóstico.

A preponderância de um correcto diagnóstico fica patente através do crescimento da resistência aos antifúngicos e as implicações afetas à mesma.

### 1.4.2 Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico laboratorial assume, compreensivelmente, um papel fulcral no diagnóstico da CVV. Pode mesmo afirmar-se que, a assertividade e o diagnóstico inequívoco da infeção através da execução laboratorial, formam um binómio indissociável; complementando os sintomas clínicos.

O diagnóstico preciso da CVV é mediado actualmente por técnicas que incluem a medição de pH vaginal (normal - entre 4 e 4.5), para despiste de vaginose bacteriana; a microscopia a fresco e com KOH a 10%, tendo como intuito a pesquisa de leveduras ou células em forma de hifa e a execução de zaragatoa vaginal para posterior exame cultural (10, 31, 35). A metodologia que colhe maior consenso e tida como mais fidedigna para o diagnóstico de CVV é o exame cultural, em meios de cultura específicos, tais como: *Sabouraud* ou mesmo CHROMagar. A metodologia apoiada em meios cromogénicos tem grandes vantagens, advogando a seu favor, a rápida identificação do agente patogénico e a deteção da presença de população polimicrobiana são apenas exemplos (31). Contudo, sabe-se que alguns isolados podem pertencer a espécies diferentes e apresentar a mesma cor de colónias, bem como numa mesma colónia a cultura pode ser mista, falseando a cor, o que limita muito a sua correta identificação por este método. Esta situação é mais comum nas espécies não-*albicans* (59). Para uma identificação definitiva das amostras é então aconselhável a realização de provas bioquímicas. Esta metodologia permite uma maior assertividade e diminuição da margem de erro, com estudos a apontarem para uma percentagem de 100% na correcta identificação. Existem diversas soluções, entre as quais, galerias (API 20C® - bioMérieux) de fermentação, sistemas automatizados como o VITEK® - bioMérieux e o WalkAway® - Baxter Diagnostic, Inc., WestSacramento, California. No caso da presente investigação, a identificação de espécies não-*albicans* foi mediada pelo sistema VITEK® (60).

Assim, através da recolha de uma amostra, usualmente mediada por zaragatoa de algodão e obtida da parede lateral do canal vaginal, e da sua sementeira nos meios referidos é possível efetuar o diagnóstico laboratorial de candidose num espaçamento temporal relativamente breve - 48 horas e com conseqüente obtenção de inegáveis benefícios para o paciente e na adaptação do protocolo terapêutico que se pode tornar mais específico (31, 61).

### 1.4.3 Diagnóstico Molecular

O diagnóstico molecular é nos dias correntes uma ferramenta indispensável e da maior importância no diagnóstico assertivo e conclusivo.

Os métodos moleculares baseiam-se na análise de ADN ou RNA e existe uma parafernália de técnicas moleculares utilizadas correntemente: Multilocus sequence typing, Polymerase Chain Reaction (PCR), Real-Time PCR e Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), são alguns exemplos (62). Através destas técnicas cria-se a possibilidade de identificação das distintas espécies pertencentes ao género *Candida*, através da amplificação de fragmentos de DNA das leveduras utilizando *primers* específicos ou ainda proceder à pesquisa da presença de genes associados à resistência (63, 64).

Indubitavelmente, uma das premissas mais importantes associadas ao diagnóstico molecular é então, a pesquisa e identificação de genes de resistência. Entre os principais genes associados à resistência nas espécies de *Candida* citem-se: *ERG11*, *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* e *FKS1* e *FKS2*. Os genes mencionados são responsáveis por múltiplos e complexos processos de resistência. No caso do gene *ERG11* este é responsável por resistências derivadas à diminuição da afinidade de ligação aos locais alvo dos azoles. E os supracitados *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* são genes envolvidos na codificação e sobre expressão das bombas de efluxo que potenciam largamente a resistência aos fármacos, em particular ao fluconazole (65).

A biologia molecular e os métodos associados a esta permitem, entre outros, a pesquisa da existência de mutações mediada pela sequenciação e a avaliação do grau de expressão dos genes, por PCR (Polymerase Chain Reaction) em tempo real (real-time).

Embora seja um meio de diagnóstico tremendamente eficaz e subliminar, o facto de ser uma metodologia muito específica e altamente dispendiosa leva à adopção em grande parte dos sistemas tidos como tradicionais, isto é, o uso de meios automatizados como o VITEK.

Adicionalmente a elevada prevalência de *Candida* em mulheres assintomáticas determina que a simples pesquisa da sua presença apresente, numa perspectiva de diagnóstico, reduzida importância (66).

## 1.4 Tratamento

A problemática associada ao tratamento da patologia estudada no presente trabalho, deve sempre ser alvo de uma análise cuidada e dissociada da superficialidade, pois aos diversos graus de gravidade de CVV há que adicionar a premissa das resistências (crescentes) aos fármacos disponíveis.

Como acima referido a CVV pode assumir distintos graus de gravidade com base nas evidências clínicas, microbiológicas, fatores adjacentes ao doente e a resposta do mesmo à terapia. Deste modo, dependendo da gravidade determinada, o tratamento terá variantes, as recomendações sugerem a separação das CVV como tendo: baixo grau de gravidade e com causa etiológica mediada pela *C. albicans* e CVV complicadas que incluem as causadas por

espécies não-*albicans*, as CVVR, a CVV severa e a patologia em doentes imunodeprimidos (16, 67).

Segundo as recomendações e estudos levados a cabo, uma gama considerável de antifúngicos é considerada como indutora de eficácia do ponto de vista terapêutico (67).

Um tratamento profilático numa dose única de 150mg de fluconazole é recomendado para o tratamento das CVV consideradas de fácil resolução.

No caso da CVVR, recomenda-se um protocolo terapêutico com espaçamento temporal de 10 a 14 dias recorrendo a administração tópica ou oral de um azole, precedido de fluconazole numa dosagem de 150mg, uma vez por semana durante 6 meses (16, 67).

No que toca à eficácia do tratamento da CVVR, o tratamento prolongado através de fluconazole administrado oralmente é tido como o mais indicado, mostrando índices de eficácia acima dos 90%. Este tipo de protocolo demonstrou ainda ter baixas taxas de resistência quer à *C. albicans*, quer às espécies não - *albicans* (35).

Tabela 1 - Tratamento da CVV. Esquemas de tratamento mediante gravidade da candidose (Sociedade Portuguesa de Ginecologia - Revisão dos consensos em infeções vulvovaginais)

Candidose não complicada		Candidose complicada	
Tratamento oral	Tratamento intravaginal	Severa	Recorrente
Fluconazole 150mg	Clotrimazole creme vaginal 1%	Fluconazole 150mg	Fluconazole 150 mg
Itraconazole 200mg	Clotrimazole comprimido vaginal 500mg	Terapêutica antifúngica tópica durante 14 dias	Terapêutica antifúngica (7 a 14 dias)
	Clotrimazole comprimidos vaginais 200mg		
	Miconazole creme vaginal 2%		
	Econazole creme vaginal 1%		
	Econazole óvulo vaginal 150mg		
	Sertaconazole		
	Isoconazole		
	Tioconazole		
	Niastina		

### 1.4.1 Suscetibilidade a antifúngicos e resistência

O tema da suscetibilidade aos fármacos actualmente disponíveis é recorrente no seio da comunidade científica e tem sido factor de preocupação na mesma, já que é premente a diminuição da sua eficácia com aumentos significativos de morbilidade e/ou mortalidade (51).

A suscetibilidade aos antifúngicos inclui-se no conjunto das preocupações anteriormente referidas, dados de estudos justificam as preocupações associadas às resistências. Numa investigação levada a cabo pelo Instituto de Normas de Laboratórios Clínicos - *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI), verifica-se uma taxa de 21,1% de isoladas vaginais que apresentam resistência ao fluconazole (7).

Adicionalmente outro foco de preocupação é a crescente taxa de resistência advindo de espécies não-*albicans*, sobrepondo-se actualmente aos casos adstritos à *C. albicans*.

O surgimento do fluconazole no início da década de 90 do século anterior, veio aumentar o leque de opções no tratamento, contudo à medida que foi aplicado de forma empírica surgiram também, a diminuição dos índices de suscetibilidade e as resistências (50).

A eficácia de determinado agente difere de espécie para espécie, sendo que algumas possuem capacidade intrínseca de resistência, como por exemplo a *C. krusei* relativamente ao fluconazole. Porém, outras características devem ser tidas em conta, como a capacidade de penetração do fármaco na membrana celular, a resistência adquirida pela espécie e a interação entre o fármaco e o próprio doente (68).

No caso particular desta investigação testou-se a suscetibilidade de algumas espécies distintas, entre as quais por exemplo, *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*, a dois agentes do grupo dos azoles.

O fluconazole, fármaco com acção fungistática, possui eficácia comprovada contra a *C. albicans* e *C. tropicalis* inibindo a síntese de ergosterol. Este mecanismo ocorre graças à ligação que se estabelece entre o composto e a enzima lanosterol 14- $\alpha$ -esterol-demetilase e que está intimamente associada à transformação de lanosterol em ergosterol. Todo este mecanismo resulta, finalmente, na depleção do ergosterol presente na membrana celular da levedura, levando conseqüentemente, à alteração das suas funções e à inibição do seu desenvolvimento. Processo idêntico ocorre com o clotrimazole, composto igualmente testado nesta investigação, e todos fármacos adstritos ao grupo dos azoles (51).

### 1.4.2 Fármacos antimicóticos

As infeções de foro fúngico e associadas ao trato vaginal têm actualmente disponíveis, várias opções no que aos antimicóticos se refere, podendo estes ser agrupados consoante as suas propriedades e/ou funções.

Desta forma, os azoles em foco neste trabalho incluem: fluconazole, itraconazole, voriconazole e clotrimazole, por exemplo e exercem a sua acção na membrana do

microrganismo, alterando a sua síntese e permeabilidade (13). Este grupo de antifúngicos tem ainda a capacidade de inibição do citocromo P450, que é uma enzima com papel fulcral na biotransformação de diversos fármacos através do processo oxidativo (69).

Outro grande grupo é o das equinocandinas, grupo com largo espectro de acção antifúngica e que integra a caspofungina, anidulafungina e micafungina. A principal característica das equinocandinas é a sua capacidade de actuação na parede dos fungos, mediada pela inibição do 1,3- $\beta$ -D glucano, cujo gene codificador é o FKS1, provocando a disrupção ou lise celular (51, 53). Porém, uma vez que não foi testado qualquer antifúngico deste grupo, a abordagem aos mesmos ficará por aqui.

O antifúngico azole é por natureza e de longe o mais usado no contexto clínico e também, o alvo maior ou *leitmotiv* de investigação por parte da comunidade científica e das grandes farmacêuticas. Estes são moléculas cíclicas que podem ser divididas em dois grupos distintos, consoante o número de átomos nitrogenados no anel azólico: imidazoles - dois átomos nitrogenados; triazoles três átomos nitrogenados (70).

O primeiro azole foi sintetizado em 1944 por Woolley. Posteriormente, no final da década de 60, surgiram alternativas no que aos fármacos deste grupo concerne, a saber: clotrimazole e miconazole (71, 72).

Foi no início da década de 90 do séc. XX que o fluconazole foi disponibilizado para uso clínico, o que consequentemente proporcionou inúmeras vantagens comparativamente ao uso de fármacos da classe dos imidazoles. Entre as características adstritas ao fluconazole enquadram-se a sua elevada hidrosolubilidade e a facilidade de administração por via intravenosa. A sua taxa de absorção é praticamente completa e difunde-se por todo o organismo. As suas excelentes propriedades farmacocinéticas e o seu largo espetro de acção conduziram a que fosse considerado como tratamento padrão no caso das patologias de etiologia fúngica.

Por conseguinte e devido ao facto de não se terem tomado medidas de controlo na sua prescrição profiláctica ou para tratamento, surgiram diversas limitações clínicas, como o aumento da toxicidade e o incremento considerável das taxas de resistência (70, 73).

## Capítulo II - Objectivo(s)

### 1. Objectivo(s)

A presente dissertação tem como objectivo primordial verificar, a Relação entre a ineficácia clínica do tratamento da candidose vulvovaginal por azoles e os perfis de suscetibilidade aos azoles em estirpes isoladas de casos crónicos.

Complementarmente pretendeu-se também:

- Identificar as espécies prevalentes associadas aos casos incluídos no estudo;
- Verificar a susceptibilidade *in vitro* dos isolados clínicos aos antifúngicos clássicos;
- Relacionar a resistência clínica à antibioterapia com os resultados laboratoriais;
- Cruzar os dados obtidos e compará-los com os obtidos em outros estudos.

## Capítulo III - Material e Metodologias

### 1. Material

#### 1.1 Amostras - origem e colheita

As amostras biológicas, num total de 118 estudadas nesta investigação, foram provenientes de consulta de especialidade em clínica privada e em ambiente hospitalar que tinham como finalidade o diagnóstico laboratorial.

As colheitas foram executadas com o auxílio de uma zaragatoa de algodão e de espéculo, obtendo-se a amostra do canal vaginal e posteriormente inoculadas em meio de *Saboraud* segundo procedimento de rotina dos centros envolvidos no estudo. Após incubação e registo dos resultados para fins de diagnóstico as placas em vez de serem rejeitadas para incineração, foram transportadas para o laboratório de investigação para inclusão neste estudo. A identificação das pacientes foi removida e substituída por um código que lhe foi atribuído.

## 1.2 Fármacos antifúngicos

Os compostos alvo de teste laboratorial, para a determinação de suscetibilidade antifúngica, neste estudo foram: o fluconazole F8929 100 mg da Sigma-Aldrich e o clotrimazole da Sigma-Aldrich (Sintra, Portugal).

## 1.3 Reagentes

O meio de cultura CHROMagar (Paris, France) - meio sólido - mediou o auxílio da identificação e diferenciação fenotípica das espécies do género *Candida*, através da sua propriedade cromogénica, que através de cores distintas permite a rápida identificação macroscópica.

O meio *Sabouraud-Dextrose Agar* (SDA) foi usado como meio sólido para cultura de leveduras e foi adquirido à Biokar Diagnostics (Beauvais, France). O meio RPMI-1640 (Biochrom AG, Berlim, Alemanha) foi utilizado na preparação do inóculo dos microrganismos, bem como na preparação das sucessivas diluições das soluções-padrão de clotrimazole e fluconazole para teste em placa de 96 poços. Na preparação do meio líquido supracitado, que requer ainda um tampão, utilizou-se o ácido 3- (N-morfolino) propanossulfónico para o efeito (MOPS, AcrosOrganics).

No caso particular da preparação do composto - clotrimazole, foi ainda utilizado o dimetilsulfóxido (DMSO, VWR, França) para a preparação da solução padrão de clotrimazole com uma concentração inicial de 1600 µg/mL.

Por último, de referir a utilização e adição de glicerol (Merck, Germany) na preparação de BHI, por forma a servir de meio de suporte ao congelamento das amostras provenientes da clínica, viabilizando a sua posterior manipulação para novo trabalho laboratorial, caso se justifique.

## 2. Metodologias

### 2.1 Receção e identificação de amostras

O processo laboratorial tem início após receção das amostras no laboratório de microbiologia CICS-UBI, introduzindo-se na base de dados o código atribuído à amostra, data de colheita e a data de receção e processamento em laboratório.

O término do processo da receção da amostra ocorreu com o congelamento da mesma em meio de BHI com glicerol, por forma a manter a sua viabilidade para posteriores utilizações.

## 2.2 Identificação fenotípica de espécies do género *Candida*

Como anteriormente referido a identificação fenotípica das espécies do género *Candida* foi executada com o auxílio do meio de cultura - CHROMagar (Paris, França). O meio de cultura em causa tem propriedades cromogénicas, que permitem uma distinção macroscópica de diferentes espécies pertencentes ao género em estudo neste trabalho. De acordo com as instruções veiculadas pelo fabricante na bula assume-se que colónias de cor verde são indicativas da presença de *C. albicans*, colónias de cor azul metálico *C. glabrata*, colónias com cor rosácea/malva *Candida spp.* É assegurada uma eficácia de 99% na identificação acima indicada, todavia é importante assegurar a correcta identificação das distintas espécies fazendo uso de identificação bioquímica, uma vez que a análise presuntiva pode conduzir ao erro; especialmente nas espécies não-*albicans*.

No caso da identificação da espécie *C. albicans* utilizou-se apenas o CHROMagar, já que existem evidências científicas de alta sensibilidade e especificidade (74).

## 2.3 Identificação bioquímica de *Candida spp*

Dada a subjetividade na identificação fenotípica das espécies não-*albicans* e de forma a obter uma identificação liminar e isenta de erro procedeu-se à identificação bioquímica destas, através do sistema automatizado VITEK®.

O aparelho VITEK® é um sistema automatizado com capacidade de execução dos testes de identificação (ID), utilizando cartas próprias - cartas YST cards. Cada carta de identificação inclui 30 poços que contêm substratos bioquímicos sob uma forma desidratada, que permitem uma rápida e eficaz identificação da espécie microbiológica.

A identificação é baseada nas características dos dados e no conhecimento sobre o microrganismo e as reacções analisadas. O sistema óptico de transmissão utiliza luz visível para medir directamente o crescimento de microrganismos.

Após um período de incubação (18-24h), as reacções ocorridas são analisadas pelo leitor. No interior do aparelho encontram-se dados recolhidos sobre estirpes conhecidas para se estimarem as reacções típicas das espécies em questão, se não for reconhecido um padrão único de identificação, é fornecida uma lista de possíveis microrganismos.



Figura 2 - Cartas de identificação de leveduras para o sistema VITEK®

## 2.4 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)

A execução da técnica de determinação da CMI foi mediada pela norma M27-A3 - Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica - publicada pela CLSI. A norma de cariz internacional refere a CMI, como a concentração mais baixa de um agente antimicrobiano que impede crescimento de forma visível de um microrganismo no teste de sensibilidade por diluição em ágar ou caldo (75).

O teste decorre, na fase inicial, da preparação do inóculo que foi executado de acordo com o protocolado na norma M27-A3. Para tal, foram usadas culturas da levedura em Sabouraud (SDA), após 24 horas de incubação em estufa a uma temperatura óptima de 37°C. Seguidamente, foi preparada uma suspensão das leveduras em água destilada estéril, sendo a densidade óptica otimizada a uma escala de 0,5 *MacFarland*, com o auxílio de um densitómetro - DensiMat (bioMérieux) - correspondendo a aproximadamente  $1-5 \times 10^6$  células por mL de suspensão. A suspensão de leveduras foi homogeneizada e posteriormente prepararam-se duas diluições desta suspensão, de modo a obter uma concentração final que variou entre 512 e 2 µg/mL no caso fluconazole e entre 0,5 e 16 µg/mL no clotrimazole.

As diluições dos compostos a testar foram realizadas em RPMI, no caso do fluconazole e por DMSO no caso do clotrimazole.

Cada ensaio foi realizado sempre em duplicado para cada diluição do composto, existindo 2 poços para cada diluição, sendo que cada experiência foi repetida por três vezes.

Na microplaca, representada esquematicamente no anexo I, foram incluídos também dois controlos: o controlo positivo (controlo de crescimento de levedura) e o controlo negativo (controlo da esterilidade do meio).

Depois de inoculada, a microplaca foi colocada a incubar em estufa a 37°C durante 24 horas, sem agitação conforme ditam as *guidelines* em vigor. Após estas 24 horas foram feitas leituras macroscópicas de ausência de crescimento, por forma a determinar o valor CMI. As mesmas placas foram inseridas num leitor de microplacas *Anthos 2020*, com comprimento de onda ajustado a 595nm, por forma a determinar a CMI 50, correspondente a redução de 50% do valor de absorvância tomando como referência o controlo de crescimento de cada estirpe. Este resultado foi determinado para o fluconazole.

## Capítulo IV - Resultados

### 1. Resultados da identificação de espécies do género *Candida*

No total de 118 amostras, a identificação e discriminação das mesmas por espécies, através de meio cromogénico e de meio automatizado VITEK 2 ditou a seguinte distribuição: 79 isolados correspondiam a *C. albicans* e 39 isolados a espécies *não-albicans*, de entre as quais *C. glabrata* foi a mais prevalente (Tabela 2).

### 2. Distribuição de espécies

A distribuição por espécies foi a seguinte: 79 *C. albicans*, 22 *C. glabrata*, 2 *C. tropicalis*, 2 *C. krusei*, 1 *C. parapsilosis*, 1 *C. lypholitica*, 3 *C. sphaerica* e ainda 5 *S. cerevisiae* e 3 *Rhodoturula*. Todos são isolados clínicos de infeções de cariz mucocutâneo do tipo candidose vulvovaginal. A distribuição das estirpes *Candida spp.* e de outras leveduras, por percentagem relativamente ao total de isolados é apresentada detalhadamente na figura 3.

Os 110 isolados alvo de testes de suscetibilidade foram provenientes de 48 casos clínicos, sendo o maior número de isolados pertencente a apenas um caso (n=13).

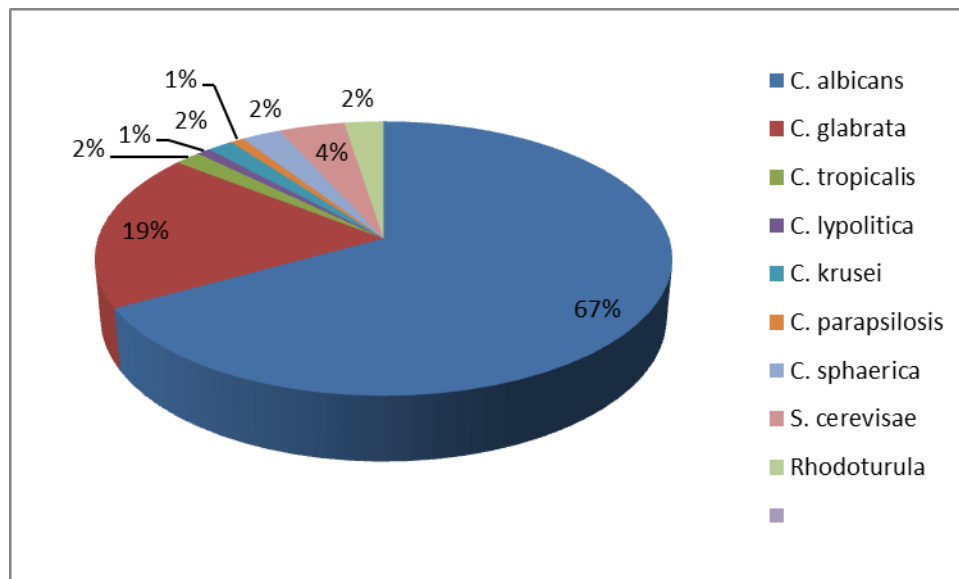


Figura 3 - Distribuição percentual por espécie de levedura do total de isolados clínicos

Tabela 2 - Distribuição do total de espécies sujeitas a teste de suscetibilidade antifúngica

Estirpes	Casos					
	Válidos		Em falta		Total	
	N	Percentagem	N	Percentagem	N	Percent.
<i>C. albicans</i>	79	100,0%	0	,0%	79	100,0%
<i>C. glabrata</i>	22	100,0%	0	,0%	22	100,0%
<i>C. tropicalis</i>	2	100,0%	0	,0%	2	100,0%
Outras leveduras	6	100,0%	0	,0%	6	100,0%
<i>C. parapsilosis</i>	1	100,0%	0	,0%	1	100,0%

### 3. Testes Suscetibilidade aos Antifúngicos

Nesta investigação 110 isolados foram alvo de testes de sensibilidade antifúngica *in vitro*, ao fluconazole e ao clotrimazole, de acordo com a norma M27-A3 publicada pela CLSI.

Relativamente à distribuição quanto à sensibilidade, no cômputo global, registou-se uma percentagem de 53% de isolados sensíveis, 42% de resistentes e apenas 5% intermédios - figura 4.

No caso da suscetibilidade ao fluconazole registou-se entre as *C. albicans* uma taxa percentual de 56, no que toca a amostras resistentes, 39% revelaram-se sensíveis e apenas 5% intermédias. Sendo que no caso das estirpes não-*albicans*, particularmente na *C. glabrata*, se verificou uma percentagem de 4,5 % de resistência e 91 % de sensibilidade e 5% foram intermédias (tabela 3). Na espécie *C. tropicalis* houve 50% de resistência e consequentemente 50% de sensibilidade (tabela 3).

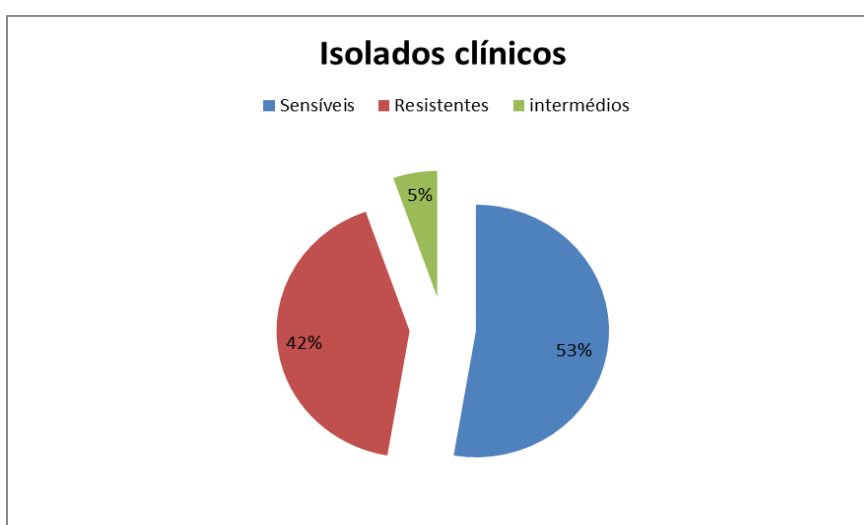


Figura 4 - Distribuição percentual por nível de suscetibilidade ao fluconazole no total de isolados testados

Tabela 3 - Distribuição de espécies alvo de teste de CMI em valor ordinal e percentual por nível de suscetibilidade ao fluconazole

			Sensibilidade			Total
			sensível	intermédia	resistente	
Estirpes	<i>C. albicans</i>	Contagem	31	4	44	79
		% estirpes	39,0%	5,0%	56,0%	100,0%
		% sensibilidade	53,4%	66,7%	95,6%	71,2%
	<i>C. glabrata</i>	Contagem	20	1	1	22
		% estirpes	91,0%	4,5%	4,5%	100,0%
		% sensibilidade	34,4%	16,7%	2,2%	20,7%
	<i>C. tropicalis</i>	Contagem	1	0	1	2
		% estirpes	50,0%	,0%	50,0%	100,0%
		% sensibilidade	1,7%	,0%	2,2%	1,8%
Outras leveduras	Contagem	5	1	0	6	
	% estirpes	83,3%	16,7%	,0%	100,0%	
	% sensibilidade	8,6%	16,7%	,0%	5,4%	
<i>C. parapsilosis</i>	Contagem	1	0	0	1	
	% estirpes	100,0%	,0%	,0%	100,0%	
	% sensibilidade	1,7%	,0%	,0%	,9%	
Total	Contagem	58	6	46	110	
	% estirpes	53,2%	5,4%	41,4%	100,0%	
	% sensibilidade	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	

Relativamente à suscetibilidade ao clotrimazole foi considerado que as amostras seriam suscetíveis se a CMI fosse  $\leq 1 \mu\text{m/ml}$  de acordo com a literatura consultada (23). Desta forma, no universo da *C. albicans* há a assinalar que 56% se mostraram sensíveis ao clotrimazole e 44% resistentes. Na espécie *C. glabrata* constata-se que 55%, ou seja 12 das 22 são sensíveis ao composto anteriormente mencionado e 45%, 10 das 22 são sensíveis. Já no caso da *C. tropicalis* tendo por base os dois isolados identificados, sendo uma estirpe resistente e uma suscetível as percentagens foram de 50/50%. Por último, a única *C. parapsilosis* identificada revelou sensibilidade ao fármaco.

A distribuição dos resultados de suscetibilidade e resistência encontra-se esquematizada na figura 6. Verificamos que no total de estirpes resistentes a predominância é mediada pela *C. albicans*, seguida da *C. glabrata* e da *C. tropicalis*, não se registando nenhum caso de outras leveduras e de *C. parapsilosis*. No caso das estirpes com suscetibilidade intermédia predomina a *C. albicans*, seguida da *C. glabrata* e de outras leveduras. Nas estirpes sensíveis

predomina novamente a *C. albicans*, seguida da *C. glabrata*, outras leveduras e depois temos poucos casos de *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*.

Pode concluir-se que existe uma grande diferença na distribuição da *C. albicans* relativamente às outras estirpes. Esta é ainda a mais representativa, para todos os níveis de sensibilidade. A *C. glabrata* destaca-se depois da *C. albicans* apenas no caso das estirpes sensíveis, pois no caso das intermédias esta situa-se executu com as outras leveduras.

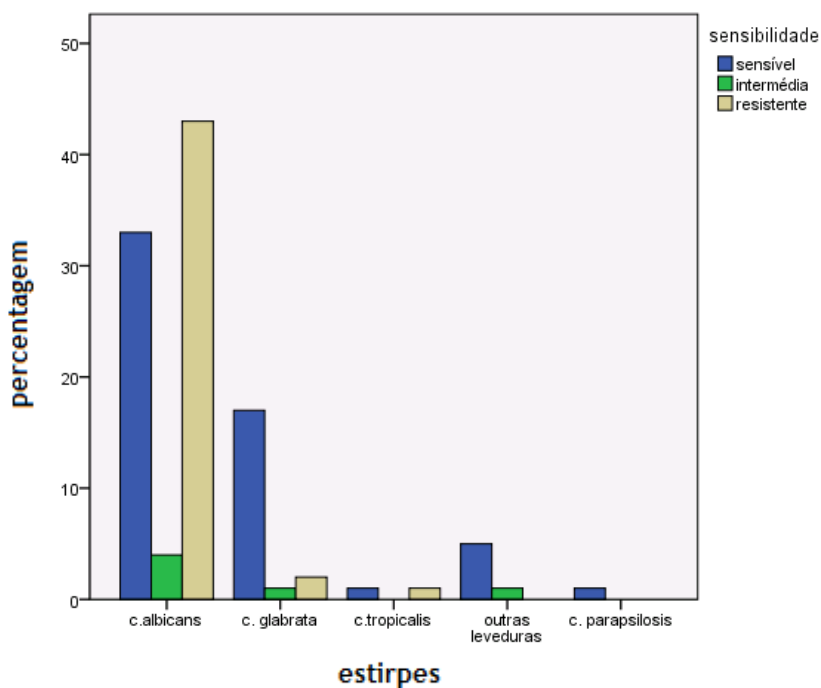


Figura 5 - Gráfico de barras representativo da distribuição percentual de suscetibilidade por espécie

Relação entre a ineficácia clínica do tratamento da candidose vulvovaginal por azoles e os perfis de suscetibilidade em estirpes isoladas de casos crónicos

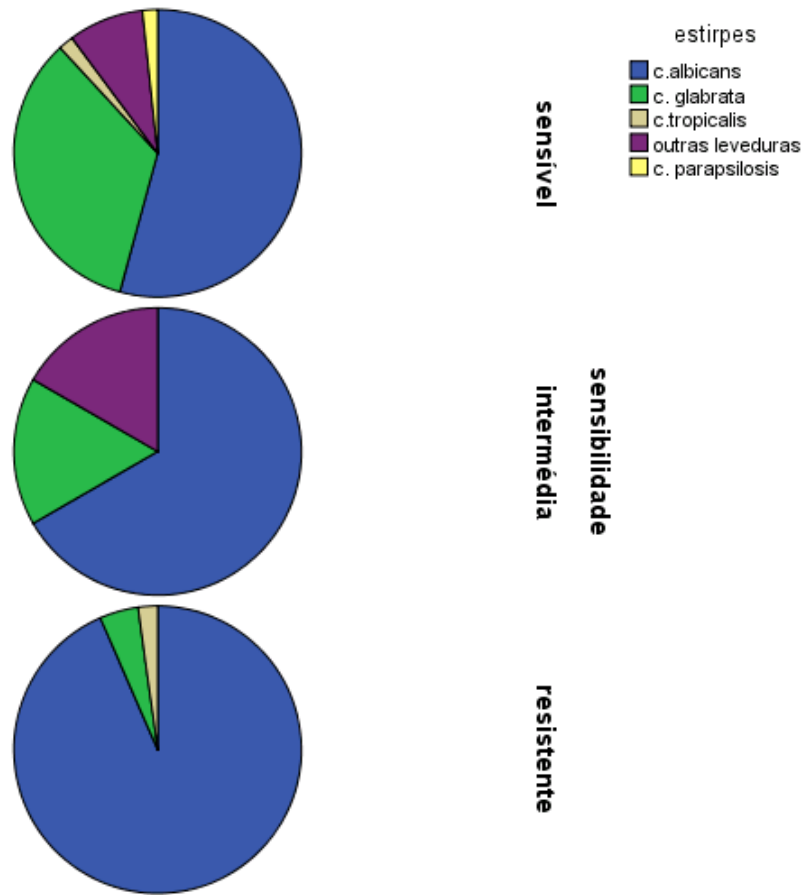


Figura 6 - Distribuição da suscetibilidade ao fluconazole nos 110 isolados clínicos de acordo com a espécie

Realizando um gráfico *plot* das médias, obteve-se o perfil - patenteado na fig. 7, onde se representa a sensibilidade média nos 5 grupos e se verifica que na *C. albicans* a sensibilidade tem o maior valor, seguida da *C. tropicalis*. Há uma diminuição na sensibilidade na *C. glabrata*, em outras leveduras e onde se verifica a menor sensibilidade é na *C. parapsilosis*.

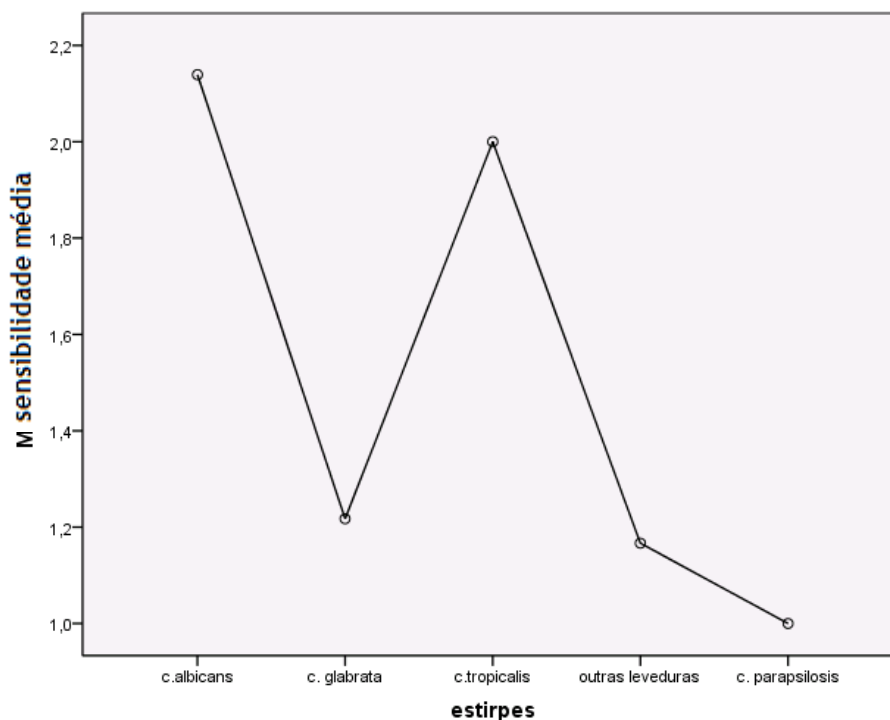


Figura 7 - Gráfico representativo do valor de sensibilidade média por espécie de levedura

Para se responder à questão, se existem diferenças nas estirpes relativamente à sensibilidade, e dado que esta última variável é medida na escala ordinal, aplicou-se o teste de Kruskal-Wallis. O Teste de Kruskal-Wallis, sendo uma alternativa ao Teste ANOVA, e como a amostra é pequena, é mais adequado já que é um teste não paramétrico. Como condição os dados têm que provir de amostras independentes, de populações com a mesma forma, que não necessita ser normal, como já verificámos anteriormente. Mantém-se o requisito das variâncias iguais para todos os grupos.

O valor do teste tem associado um nível de significância de 0,002, pelo que se rejeita a hipótese nula ( $H_0$ ) qualquer que seja o erro tipo I do analista. A rejeição da  $H_0$  significa que existem diferenças significativas entre as estirpes no que respeita à sensibilidade, algo que era expectável.

### 3.1 Resultados da determinação da CMI

Tabela 4 - Resultados da determinação da CMI por espécie e respectivos valores obtidos

Levedura		Fluconazole	Clotrimazole
Espécie	Código	CMI µg/mL	CMI µg/mL
<i>C. albicans</i>	ERSO	2	16
<i>C. albicans</i>	ACFP	2	1
<i>C. albicans</i>	AGF	64	1
<i>C. albicans</i>	AGF-4	16	4
<i>C. albicans</i>	AGF-4	256	4
<i>C. albicans</i>	AGF-4	32	8
<i>C. albicans</i>	AMFC-1	2	4
<i>C. albicans</i>	AMGG	2	0,5
<i>C. glabrata</i>	ASNLC	32	1
<i>C. glabrata</i>	ASNLC	32	4
<i>C. glabrata</i>	ASNLC	4	1
<i>C. albicans</i>	ASRD	8	1
<i>C. albicans</i>	BMGPL	64	2
<i>C. albicans</i>	CCNGS	8	0,5
<i>C. albicans</i>	CCNGS	16	1
<i>C. albicans</i>	CMVBRC	64	1
<i>C. albicans</i>	CMVM-2	2	2
<i>C. albicans</i>	EAMP	64	1
<i>C. albicans</i>	EMFRP	2	4
<i>C. albicans</i>	EMFRP	2	2
<i>C. albicans</i>	EMFRP	2	2
<i>C. albicans</i>	EMFRP	2	4
<i>C. albicans</i>	EMM	2	0,5
<i>C. albicans</i>	EMSCM	2	1
<i>C. glabrata</i>	EMSG	64	16

Relação entre a ineficácia clínica do tratamento da candidose vulvovaginal por azoles e os perfis de suscetibilidade em estirpes isoladas de casos crónicos

<i>C.glabrata</i>	EMSG	32	4
<i>C.glabrata</i>	EMSG	16	4
<i>C.glabrata</i>	EMSG	16	4
<i>C.glabrata</i>	EMSG	8	8
<i>C.glabrata</i>	EMSG	16	4
<i>C.albicans</i>	EMSG	8	0,5
<i>C.glabrata</i>	EMSG	8	0,5
<i>C.glabrata</i>	EMSG	4	0,5
<i>C.glabrata</i>	EMSG	4	0,5
<i>C.glabrata</i>	EMSG	4	1
<i>C.glabrata</i>	EMSG	8	1
<i>C.glabrata</i>	EMSG	8	1
<i>C.albicans</i>	ERFRO	16	4
<i>C.tropicalis</i>	IMCA	64	2
<i>C.albicans</i>	JGBF	4	2
<i>S.cerevisae</i>	MAAR	2	1
<i>S.cerevisae</i>	MAAR	2	1
<i>S.cerevisae</i>	MAAR	2	2
<i>C.albicans</i>	MAAR	2	1
<i>C.glabrata</i>	MAAR	8	0,5
<i>C.glabrata</i>	MAAR	4	0,5
<i>C.glabrata</i>	MAAR	8	0,5
<i>C.albicans</i>	MAMSL	16	8
<i>C.albicans</i>	MAMSL	16	4
<i>C.albicans</i>	MAMSL	2	2
<i>C.albicans</i>	MAMSL	64	2
<i>C.albicans</i>	MAMSL	2	1
<i>C.albicans</i>	MAOCF	16	8
<i>C.albicans</i>	MASPF	4	1
<i>C.albicans</i>	MASPF	2	0,5
<i>C.albicans</i>	MASPF	2	0,5

Relação entre a ineficácia clínica do tratamento da candidose vulvovaginal por azoles e os perfis de suscetibilidade em estirpes isoladas de casos crônicos

<i>C. albicans</i>	MASPF	16	1
<i>C. albicans</i>	MASPF	2	1
<i>C. lyopolitica</i>	MASPF	2	2
<i>C. albicans</i>	MASPF	2	0,5
<i>C. albicans</i>	MASPF	2	1
<i>C. albicans</i>	MASSR	2	0,5
<i>C. albicans</i>	MASSR	16	2
<i>C. albicans</i>	MASSR	16	4
<i>C. albicans</i>	MASSR	16	4
<i>C. albicans</i>	MASSR	2	1
<i>C. albicans</i>	MASSR	64	2
<i>C. parapsilosis</i>	MASSR - CO	2	2
<i>S. cerevisae</i>	MAVARS	2	0,5
<i>S. cerevisae</i>	MAVARS	4	2
<i>C. tropicalis</i>	MAVARS	2	1
<i>C. albicans</i>	MBPL	64	1
<i>C. glabrata</i>	MEATL	4	2
<i>C. albicans</i>	MEATL	64	2
<i>C. albicans</i>	MEDMC	2	1
<i>C. albicans</i>	MFGS	512	8
<i>C. albicans</i>	MFNGSA	16	0,5
<i>C. albicans</i>	MGFPC	32	2
<i>C. albicans</i>	MGFPC	256	0,5
<i>C. glabrata</i>	MGFPC	8	0,5
<i>C. albicans</i>	MGLF	64	1
<i>C. albicans</i>	MGLF	2	1
<i>C. albicans</i>	MGRAPC	16	1
<i>C. albicans</i>	MHRGM	2	1
<i>C. albicans</i>	MJALCE	2	1
<i>C. albicans</i>	MJALCE	2	1
<i>C. albicans</i>	MLACC	512	2

Relação entre a ineficácia clínica do tratamento da candidose vulvovaginal por azoles e os perfis de suscetibilidade em estirpes isoladas de casos crónicos

<i>C. albicans</i>	MLACC	512	8
<i>C. albicans</i>	MMCM	2	0,5
<i>C. albicans</i>	MMCRS	2	1
<i>C. albicans</i>	MMFCMM	16	1
<i>C. albicans</i>	MMFCMM	64	0,5
<i>C. albicans</i>	MMFCMM	16	2
<i>C. albicans</i>	MMFCMM	32	1
<i>C. albicans</i>	MMFCMM	16	1
<i>C. albicans</i>	MMFCMM	16	1
<i>C. albicans</i>	MMFCMM	16	8
<i>C. albicans</i>	MMFCMM	8	2
<i>C. albicans</i>	MMFCMM	16	4
<i>C. albicans</i>	MMFCMM	64	4
<i>C. albicans</i>	MMRAS	16	4
<i>C. albicans</i>	MMSN	4	1
<i>C. albicans</i>	MOSB	64	8
<i>C. glabrata</i>	MSM	32	2
<i>C. glabrata</i>	MSM	32	2
<i>C. albicans</i>	MSM	1	2
<i>C. albicans</i>	RMSO	64	2
<i>C. albicans</i>	ROCF	64	2
<i>C. albicans</i>	SCMM	2	0,5
<i>C. albicans</i>	SCMM	4	1
<i>C. albicans</i>	SCMM	2	1

Tabela 5- Comparação dos intervalos de CMI obtidas por espécie do género *Candida*

Levedura	Fluconazole	Clotrimazole
Espécie	CMI µg/mL	CMI µg/mL
<i>C. albicans</i>	2-512	0,5-16
<i>C. glabrata</i>	4-64	0,5-16
<i>C. parapsilosis</i>	-	-
<i>C. tropicalis</i>	2-64	1-4

### 3.2 Resultados da determinação da CMI 50 - fluconazole

Na determinação da CMI-50 com o antifúngico fluconazole, isto é, concentração em que se verifica uma redução de 50% de crescimento de leveduras mediante a ação do referido fármaco, registou-se para a espécie *C. albicans* uma redução em 80% da amostragem. Nas restantes 20% não se verificou alteração perante a ação de antifúngico (figura 8).

Já no caso das estirpes *não-albicans*, em particular na espécie *glabrata*, verifica-se uma redução em 66% e em contraste não há redução nas restantes 33%. No cômputo da *C. tropicalis*, em duas identificadas, apenas uma se revelou resistente, sendo que no caso desta se determinou uma redução no seu crescimento.

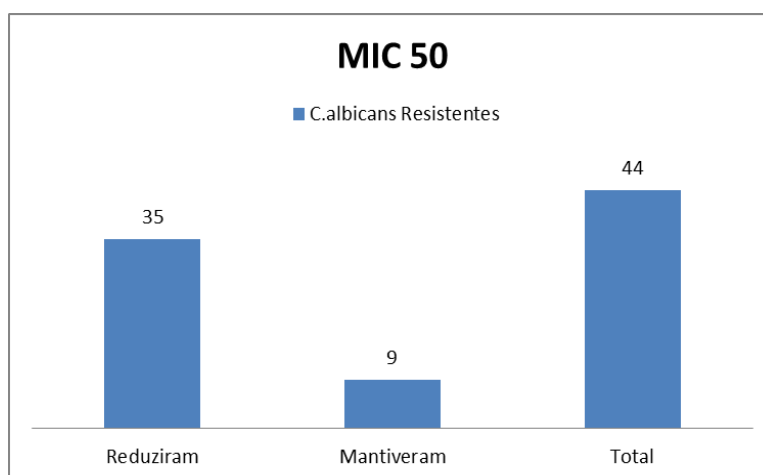


Figura 8 - Gráfico representativo da percentagem de redução de 50% de crescimento de *C. albicans*

## Capítulo V - Discussão

Embora, a levedura do género *Candida* seja um microrganismo pertencente à população microbiana normal do ser Humano, o surgimento de uma tendência crescente na incidência e prevalência da CVV, tem sido seguida com bastante apreensão. Os números são preocupantes e no contexto geral atingem percentagens alarmantes, provocando ainda consequências mais adversas decorrentes do aumento das taxas de resistência. Este panorama é desolador e deve ser alvo de debate e práticas de vigilância (76, 77). Estas ações devem cada vez mais ser valorizadas e apoiadas.

No universo de amostras consideradas e alvo de análise no presente trabalho de investigação, obtiveram-se um total de 118 provenientes de exsudados vaginais, de 48 casos clínicos.

No respeitante à discriminação e distribuição das amostras por espécies, os dados vão de encontro ao descrito na literatura, ou seja, verifica-se uma percentagem predominante de *C. albicans* - 67% (n=79) (literatura aponta para um intervalo entre - 50 a 90%) e uma tendência crescente de aumento em espécies não-*albicans* - 33% (7, 31, 78). No caso das espécies não-*albicans*, nesta investigação, aquilata-se que a *C. glabrata* é a predominante, seguindo-se a *C. tropicalis* e a *C. krusei*. É de todo interessante observar que o binómio espécies-percentagens obtido é similar, e se posiciona num intervalo que se vem registando nos dados de outras investigações. Estes reflectem exactamente a crescente incidência das espécies não-*albicans*, situação que é adicionalmente reflectida no panorama internacional através de diversos estudos. As indicações de outros autores e estudos corroboram, os dados obtidos na presente investigação em análise (79-81).

A alteração deste panorama nos casos de CVV pode dever a sua génese, ao aumento das resistências ao fluconazole, por parte das espécies não-*albicans*, que provocam uma alteração do agente etiológico levando à sua predominância em relação à *C. albicans* (82). Outros motivos válidos averiguados e que podem explicar a tendência descrita são: o uso a longo prazo de diversos azoles e o uso insistente de compostos antifúngicos que provocam uma seleção de espécies (83).

Sem dúvida que a ilação a reter e de acordo com o defendido por vários autores é o facto de parecer haver uma alteração do paradigma, isto é, diminuição de percentagens de prevalência de *C. albicans* e consequente aumento das outras espécies (20). O que se pode verificar na presente investigação, em que a percentagem de espécie *C. albicans* não atinge um valor tão elevado no intervalo defendido por alguns autores - 50% a 90%; dando lugar a um valor considerável de outras espécies.

Relativamente aos testes de suscetibilidade antifúngica das 118 amostras, 110 foram alvo de teste *in vitro* a dois compostos, fluconazole e clotrimazole. Das restantes oito

amostras, duas ao serem identificadas como *C. krusei* foram automaticamente excluídas do teste, já que são intrinsecamente resistentes aos azoles (83). A totalidade da *S. cerevisiae* (5) revelaram-se suscetíveis e a *C. lypholitica* também se mostrou suscetível ao fluconazole. As provas de suscetibilidade revestem-se de uma pertinência inestimável, já que proporcionam dados que permitem direccionar a acção clínica acerca da terapêutica a administrar.

A análise dos dados redundou numa evidência preocupante, no caso particular da espécie *C. albicans* a resistência atingiu os 56% (n=44), sendo que a percentagem de amostras que revelaram sensibilidade ao fluconazole atingiu os 40%. Esta alteração considerável no padrão de resistência de *C. albicans* a este azole pode ter explicação na alteração do *breakpoint* levada a cabo pelo CLSI e com implicações diretas na interpretação dos intervalos de suscetibilidade. A preocupação é patente se se atentar noutros artigos que referem elevadas taxas de sensibilidade ao fluconazole sempre com valores próximos dos 80% (84, 85). Nas espécies não - *albicans*, ao registar-se 33% de prevalência, pode inferir-se que tal como acima mencionado, existe uma tendência similar ao panorama internacional, isto é, uma crescente incidência de espécies que não-*albicans* (1, 79, 80, 86). O aumento das resistências, que é comum em casos de terapêutica prolongada, deve ser observado com evidente preocupação e também com prudência, sendo que a implementação de medidas de prevenção e a elaboração de estudos como o exposto é de todo recomendável por forma a entender da melhor forma o assunto em estudo.

Já no que ao estudo da suscetibilidade ao clotrimazole concerne, tendo por base os valores obtidos de 54% de suscetibilidade e 46% de resistência no caso de *C. albicans*, 55% de sensibilidade e 45% de resistência, na espécie *C. glabrata* e 50% de resistência e 50% de sensibilidade no caso de *C. tropicalis*, pode inferir-se que existem evidências de elevadas percentagens de resistência a este imidazole.

Os valores que se situam num intervalo percentual entre 45% e os 50% vão de encontro a publicações sugestivas de valores similares, tendo por base um valor similar ou intervalo de CMI mais elevado (87, 88). Conclui-se que o clotrimazole pode atingir elevadas percentagens de ineficácia no controlo das candidoses vaginais, tal é também afirmado categoricamente por Claire S. Danby et al (89).

Passando a outro campo de análise dos dados obtidos, outro foco de particular interesse na observação dos dados é o número de pacientes que apresentam prevalência de cada uma das diversas espécies de *Candida* na primeira colheita. Assim é verificável que existem 44 indivíduos cuja presença de *C. albicans* foi detectada na primeira colheita. No caso da *C. glabrata* apenas se registaram 3 pacientes com infeção provocada por esta espécie no primeiro episódio e 2 pacientes com *C. tropicalis* na primeira colheita. No caso da espécie *C. parapsilosis* verificou-se uma doente com presença da levedura no primeiro episódio patológico. Esta análise permite afirmar de forma claro e inequívoca que a *C. albicans* é a espécie, que regista maior prevalência num momento inicial do episódio clínico.

A evidência de alteração de espécie no espaçamento temporal é outro dado significativo e de relevo no contexto clínico. Esta situação ocorreu em sete do universo total

de pacientes incluídos no estudo. Não se pode afirmar categoricamente que houve uma tendência clara neste item em particular já que se verificaram casos de alteração de espécie *albicans* para leveduras de espécies não-*albicans* como se verifica em três dos casos, alteração de espécie não-*albicans* para *albicans*, em dois casos, alteração de espécie *albicans* para não-*albicans* e nova conversão para espécie *albicans*, em um caso. Assim, num total de 48 casos clínicos, existe uma taxa de 12,5% em que houve conversão de espécie. Este dado permite concluir que a grande maioria dos pacientes permanecem colonizados ao longo do tempo, com a mesma espécie que provocou o processo infeccioso inicial. Desta forma, prova-se a grande utilidade da investigação e caracterização dos casos de CVV, pois permite adequar e direccionar o tratamento de forma a evitar administração de antimicóticos que não se revelem eficazes; por conseguinte diminuição de taxas de resistência.

A mudança de suscetibilidade, isto é, alteração de sensibilidade ou resistência e vice-versa ao agente terapêutico é também dado alvo de análise na investigação e tal situação ocorreu em sete pacientes. Esta última situação pode estar relacionada com alterações de espécies causadoras da patologia, resistência crescente ao fármaco administrado entre outras hipóteses.

Interessante também, é averiguar a existência de diferenças significativas entre as estirpes no que toca à sensibilidade. Mediando a análise no gráfico da figura 7 e no teste estatístico de Kruskal-Wallis, conclui-se que na *C. albicans* a sensibilidade tem o maior valor, seguida da *C. tropicalis*. Há uma diminuição na sensibilidade na *C. glabrata*, outras leveduras e onde se verifica a menor sensibilidade é na *C. parapsilosis*. O resultado é que se comprova que existem diferenças assinaláveis, entre estirpes, em relação à suscetibilidade.

Da análise dos resultados obtidos neste ensaio e tendo em consideração o facto de todos estes casos terem sido de isolados durante processos de tratamento clínico não eficaz sabendo que 48% do total de isolados se apresentaram susceptíveis ao agente antifúngico mais utilizado no seu tratamento - o fluconazole - pelo que se poderá inferir que o insucesso terapêutico não está relacionado unicamente com o perfil de resistência ao antifúngico mas também com outros mecanismos de virulência associados a esta espécie, nomeadamente a formação de biofilmes. Efectivamente, dada a reduzida capacidade destes compostos para penetrarem a matriz complexa do biofilme, o antifúngico azolico não é considerado um agente antifúngico eficaz quando este mecanismo de protecção esta presente.

Pode-se constar pela análise do estudo e variáveis obtidas que existe uma relação entre a ineficácia clínica do tratamento da patologia, por azoles e a suscetibilidade revelada nos casos crônicos. A diminuição da suscetibilidade leva a consequências nefastas no tratamento e a um aumento das resistências. Enfatize-se uma vez mais, a necessidade de adoção de políticas preventivas e de investigação, de forma a debelar a crescente incidência da CVV.

## Capítulo VI - Conclusão

Neste estudo pode constatar-se que a prevalência das infecções vaginais causadas por espécies do género *Candida* continua a ser elevada. A sua incidência continua a ser alvo de preocupação pelas diversas entidades, contudo é difícil obter dados redundantes quanto a este aspecto, já que não raras as vezes o diagnóstico é liminarmente decretado sem evidências clínicas e microbiológicas (micológicas).

É fundamental uma sensibilização crescente e contínua para que haja recurso aos métodos de diagnóstico, disponíveis e para que se evite a terapêutica empírica.

Outro dado adquirido através dos resultados obtidos e anteriormente discutidos é que, pelo menos no caso particular desta investigação, se verifica uma taxa considerável de resistência aos antifúngicos testados. Este dado pode ser indicativo de que medidas de prevenção e cuidados na administração de antimicóticos não estão a ser consideradas ou a ser adequadamente acauteladas. Contudo, esta situação deve ser alvo de prudência e de uma investigação mais alargada e profunda. Consideramos também que tendo sido incluídos no estudo isolados clínicos de casos de insucesso terapêutico, o estudo também evidencia que a resistência aos azoles não é o único factor envolvido neste mecanismo de resistência clínica.

Outra ilação interessante é o facto de a percentagem de espécies não-*albicans* estar em crescendo, corroborando estudos e dados de outros países.

Deste modo, e em grande plano pode concluir-se que se justifica um grande estudo que trace um panorama da situação das infeções fúngicas vaginais em Portugal. A implementação de medidas de cariz investigacional e de pesquisa em contexto clínico pode revelar-se um aliado na diminuição das taxas de resistência e serem a longo prazo responsáveis por uma diminuição de custo associados.

Relação entre a ineficácia clínica do tratamento da candidose vulvovaginal por azoles e os perfis de suscetibilidade em estirpes isoladas de casos crónicos

## Referências

1. Kumari V, Banerjee T, Kumar P, Pandey S, Tilak R. Emergence of non-albicans *Candida* among candidal vulvovaginitis cases and study of their potential virulence factors, from a tertiary care center, North India. *Indian J Pathol Microbiol.* 2013 Apr-Jun;56(2):144-7. PubMed PMID: 24056652. Epub 2013/09/24. eng.
2. Almeida AA, Mesquita CS, Svidzinski TI, Oliveira KM. Antifungal susceptibility and distribution of *Candida* spp. isolates from the University Hospital in the municipality of Dourados, State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2013;46(3). PubMed PMID: 23856873. Epub 2013/07/17. eng.
3. Eggimann P, Garbino J, Pittet D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis.* 2003 Nov;3(11):685-702. PubMed PMID: 14592598. Epub 2003/11/01. eng.
4. Buchta V, Spacek J. [Pitfalls of the current laboratory diagnosis and treatment of vulvovaginal candidiasis]. *Klin Mikrobiol Infekc Lek.* 2011 Oct;17(5):158-63. PubMed PMID: 22161751. Epub 2011/12/14. Uskali soucasne laboratorni diagnostiky a terapie vulvovaginalni kandidozy. cze.
5. Corsello S, Spinillo A, Osnengo G, Penna C, Guaschino S, Beltrame A, et al. An epidemiological survey of vulvovaginal candidiasis in Italy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2003 Sep 10;110(1):66-72. PubMed PMID: 12932875. Epub 2003/08/23. eng.
6. Tortorano AM, Kibbler C, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L, Grillot R. *Candidaemia* in Europe: epidemiology and resistance. *Int J Antimicrob Agents.* 2006 May;27(5):359-66. PubMed PMID: 16647248. Epub 2006/05/02. eng.
7. Bauters TG, Dhont MA, Temmerman MI, Nelis HJ. Prevalence of vulvovaginal candidiasis and susceptibility to fluconazole in women. *Am J Obstet Gynecol.* 2002 Sep;187(3):569-74. PubMed PMID: 12237629. Epub 2002/09/19. eng.
8. Marr KA. Invasive *Candida* infections: the changing epidemiology. *Oncology (Williston Park).* 2004 Dec;18(14 Suppl 13):9-14. PubMed PMID: 15682589. Epub 2005/02/03. eng.
9. Bedini A, Venturelli C, Mussini C, Guaraldi G, Codeluppi M, Borghi V, et al. Epidemiology of *candidaemia* and antifungal susceptibility patterns in an Italian tertiary-care hospital. *Clin Microbiol Infect.* 2006 Jan;12(1):75-80. PubMed PMID: 16460550. Epub 2006/02/08. eng.
10. Sobel JD. Vulvovaginal candidosis. *Lancet.* 2007 Jun 9;369(9577):1961-71. PubMed PMID: 17560449. Epub 2007/06/15. eng.
11. Paiva LC, Vidigal PG, Donatti L, Svidzinski TI, Consolaro ME. Assessment of in vitro biofilm formation by *Candida* species isolates from vulvovaginal candidiasis and ultrastructural characteristics. *Micron.* 2012 Feb;43(2-3):497-502. PubMed PMID: 22001373. Epub 2011/10/18. eng.
12. Abi-Chacra EA, Souza LO, Cruz LP, Braga-Silva LA, Goncalves DS, Sodre CL, et al. Phenotypical properties associated with virulence from clinical isolates belonging to the *Candida parapsilosis* complex. *FEMS Yeast Res.* 2013 Dec;13(8):831-48. PubMed PMID: 24103069. Epub 2013/10/10. eng.
13. Sardi JC, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Mendes Giannini MJ. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol.* 2013 Jan;62(Pt 1):10-24. PubMed PMID: 23180477. Epub 2012/11/28. eng.

14. Linhares LM, Witkin SS, Miranda SD, Fonseca AM, Pinotti JA, Ledger WJ. Differentiation between women with vulvovaginal symptoms who are positive or negative for *Candida* species by culture. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2001;9(4):221-5. PubMed PMID: 11916179. Pubmed Central PMCID: 1784657. Epub 2002/03/28. eng.
15. Nyirjesy P. Vulvovaginal candidiasis and bacterial vaginosis. *Infect Dis Clin North Am*. 2008 Dec;22(4):637-52, vi. PubMed PMID: 18954756. Epub 2008/10/29. eng.
16. (SPG) SPdG. Revisão dos Consensos em Infecções Vulvovaginais. 2012 Junho 12.
17. Hong E, Dixit S, Fidel PL, Bradford J, Fischer G. Vulvovaginal candidiasis as a chronic disease: diagnostic criteria and definition. *J Low Genit Tract Dis*. 2014 Jan;18(1):31-8. PubMed PMID: 23760143. Epub 2013/06/14. eng.
18. Nucci M, Queiroz-Telles F, Alvarado-Matute T, Tiraboschi IN, Cortes J, Zurita J, et al. Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. *PLoS One*. 2013;8(3):e59373. PubMed PMID: 23527176. Pubmed Central PMCID: 3601956. Epub 2013/03/26. eng.
19. Kent HL. Epidemiology of vaginitis. *Am J Obstet Gynecol*. 1991 Oct;165(4 Pt 2):1168-76. PubMed PMID: 1951572. Epub 1991/10/01. eng.
20. Kennedy MA, Sobel JD. Vulvovaginal Candidiasis Caused by Non-albicans *Candida* Species: New Insights. *Curr Infect Dis Rep*. 2010 Nov;12(6):465-70. PubMed PMID: 21308556. Epub 2011/02/11. eng.
21. Spinillo A, Capuzzo E, Gulminetti R, Marone P, Colonna L, Piazzini G. Prevalence of and risk factors for fungal vaginitis caused by non-albicans species. *Am J Obstet Gynecol*. 1997 Jan;176(1 Pt 1):138-41. PubMed PMID: 9024104. Epub 1997/01/01. eng.
22. Anson JJ, Allen KD. Evaluation of CHROMagar *Candida* medium for the isolation and direct identification of yeast species from the female genital tract. *Br J Biomed Sci*. 1997 Dec;54(4):237-9. PubMed PMID: 9624731. Epub 1998/06/13. eng.
23. 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. PubMed PMID: 15872235. Pubmed Central PMCID: 1153777. Epub 2005/05/06. eng.
24. Ozcan K, Ilkit M, Ates A, Turac-Bicer A, Demirhindi H. Performance of Chromogenic *Candida* agar and CHROMagar *Candida* in recovery and presumptive identification of monofungal and polyfungal vaginal isolates. *Med Mycol*. 2010 Feb;48(1):29-34. PubMed PMID: 19191167. Epub 2009/02/05. eng.
25. Pirotta MV, Garland SM. Genital *Candida* species detected in samples from women in Melbourne, Australia, before and after treatment with antibiotics. *J Clin Microbiol*. 2006 Sep;44(9):3213-7. PubMed PMID: 16954250. Pubmed Central PMCID: 1594690. Epub 2006/09/07. eng.
26. Costa-de-Oliveira S, Pina-Vaz C, Mendonca D, Goncalves Rodrigues A. A first Portuguese epidemiological survey of fungaemia in a university hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2008 May;27(5):365-74. PubMed PMID: 18204871. Epub 2008/01/22. eng.
27. Correia A, Sampaio P, Almeida J, Pais C. Study of molecular epidemiology of candidiasis in Portugal by PCR fingerprinting of *Candida* clinical isolates. *J Clin Microbiol*. 2004 Dec;42(12):5899-903. PubMed PMID: 15583336. Pubmed Central PMCID: 535247. Epub 2004/12/08. eng.
28. Vazquez-Gonzalez D, Perusquia-Ortiz AM, Hundefiker M, Bonifaz A. Opportunistic yeast infections: candidiasis, cryptococcosis, trichosporonosis and

- geotrichosis. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2013 May;11(5):381-93; quiz 94. PubMed PMID: 23621330. Epub 2013/04/30. eng.
29. Pfaller MA, Messer SA, Hollis RJ, Boyken L, Tendolkar S, Kroeger J, et al. Variation in susceptibility of bloodstream isolates of *Candida glabrata* to fluconazole according to patient age and geographic location in the United States in 2001 to 2007. *J Clin Microbiol.* 2009 Oct;47(10):3185-90. PubMed PMID: 19656983. Pubmed Central PMCID: 2756923. Epub 2009/08/07. eng.
30. Patrick R. Murray KSR, Michael A. Pfaller. *Medical Microbiology*. In: Elsevier, editor. *Medical Microbiology*. 6th ed2008. p. 779 - 81
31. Ilkit M, Guzel AB. The epidemiology, pathogenesis, and diagnosis of vulvovaginal candidosis: a mycological perspective. *Crit Rev Microbiol.* 2011 Aug;37(3):250-61. PubMed PMID: 21599498. Epub 2011/05/24. eng.
32. Taylor BN, Staib P, Binder A, Biesemeier A, Sehnal M, Rollingshoff M, et al. Profile of *Candida albicans*-secreted aspartic proteinase elicited during vaginal infection. *Infect Immun.* 2005 Mar;73(3):1828-35. PubMed PMID: 15731084. Pubmed Central PMCID: 1064921. Epub 2005/02/26. eng.
33. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence.* 2013 Feb 15;4(2):119-28. PubMed PMID: 23302789. Pubmed Central PMCID: 3654610. Epub 2013/01/11. eng.
34. Ombrella AM, Racca L, Ramos L. [Protease and phospholipase activities of *Candida albicans* isolated from vaginal secretions with different pH values]. *Rev Iberoam Micol.* 2008 Mar;25(1):12-6. PubMed PMID: 18338921. Epub 2008/03/15. Actividades proteinasa y fosfolipasa de aislamientos de *Candida albicans* provenientes de secreciones vaginales con distintos valores de pH. spa.
35. Achkar JM, Fries BC. *Candida* infections of the genitourinary tract. *Clin Microbiol Rev.* 2010 Apr;23(2):253-73. PubMed PMID: 20375352. Pubmed Central PMCID: 2863365. Epub 2010/04/09. eng.
36. Whiteway M, Bachewich C. Morphogenesis in *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol.* 2007;61:529-53. PubMed PMID: 17506678. Epub 2007/05/18. eng.
37. Porman AM, Hiraikawa MP, Jones SK, Wang N, Bennett RJ. MTL-independent phenotypic switching in *Candida tropicalis* and a dual role for Wor1 in regulating switching and filamentation. *PLoS Genet.* 2013 Mar;9(3):e1003369. PubMed PMID: 23555286. Pubmed Central PMCID: 3605238. Epub 2013/04/05. eng.
38. Cullen PJ, Sprague GF, Jr. The regulation of filamentous growth in yeast. *Genetics.* 2012 Jan;190(1):23-49. PubMed PMID: 22219507. Pubmed Central PMCID: 3249369. Epub 2012/01/06. eng.
39. Kumar CP, Kumar SS, Menon T. Phospholipase and proteinase activities of clinical isolates of *Candida* from immunocompromised patients. *Mycopathologia.* 2006 Apr;161(4):213-8. PubMed PMID: 16552483. Epub 2006/03/23. eng.
40. Vedyappan G, Rossignol T, d'Enfert C. Interaction of *Candida albicans* biofilms with antifungals: transcriptional response and binding of antifungals to beta-glucans. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 May;54(5):2096-111. PubMed PMID: 20194705. Pubmed Central PMCID: 2863626. Epub 2010/03/03. eng.
41. d'Enfert C. Biofilms and their role in the resistance of pathogenic *Candida* to antifungal agents. *Curr Drug Targets.* 2006 Apr;7(4):465-70. PubMed PMID: 16611034. Epub 2006/04/14. eng.
42. Cheng SC, Joosten LA, Kullberg BJ, Netea MG. Interplay between *Candida albicans* and the mammalian innate host defense. *Infect Immun.* 2012 Apr;80(4):1304-13. PubMed PMID: 22252867. Pubmed Central PMCID: 3318407. Epub 2012/01/19. eng.

43. Ghosh S, Navarathna DH, Roberts DD, Cooper JT, Atkin AL, Petro TM, et al. Arginine-induced germ tube formation in *Candida albicans* is essential for escape from murine macrophage line RAW 264.7. *Infect Immun*. 2009 Apr;77(4):1596-605. PubMed PMID: 19188358. Pubmed Central PMCID: 2663133. Epub 2009/02/04. eng.
44. Jimenez-Lopez C, Lorenz MC. Fungal Immune Evasion in a Model Host-Pathogen Interaction: *Candida albicans* Versus Macrophages. *PLoS Pathog*. 2013 Nov;9(11):e1003741. PubMed PMID: 24278014. Pubmed Central PMCID: 3836912. Epub 2013/11/28. eng.
45. Wachtler B, Wilson D, Haedicke K, Dalle F, Hube B. From attachment to damage: defined genes of *Candida albicans* mediate adhesion, invasion and damage during interaction with oral epithelial cells. *PLoS One*. 2011;6(2):e17046. PubMed PMID: 21407800. Pubmed Central PMCID: 3044159. Epub 2011/03/17. eng.
46. Zakikhany K, Naglik JR, Schmidt-Westhausen A, Holland G, Schaller M, Hube B. In vivo transcript profiling of *Candida albicans* identifies a gene essential for interepithelial dissemination. *Cell Microbiol*. 2007 Dec;9(12):2938-54. PubMed PMID: 17645752. Epub 2007/07/25. eng.
47. Frohner IE, Bourgeois C, Yatsyk K, Majer O, Kuchler K. *Candida albicans* cell surface superoxide dismutases degrade host-derived reactive oxygen species to escape innate immune surveillance. *Mol Microbiol*. 2009 Jan;71(1):240-52. PubMed PMID: 19019164. Pubmed Central PMCID: 2713856. Epub 2008/11/21. eng.
48. Wellington M, Dolan K, Krysan DJ. Live *Candida albicans* suppresses production of reactive oxygen species in phagocytes. *Infect Immun*. 2009 Jan;77(1):405-13. PubMed PMID: 18981256. Pubmed Central PMCID: 2612242. Epub 2008/11/05. eng.
49. Turnidge J, Paterson DL. Setting and revising antibacterial susceptibility breakpoints. *Clin Microbiol Rev*. 2007 Jul;20(3):391-408, table of contents. PubMed PMID: 17630331. Pubmed Central PMCID: 1932754. Epub 2007/07/17. eng.
50. Pfaller MA. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *Am J Med*. 2012 Jan;125(1 Suppl):S3-13. PubMed PMID: 22196207. Epub 2012/01/04. eng.
51. Kanafani ZA, Perfect JR. Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. *Clin Infect Dis*. 2008 Jan 1;46(1):120-8. PubMed PMID: 18171227. Epub 2008/01/04. eng.
52. MacCallum DM, Coste A, Ischer F, Jacobsen MD, Odds FC, Sanglard D. Genetic dissection of azole resistance mechanisms in *Candida albicans* and their validation in a mouse model of disseminated infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Apr;54(4):1476-83. PubMed PMID: 20086148. Pubmed Central PMCID: 2849354. Epub 2010/01/21. eng.
53. Peman J, Canton E, Espinel-Ingroff A. Antifungal drug resistance mechanisms. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2009 May;7(4):453-60. PubMed PMID: 19400764. Epub 2009/04/30. eng.
54. White TC, Holleman S, Dy F, Mirels LF, Stevens DA. Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002 Jun;46(6):1704-13. PubMed PMID: 12019079. Pubmed Central PMCID: 127245. Epub 2002/05/23. eng.
55. Cuenca-Estrella M. [Antifungal agents in the treatment of systemic infections: Relevance of mechanism of action, activity profile and resistances]. *Rev Esp Quimioter*. 2010 Dec;23(4):169-76. PubMed PMID: 21191554. Epub 2010/12/31. Antifungicos en el tratamiento de las infecciones sistemicas: importancia del mecanismo de accion, espectro de actividad y resistencias. spa.

56. Wormser GP, Summers PR. *Vulvovaginal Infections* By William J. Ledger and Steven S. Witkin London: Manson Publishing, 2007 128 pp., illustrated. \$69.95 (hardcover). *Clinical Infectious Diseases*. 2007 November 15, 2007;45(10):1406-7.
57. Engberts MK, Korporaal H, Vinkers M, van Belkum A, van Binsbergen J, Lagro-Janssen T, et al. Vulvovaginal candidiasis: diagnostic and therapeutic approaches used by Dutch general practitioners. *Eur J Gen Pract*. 2008;14(1):30-3. PubMed PMID: 18464170. Epub 2008/05/09. eng.
58. Workowski KA, Berman SM. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2006. *MMWR Recomm Rep*. 2006 Aug 4;55(RR-11):1-94. PubMed PMID: 16888612. Epub 2006/08/05. eng.
59. Hospenthal DR, Beckius ML, Floyd KL, Horvath LL, Murray CK. Presumptive identification of *Candida* species other than *C. albicans*, *C. krusei*, and *C. tropicalis* with the chromogenic medium CHROMagar *Candida*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2006;5:1. PubMed PMID: 16390552. Pubmed Central PMCID: 1334214. Epub 2006/01/05. eng.
60. Melhem MS, Bertoletti A, Lucca HR, Silva RB, Meneghin FA, Szeszs MW. Use of the VITEK 2 system to identify and test the antifungal susceptibility of clinically relevant yeast species. *Braz J Microbiol*. 2013 Dec;44(4):1257-66. PubMed PMID: 24688520. Pubmed Central PMCID: 3958196. Epub 2014/04/02. eng.
61. Novikova N, Rodrigues A, Mardh PA. Can the diagnosis of recurrent vulvovaginal candidosis be improved by use of vaginal lavage samples and cultures on chromogenic agar? *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2002;10(2):89-92. PubMed PMID: 12530485. Pubmed Central PMCID: 1784607. Epub 2003/01/18. eng.
62. Bai FY. Association of genotypes with infection types and antifungal susceptibilities in *Candida albicans* as revealed by recent molecular typing strategies. *Mycology*. 2014 Mar;5(1):1-9. PubMed PMID: 24772369. Pubmed Central PMCID: 3979442. Epub 2014/04/29. Eng.
63. Morace G, Sanguinetti M, Posteraro B, Lo Cascio G, Fadda G. Identification of various medically important *Candida* species in clinical specimens by PCR-restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol*. 1997 Mar;35(3):667-72. PubMed PMID: 9041409. Pubmed Central PMCID: 229647. Epub 1997/03/01. eng.
64. Wahyuningsih R, Freisleben HJ, Sonntag HG, Schnitzler P. Simple and rapid detection of *Candida albicans* DNA in serum by PCR for diagnosis of invasive candidiasis. *J Clin Microbiol*. 2000 Aug;38(8):3016-21. PubMed PMID: 10921970. Pubmed Central PMCID: 87175. Epub 2000/08/02. eng.
65. Basso LR, Jr., Gast CE, Mao Y, Wong B. Fluconazole transport into *Candida albicans* secretory vesicles by the membrane proteins Cdr1p, Cdr2p, and Mdr1p. *Eukaryot Cell*. 2010 Jun;9(6):960-70. PubMed PMID: 20348384. Pubmed Central PMCID: 2901649. Epub 2010/03/30. eng.
66. de Oliveira JM, Cruz AS, Fonseca AF, Vaz CP, Rodrigues A, Aurea F, et al. Prevalence of *Candida albicans* in vaginal fluid of asymptomatic Portuguese women. *J Reprod Med*. 1993 Jan;38(1):41-2. PubMed PMID: 8441130. Epub 1993/01/01. eng.
67. Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK, Jr., Calandra TF, Edwards JE, Jr., et al. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2009 Mar 1;48(5):503-35. PubMed PMID: 19191635. Epub 2009/02/05. eng.
68. Orozco AS, Higginbotham LM, Hitchcock CA, Parkinson T, Falconer D, Ibrahim AS, et al. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida krusei*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998 Oct;42(10):2645-9. PubMed PMID: 9756770. Pubmed Central PMCID: 105912. Epub 1998/10/03. eng.

69. Ogu CC, Maxa JL. Drug interactions due to cytochrome P450. Proc (Bayl Univ Med Cent). 2000 Oct;13(4):421-3. PubMed PMID: 16389357. Pubmed Central PMCID: 1312247. Epub 2006/01/04. eng.
70. Maertens JA. History of the development of azole derivatives. Clin Microbiol Infect. 2004 Mar;10 Suppl 1:1-10. PubMed PMID: 14748798. Epub 2004/01/30. eng.
71. Woolley DW. Some New Aspects of the Relationship of Chemical Structure to Biological Activity. Science. 1944 Dec 29;100(2609):579-83. PubMed PMID: 17776122. Epub 1944/12/29. eng.
72. Burgess MA, Bodey GP. Clotrimazole (Bay b 5097): in vitro and clinical pharmacological studies. Antimicrob Agents Chemother. 1972 Dec;2(6):423-6. PubMed PMID: 4677595. Pubmed Central PMCID: 444333. Epub 1972/12/01. eng.
73. Vandeputte P, Ferrari S, Coste AT. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. Int J Microbiol. 2012;2012:713687. PubMed PMID: 22187560. Pubmed Central PMCID: 3236459. Epub 2011/12/22. eng.
74. Willinger B, Manafi M. Evaluation of CHROMagar Candida for rapid screening of clinical specimens for Candida species. Mycoses. 1999 Apr;42(1-2):61-5. PubMed PMID: 10394850. Epub 1999/07/08. eng.
75. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast: Tentative Standard M27-A. , 2nd edition (2002).
76. Foxman B, Muraglia R, Dietz JP, Sobel JD, Wagner J. Prevalence of recurrent vulvovaginal candidiasis in 5 European countries and the United States: results from an internet panel survey. J Low Genit Tract Dis. 2013 Jul;17(3):340-5. PubMed PMID: 23486072. Epub 2013/03/15. eng.
77. Sinko J, Bryan J. Latest trends in fungal epidemiology inform treatment choices and stewardship initiatives. Future Microbiol. 2012 Oct;7(10):1141-6. PubMed PMID: 23030421. Epub 2012/10/04. eng.
78. Kothavade RJ, Kura MM, Valand AG, Panthaki MH. Candida tropicalis: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. J Med Microbiol. 2010 Aug;59(Pt 8):873-80. PubMed PMID: 20413622. Epub 2010/04/24. eng.
79. Paulitsch A, Weger W, Ginter-Hanselmayer G, Marth E, Buzina W. A 5-year (2000-2004) epidemiological survey of Candida and non-Candida yeast species causing vulvovaginal candidiasis in Graz, Austria. Mycoses. 2006 Nov;49(6):471-5. PubMed PMID: 17022763. Epub 2006/10/07. eng.
80. Gunther LS, Martins HP, Gimenes F, de Abreu AL, Consolaro ME, Svidzinski TI. Prevalence of Candida albicans and non-albicans isolates from vaginal secretions: comparative evaluation of colonization, vaginal candidiasis and recurrent vaginal candidiasis in diabetic and non-diabetic women. Sao Paulo Med J. 2014;132(2):116-20. PubMed PMID: 24714993. Epub 2014/04/10. eng.
81. Dharmik PG, Gomashe AV, Upadhyay VG. Susceptibility pattern of various azoles against Candida species causing vulvovaginal candidiasis. J Obstet Gynaecol India. 2013 Apr;63(2):135-7. PubMed PMID: 24431621. Pubmed Central PMCID: 3664691. Epub 2014/01/17. eng.
82. Alburquenque C, Beltran S, Olivares R, Falconer MA, Amaro J, Fuentes M, et al. [Species distribution and susceptibility pattern of Candida spp.: the importance to survey also strains isolated from the community]. Rev Chilena Infectol. 2013 Jun;30(3):244-51. PubMed PMID: 23877775. Epub 2013/07/24. Distribucion de especies y perfil de susceptibilidad de aislados de Candida spp: la importancia de vigilar tambien cepas de la comunidad. spa.
83. Guzel AB, Aydin M, Meral M, Kalkanci A, Ilkit M. Clinical characteristics of Turkish women with Candida krusei vaginitis and antifungal susceptibility of the C.

- krusei isolates. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2013;2013:698736. PubMed PMID: 24396265. Pubmed Central PMCID: 3874352. Epub 2014/01/08. eng.
84. Santhanam J, Nazmiah N, Aziz MN. Species distribution and antifungal susceptibility patterns of *Candida* species: Is low susceptibility to itraconazole a trend in Malaysia? *Med J Malaysia.* 2013 Aug;68(4):343-7. PubMed PMID: 24145264. Epub 2013/10/23. eng.
85. Pfaller MA, Messer SA, Woosley LN, Jones RN, Castanheira M. Echinocandin and triazole antifungal susceptibility profiles for clinical opportunistic yeast and mold isolates collected from 2010 to 2011: application of new CLSI clinical breakpoints and epidemiological cutoff values for characterization of geographic and temporal trends of antifungal resistance. *J Clin Microbiol.* 2013 Aug;51(8):2571-81. PubMed PMID: 23720791. Pubmed Central PMCID: 3719648. Epub 2013/05/31. eng.
86. Solis-Arias MP, Moreno-Morales M, Davalos-Tanaka M, Fernandez-Martanez RF, Diaz Flores O, Arenas-Guzman R. [Vaginal colonization by *Candida* spp. Frequency and description of the species isolated in asymptomatic women]. *Ginecol Obstet Mex.* 2014 Jan;82(1):1-8. PubMed PMID: 24701855. Epub 2014/04/08. Colonización vaginal por *Candida* spp. Frecuencia y descripción de las especies aisladas en mujeres asintomáticas. spa.
87. Chong PP, Abdul Hadi SR, Lee YL, Phan CL, Tan BC, Ng KP, et al. Genotyping and drug resistance profile of *Candida* spp. in recurrent and one-off vaginitis, and high association of non-albicans species with non-pregnant status. *Infect Genet Evol.* 2007 Jul;7(4):449-56. PubMed PMID: 17324639. Epub 2007/02/28. eng.
88. Khan F, Baqai R. In vitro antifungal sensitivity of fluconazole, clotrimazole and nystatin against vaginal candidiasis in females of childbearing age. *J Ayub Med Coll Abbottabad.* 2010 Oct-Dec;22(4):197-200. PubMed PMID: 22455297. Epub 2010/10/01. eng.
89. Danby CS, Boikov D, Rautemaa-Richardson R, Sobel JD. Effect of pH on in vitro susceptibility of *Candida glabrata* and *Candida albicans* to 11 antifungal agents and implications for clinical use. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Mar;56(3):1403-6. PubMed PMID: 22232293. Pubmed Central PMCID: 3294902. Epub 2012/01/11. eng.

## Anexo I

	Estirpe 1		Estirpe 2		Estirpe 3		Estirpe 4		Estirpe 5		-
1:1											
1:2											
1:4											
1:8											
1:16											
1:32											
1:64											
1:128											
+											

↓  
Controlo de crescimento da levedura

↓  
Controlo de esterilidade

Figura 9 - Representação da microplaca do ensaio para determinação da CMI

## Anexo II

### AVALIAÇÃO DA CMI POR MICROMÉTODO

Canton, Peman et al. 2003; Clinical Laboratory Standards Institute 2008

#### 1. Preparação do meio de cultura (RPMI):

- 10,4g de RPMI 1640 (sem bicarbonato, com glutamina e indicador de pH)
- 34,53g de tampão MOPS (SIGMA) na concentração final de 0.165 mol/L
- 900 mL de água desmineralizada
- Acertar pH a 7,0 (6,9-7,1) com NaOH 1M
- Acertar volume a 1L
- Esterilizar por membrana 0,2 µm e conservar a 4°C (refrigerado)

#### 2. Preparação dos compostos a testar:

- Os compostos solúveis em água são dissolvidos em RPMI a uma concentração final de 2x a concentração a testar (no poço ocorre uma dissolução de 1:2)
- Os compostos insolúveis em água são diluídos em DMSO numa solução 100x concentrada e posteriormente dissolve-se em RPMI numa concentração 2x superior à desejada

#### 3. Preparação do inoculo:

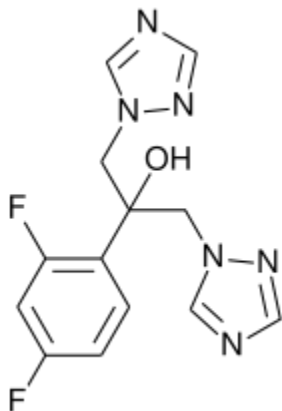
- Culturas em Sabouraud dextrose agar com 24 horas
- Suspende as leveduras em NaCl 0,85% e acertar a densidade óptica a 0.5 MacFarland ( $1-5 \times 10^6$  células/mL)
- Vortexar a suspensão durante 15 segundos
- Diluir 1:50 em RPMI (10µL de suspensão + 490µL de RPMI)
- Diluir 1:20 em RPMI (100µL de suspensão anterior + 1900µL RPMI)

#### 4. Preparação da Microplaca

- Em placa estéril de 96 poços colocar 100 µL da solução de composto a testar (as diluições podem ser efectuadas directamente na microplaca)
- Adicionar 100µL da suspensão final da levedura em RPMI após homogeneização em vortex
- Realizar os ensaios sempre em duplicado de poços para cada diluição do composto
- Controlos a incluir:
  - Controlo do solubilizante do composto (DMSO): 100µL da suspensão da levedura + 100µL de DMSO na concentração utilizada

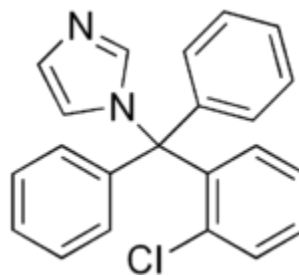
- Controlo de esterilidade do solubilizante (DMSO): 100µL de RPMI + 100µL de DMSO na concentração utilizada
- Controlo de esterilidade do meio de cultura: 200µL de RPMI
- Controlo de crescimento da levedura: 100µL da suspensão da levedura + 100µL de água estéril
- Controlo de antifúngico: 100µL da suspensão da levedura + 100µL de Anfotericina B em diluições sucessivas de DMSO.
- Incubar a 37°C durante 48 horas; realizar leituras visuais e de densidade óptica (leitor de ELISA) às 24 e às 48 horas

## Anexo III



Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Fluconazol>

Figura 10 - Estrutura molecular do fluconazole



Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Clotrimazol>

Figura 11 - Estrutura molecular do clotrimazole

## Anexo IV

### Listagem completa das estirpes

Código	<i>C. albicans</i>
ERSO	<i>C. albicans</i>
ACFP	<i>C. albicans</i>
AGF	<i>C. albicans</i>
AGF-4	<i>C. albicans</i>
AGF-4	<i>C. albicans</i>
AGF-4	<i>C. albicans</i>
AMFC-1	<i>C. albicans</i>
AMGG	<i>C. albicans</i>
ASNLC	<i>C. glabrata</i>
ASNLC	<i>C. glabrata</i>
ASNLC	<i>C. glabrata</i>
ASRD	<i>C. albicans</i>
BMGPL	<i>C. albicans</i>
CCNGS	<i>C. albicans</i>
CCNGS	<i>C. albicans</i>
CMVBRC	<i>C. albicans</i>
CMVM-2	<i>C. albicans</i>
EAMP	<i>C. albicans</i>
EMFRP	<i>C. albicans</i>
EMFRP	<i>C. albicans</i>
EMFRP	<i>C. albicans</i>
EMFRP	<i>C. albicans</i>
EMM	<i>C. albicans</i>
EMSCM	<i>C. albicans</i>
EMSG	<i>C. glabrata</i>
EMSG	<i>C. glabrata</i>
EMSG	<i>C. glabrata</i>
EMSG	<i>C. glabrata</i>
EMSG	<i>C. glabrata</i>
EMSG	<i>C. glabrata</i>
EMSG	<i>C. albicans</i>
EMSG	<i>C. glabrata</i>
EMSG	<i>C. glabrata</i>
EMSG	<i>C. glabrata</i>
EMSG	<i>C. glabrata</i>
EMSG	<i>C. glabrata</i>
EMSG	<i>C. glabrata</i>
ERFRO	<i>C. albicans</i>
IMCA	<i>C. tropicalis</i>

JGBF	<i>C. albicans</i>
MAAR	<i>S. cerevisiae</i>
MAAR	<i>S. cerevisiae</i>
MAAR	<i>S. cerevisiae</i>
MAAR	<i>C. albicans</i>
MAAR	<i>C. glabrata</i>
MAAR	<i>C. glabrata</i>
MAAR	<i>C. glabrata</i>
MAMSL	<i>C. albicans</i>
MAMSL	<i>C. albicans</i>
MAMSL	<i>C. albicans</i>
MAMSL	<i>C. albicans</i>
MAMSS	<i>C. albicans</i>
MAOCF	<i>C. albicans</i>
MASPF	<i>C. albicans</i>
MASPF	<i>C. albicans</i>
MASPF	<i>C. albicans</i>
MASPF	<i>C. albicans</i>
MASPF	<i>C. albicans</i>
MASPF	<i>C. lipolytica</i>
MASPF	<i>C. albicans</i>
MASPF	<i>C. albicans</i>
MASSR	<i>C. albicans</i>
MASSR	<i>C. albicans</i>
MASSR	<i>C. albicans</i>
MASSR-CO	<i>C. parapsilosis</i>
MAVARS	<i>S. cerevisiae</i>
MAVARS	<i>S. cerevisiae</i>
MAVARS	<i>C. tropicalis</i>
MBPL	<i>C. albicans</i>
MEATL	<i>C. glabrata</i>
MEATL	<i>C. albicans</i>
MEDMC	<i>C. albicans</i>
MFGS	<i>C. albicans</i>
MFNGSA	<i>C. albicans</i>
MGFPC	<i>C. albicans</i>
MGFPC	<i>C. albicans</i>
MGFPC	<i>C. glabrata</i>
MGLF	<i>C. albicans</i>
MGLF	<i>C. albicans</i>
MGRAPC	<i>C. albicans</i>
MHRGM	<i>C. albicans</i>
MJALCE	<i>C. albicans</i>

Relação entre a ineficácia clínica do tratamento da candidose vulvovaginal por azoles e os perfis de suscetibilidade em estirpes isoladas de casos crónicos

MLACC	C.albicans
MJALCE	C.albicans
MLACC	C.albicans
MMCM	<i>C.albicans</i>
MMCRS	C.albicans
MMFCMM	<i>C. albicans</i>
MMFCMM	<i>C.albicans</i>
MMFCMM	C.albicans
MMFCMM	<i>C.albicans</i>
MMFCMM	<i>C.albicans</i>
MMFCMM	C.albicans
MMFCMM	C.albicans
MMFCMM	<i>C. albicans</i>
MMRAS	C.albicans
MMSN	C.albicans
MOSB	C.albicans
MSM	<i>C.glabrata</i>
MSM	C.glabrata
MSM	C.albicans
RMSO	<i>C. albicans</i>
ROCF	C.albicans
SCMM	<i>C. albicans</i>
SCMM	<i>C. albicans</i>
SDSM	C.albicans
MAVARS	<i>C. sphaerica</i>
MAVARS	<i>C. sphaerica</i>
MAVARS	<i>C. sphaerica</i>
AGCDM	<i>Rhodotorula sp</i>
ACMP	<i>Rhodotorula sp</i>
MFTN	<i>Rhodotorula sp</i>
MMCM	<i>C. krusei</i>
CSL	<i>C. krusei</i>