

Efeito da Pressão Adaptativa na Estabilidade Genotípica e Fenotípica de Estirpes de Leveduras Clínicas

Rúben Miguel do Adro

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

Orientadora: Doutora Joana Rolo
Co-orientadora: Prof. Doutora Ana Palmeira

29 de outubro de 2021

Folha em branco

Dedicatória

Em certos momentos apercebemo-nos que os verdadeiros heróis estão do nosso lado. Que um dia eu possa ser tão “grande” como vós. Tudo aquilo que sou ou pretendo ser; devo à minha melhor amiga, à minha companheira, à minha “faz tudo”; a ti Mãe. Apesar de longe, mas de certa forma perto; a ti também avó, *in memoriam*.

"When I'm with you, I'm standing with an army " .

Folha em branco

Agradecimentos

Gostaria de agradecer à minha orientadora Doutora Joana Rolo pela oportunidade enriquecedora que me proporcionou ao longo do ano, deveras agradecido por todo o conhecimento transmitido, por todo o apoio, por toda a paciência; sem os quais não teria sido possível a realização desta dissertação. À minha coorientadora Doutora Ana Palmeira de Oliveira pela disponibilidade e conhecimento transmitido ao longo do ano. Agradeço às técnicas do CICS, nomeadamente à Margarida Carrilho pela simpatia e disponibilidade de esterilizar mais um meio de cultura ou uns tubos de ensaio de última hora. Agradeço ao Carlos Gaspar, Ana Oliveira e Paula Faria pela disponibilidade e colaboração em diversas questões que foram essenciais, bem como pelo apoio prestado. Ao Professor Doutor José Martinez-de-Oliveira, por todos os conteúdos enriquecedores transmitidos assim como pelo acolhimento, integração e apoio.

Agradeço aos meus colegas de laboratório pelo ambiente excepcional, pela troca de ideias, por todo o apoio dentro e fora do ambiente de trabalho, agradecido pelo verdadeiro sentido de trabalho em equipa com alegria. Um agradecimento especial à Neila Lima pelo apoio incansável; onde a amizade não se mede na quantidade de anos em que dura, mas sim na intensidade dos momentos vividos. À Margarida Damasceno, pela amizade, pelo apoio e carinho.

Aos meus amigos e colegas Ana Margarida Vale, Cathy Ventura, Carla Barbosa, Cristiana Mateus e Daniel Nascimento pela ajuda, pelo apoio e amizade que foi essencial. À Giovana Voltoline, amiga e colega de casa, por sempre acreditar em ser capaz, pelas refeições e companhia constante.

Um grande agradecimento, às minhas melhores amigas Inês Silvestre e Vera Duarte, às quais sou eternamente grato pelo apoio incansável, pela compreensão e pelas ligações fora de horas.

À minha querida Mãe Fernanda do Adro e Cristina Pinto, por todo o apoio, conhecimento, amor, esforço; e sacrifícios incontáveis ao longo de tantos anos. Agradecido por me ensinarem, especialmente neste ano, a descansar e a não desistir.

A todas as pessoas que eventualmente me esqueci de mencionar, um *bem haja*.

Folha em branco

Resumo

A prevalência de infecções causadas por fungos emergentes é motivo de grande preocupação e debate na comunidade científica. A epidemiologia do gênero *Candida* está bem documentada. No entanto, a epidemiologia do gênero *Rhodotorula* subsiste de forma oblíqua. O presente estudo visa contribuir para a identificação destes agentes patogênicos bem como para a determinação do perfil de suscetibilidade *in vitro* a compostos azólicos. Adicionalmente, a estabilidade do genoma e as características fenotípicas dos isolados foram testadas. Quinze isolados da vulva de 12 mulheres sintomáticas foram identificados através do sistema Vitek®. A suscetibilidade ao fluconazol foi determinada de acordo com o método de microdiluição CLSI. Foram avaliadas as principais características macro morfológicas e o perfil genotípico foi determinado pela técnica de RAPD-PCR. Como principais resultados, observamos variações na identificação Vitek® *versus* métodos moleculares. Os isolados de *Rhodotorula* apresentaram resistência a fluconazol. Possíveis alterações nos padrões de amplificação por RAPD-PCR podem estar intrinsecamente relacionadas à capacidade adaptativa das leveduras. No entanto, mais investigações são necessárias neste campo. Com base nos dados obtidos é possível concluir sobre a necessidade de novas abordagens diagnósticas, para introdução de terapia específica, que permita a adoção de medidas de prevenção e controle destas infecções.

Palavras-chave

Candida spp.; Fenotipagem; Genotipagem; *Rhodotorula* spp.; Suscetibilidade.

Folha em branco

Abstract

The prevalence of infections caused by emerging fungi is a matter of great concern and debate in the scientific community. The epidemiology of the *Candida* genus is well documented. However, the epidemiology of the genus *Rhodotorula* remains askew. The present study aims to contribute to the identification of these pathogens as well as the determination of the *in vitro* susceptibility profile to azole compounds. Furthermore, the stability of the genome and the phenotypic characteristics of the isolates were tested. Fifteen isolates from the vulva of 12 symptomatic women, were identified using the Vitek® system. Susceptibility to fluconazole was determined according to the CLSI microdilution method. The main macro-morphological characteristics were evaluated, and the genotypic profile was determined by the RAPD-PCR technique. As main results, we observed variations in Vitek® identification *versus* molecular methods. *Rhodotorula* isolates were resistant to fluconazole. Possible alterations in the amplification patterns by RAPD-PCR may be intrinsically related to the adaptive capacity of yeasts. However, further investigations are needed in this field. Based on the data obtained, it is possible to conclude the need for new diagnostic approaches, for the introduction of specific therapy, which allows the adoption of prevention and control measures for these infections.

Keywords

Candida spp.; Genotyping; Phenotyping; *Rhodotorula* spp.; Susceptibility.

Folha em branco

Índice

Capítulo 1 – Introdução	22
1. Fungos Patogénicos Emergentes	22
2.1 <i>Candida</i> spp.....	23
2.1.1 Candidose Vulvovaginal	25
2.1.2 Epidemiologia.....	28
2.1.3 Diagnóstico.....	30
2.1.4 Diagnóstico Clínico	32
2.1.5 Diagnóstico Laboratorial.....	33
2.1.6 Diagnóstico Molecular	35
2.1.7 Tratamento.....	36
2.2 <i>Rhodotorula</i> spp.	39
2.2.1 Infeção por <i>Rhodotorula</i> spp.	41
2.2.2 Diagnóstico e Identificação	43
2.2.3 Diagnóstico Molecular	45
2.2.4 Tratamento.....	46
3. Tipagem Molecular.....	48
Capítulo 2 - Objetivos	50
Capítulo 3 – Materiais e Métodos	52
3.1 Amostras – Origem e Colheita	52
3.2 Condições de Armazenamento e Preparação das Estirpes.....	53
3.3 Criopreservação.....	53
3.4 Identificação Bioquímica	53
3.5 Coloração Gram.....	54
3.6 Estudo da Estabilidade Genotípica e Fenotípica	54
3.7 Extração de DNA Genómico.....	57
3.7.1 Quantificação de DNA Genómico.....	58
3.7.2 Normalização de DNA Genómico.....	58
3.8 Deteção de <i>Candida</i> spp. por PCR	59
3.9 Tipagem Molecular RAPD – PCR	60
3.10 Determinação das Condições Ótimas de Crescimento em Meio Líquido	61
3.11 Determinação de Unidades Formadoras de Colónias (UFC)	61
3.12 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC).....	62
3.13 Determinação da Concentração Mínima Letal (MLC)	63
Capítulo 4 – Resultados e Discussão.....	65
4.1 Identificação Microbiológica	66
4.2 Testes de Suscetibilidade	71
4.3 Caracterização Fenotípica	77
4.4 Caracterização Genotípica	81
Capítulo 5 – Conclusões e Perspetivas Futuras	86
Referências Bibliográficas.....	89
Anexos	99

Folha em branco

Lista de Figuras

Figura 1 - Morfologias de <i>C. albicans</i>	23
Figura 2 - Cartão de Reagentes VITEK 2 GN	34
Figura 3 - Alvos de medicamentos antifúngicos	36
Figura 4 - Gram de leveduras de <i>Rhodotorula</i>	43
Figura 5 - Cultura de <i>Sporobolomyces salmonicolor</i> e <i>Rhodotorula</i> spp.	44
Figura 6 - Representação Esquemática de RAPD.....	48
Figura 7 – Resultados de Coloração de Gram.....	66
Figura 8 - Resultados de primeira eletroforese em gel de agarose.	67
Figura 9 – Resultados de segunda eletroforese em gel de agarose	68
Figura 10 - Isolados Clínicos identificados, <i>Candida</i> spp e <i>Rhodotorula</i> spp..	70
Figura 11 - UFC/mL de 2 isolados de <i>Rhodotorula</i>	71
Figura 12 - Crescimento de <i>Rhodotorula</i> , <i>C. famata</i> , e ATCC a 37°C.....	72
Figura 13 – Resultados do Teste de Suscetibilidade de <i>Rhodotorula</i>	73
Figura 14 – Resultados do Teste de Suscetibilidade de <i>Rhodotorula</i>	74
Figura 15 – Resultados do Teste de Suscetibilidade de <i>Candida</i>	74
Figura 16 - Morfologia de <i>R. mucilaginosa</i> / <i>glutinis</i>	77
Figura 17 - Morfologia de <i>Candida albicans</i>	78
Figura 18 – <i>R. mucilaginosa</i> / <i>glutinis</i> e <i>Candida albicans</i> em starch agar	80
Figura 19 - Perfis de amplificação RAPD de <i>R. mucilaginosa</i> / <i>glutinis</i>	81
Figura 20 - Perfis de amplificação RAPD de <i>Candida parapsilosis</i>	82
Figura 21 - Perfis de amplificação RAPD de <i>R. glutinis/mucilaginosa</i> e <i>Candida albicans</i>	83
Figura 22 – Crescimento <i>Rhodotorula</i> , <i>Candida famata</i> a Temperatura de 30°C.....	99

Folha em branco

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Classificação Clínica de Candidose Vulvovaginal.....	26
Tabela 2 - Estudos epidemiológicos de mulheres com CVV.	29
Tabela 3 - Suscetibilidade de isolados de <i>Candida</i> a fluconazol	38
Tabela 4 – Intervalos de MICs de 29 estirpes de <i>Rhodotorula</i>	46
Tabela 5 - Codificação das amostras usadas no estudo.....	52
Tabela 6 - Composição de preparação de meio de cultura <i>Cornmeal Agar</i>	55
Tabela 7 - Composição de preparação de meio de cultura <i>Starch Agar</i>	55
Tabela 8 - Composição de preparação de meio de cultura SDA.....	55
Tabela 9 - Composição de preparação de meio de cultura PDA.....	56
Tabela 10 - Sequência de nucleotídeos, tamanho, designação e localização no gene P450-L1A1 de <i>primer ZU5/6</i>	59
Tabela 11 - Aparência das amostras biológicas em SDA.	65
Tabela 12 – Primeiros Resultados do sistema automatizado Vitek®.....	67
Tabela 13 - Repetição de identificação do sistema automatizado Vitek®.....	69
Tabela 14 – <i>Breakpoints</i> definidos de Fluconazol para <i>Candida</i> spp... ..	75
Tabela 15 - Comparação de MIC Visual e MLC obtidas com fluconazol em isolados de <i>Candida</i> e <i>Rhodotorula</i>	76

Folha em branco

Lista de Acrónimos

ATCC	Do inglês “ <i>American Type Culture Collection</i> ”
BHI	Do inglês “ <i>Brain Infusion Heart</i> ”
BMD	Do inglês “ <i>Broth Microdilution Method</i> ”
BV	Bacteriose Vaginal
CE – UBI	Comissão de Ética da Universidade da Beira Interior
CHUCB	Centro Hospital Universitário Cova da Beira
CLSI	Do inglês “ <i>Clinical Laboratory Standards Institute</i> ”
CVC	Cateter Venoso Central
CVV	Candidose Vulvovaginal
CVVR	Candidose Vulvovaginal Recorrente
DIC	Do inglês “ <i>Differential Interference Contrast</i> ”
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Do inglês “ <i>deoxyribonucleic acid</i> ”
DPAC	Diálise Peritoneal Contínua Ambulatória
DSTs	Doenças Sexualmente Transmissíveis
H	Horas
HCl	Ácido Clorídrico
HIV	Do inglês “ <i>Human Immunodeficiency Virus</i> ”
ITS	Do inglês “ <i>Internal Transcribed Spacers</i> ”
KCl	Cloreto de Potássio
KH ₂ PO ₄	Fosfato Monopotássico
KOH	Hidróxido de Potássio
LiCl	Cloreto de Lítio
min	Minutos
MGs	Médias Geométricas
MIC	Do inglês “ <i>Minimum Inhibitory Concentration</i> ”
MLC	Do inglês “ <i>Minimum Lethal Concentration</i> ”
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino) -propanossulfónico
Na ₂ HPO ₄	Fosfato Dissódico
NAC	Do inglês “ <i>Non albicans Candida</i> ”
NaCl	Cloreto de Sódio
NCBI	Do inglês “ <i>National Center for Biotechnology Information</i> ”
NGS	Do inglês “ <i>Next Generation Sequencing</i> ”
PB	Pares de Bases
PBS	Do inglês “ <i>Phosphate Bufferd Saline</i> ”
PCR	Do inglês “ <i>Polymerase Chain Reaction</i> ”
PDA	Do inglês “ <i>Potato Dextrose Agar</i> ”
RAPD	Do inglês “ <i>Randomly Amplified Polimorphic DNA</i> ”
RNA	Do inglês “ <i>Ribonucleic Acid</i> ”
RPM	Rotações por Minuto
RPMI	Do inglês “ <i>Roswell Park Memorial Institute</i> ”
SDA	Do inglês “ <i>Sabourad Dextrose Agar</i> ”
SDD	Suscetível Dependente da Dose
SDS	Do inglês “ <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> ”

TA	Temperatura Ambiente
UBI	Universidade da Beira Interior
UFC	Unidades Formadoras de Colónias
UV	Ultra -Violeta
YPD	Do inglês “ <i>Yeast-extract Peptone Dextrose</i> ”

Folha em branco

Comunicações Científicas

Comunicação oral de parte deste trabalho de Mestrado

- **Adro R.M.**, Gaspar C., Oliveira A.S., Lima N., Oliveira R.P., Oliveira J.M., Oliveira A.P., Rolo J. “Effect of Adaptive Pressure on Genotypic and Phenotypic Stability of Clinical Yeast Strains”, XVI Annual CICS-UBI Symposium, Covilhã, Portugal – 30 de setembro a 1 de outubro 2021.

Folha em branco

Capítulo 1 – Introdução

1. Fungos Patogênicos Emergentes

Um agente patogênico emergente pode ser definido como o agente causador de uma doença infecciosa cuja incidência está a aumentar após o seu aparecimento numa nova população hospedeira ou cuja incidência está a aumentar numa população hospedeira existente, como resultado de mudanças de longo prazo na sua epidemiologia subjacente [1].

Os fungos são organismos eucariotas cuja eflorescência tem tido um aumento contínuo tanto no meio ambiente, população humana, animais domésticos, vida selvagem e vegetal. É evidente o seu impacto na segurança alimentar e dos ecossistemas, contudo a dinâmica populacional deste tipo de invasão biológica permanece mal compreendida [1], [2].

O efeito das infeções fúngicas na saúde humana não é amplamente reconhecido, e as mortes resultantes dessas infeções costumam ser esquecidas. A maioria das pessoas, durante a vida, sofre de infeções fúngicas superficiais que geralmente são fáceis de curar mas milhões de pessoas contraem infeções invasivas que são muito mais difíceis de diagnosticar e tratar [2].

Infeções fúngicas graves ocorrem como consequência de outros problemas de saúde, nomeadamente em indivíduos imunocomprometidos, onde estão incluídos pacientes que sofrem de asma, vírus de imunodeficiência humana (HIV), cancro, transplante de órgãos e terapias “agressivas”, nomeadamente com recurso crescente a drogas citotóxicas e imunossupressoras para o tratamento de doenças, bem como o uso generalizado de novos e poderosos agentes antibacterianos. O aumento de indivíduos imunocomprometidos tem consequentemente provocado o aumento de incidência de infeções oportunistas, principalmente aquelas causadas por fungos [1], [2].

A epidemiologia das infeções causadas por agentes patogênicos fúngicos comuns, como *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus fumigatus* está bem documentada, contudo a epidemiologia das infeções causadas por outros agentes patogênicos fúngicos encontra-se ainda enviesada [3].

Anteriormente consideradas não patogênicas, as espécies de *Rhodotorula* surgiram como agentes oportunistas que têm a capacidade de colonizar e infetar pacientes suscetíveis. O aumento da fungemia de *Rhodotorula* foi associado a um aumento de modalidades de tratamento que incluem admissões em unidades de terapia intensiva, uso de cateter venoso central (CVC), nutrição parenteral de curto e longo prazo, antibióticos de amplo espectro, transplantes de órgãos e quimioterapia [4]. Na maioria dos casos, a identificação destas espécies patogênicas é problemática e, portanto, a sua epidemiologia ainda não foi elucidada de forma adequada.

Para além disso, a importância da rápida identificação, avaliação e ação não pode ser exagerada: muitas vezes, o maior fator que afeta a escala de uma epidemia é a velocidade com que intervenções eficazes são implementadas [3].

2.1 *Candida* spp.

Os fungos são microrganismos eucariotas [5]. O género *Candida* enquadra-se taxonomicamente no reino *Fungi*, no filo *Deuteromycota*, classe *Blastomycetes*, ordem *Cryptococcales* e na família *Cryptococaceae* [6]. *Candida* spp. são microrganismos relativamente simples: leveduras assexuadas, geneticamente diploides com a presença de oito cromossomas [5], [7]. Macroscopicamente *in vitro*, em meio sólido *Sabourad Dextrose Agar* (SDA) espécies deste género originam colónias maioritariamente lisas de cor branca a creme [5]. Como comensal, *Candida* spp. podem crescer tipicamente sob a forma de levedura: células germinativas de formato oval único e multiplica-se por gemulação em blastóporos. A forma filamentosa é característica quando a imunidade do hospedeiro se encontra debilitada ou comprometida; esta forma caracteriza-se por células alongadas conectadas de ponta a ponta. Existem dois tipos de formas filamentosas: hifas e pseudo-hifas. Hifas caracterizam-se por terem septos verdadeiros (sem constrições) e geralmente apresentam um menor número de ramificações (Figura 1). Em contraste, pseudo-hifas têm uma forma elíptica, constrições nas junções celulares e apresentam geralmente muitas ramificações. Apesar da maior semelhança física entre pseudo-hifas e hifas, aquelas compartilham muitas mais propriedades com as leveduras e podem ser mais bem descritas como células de levedura alongadas e aderidas [5], [8], [9].

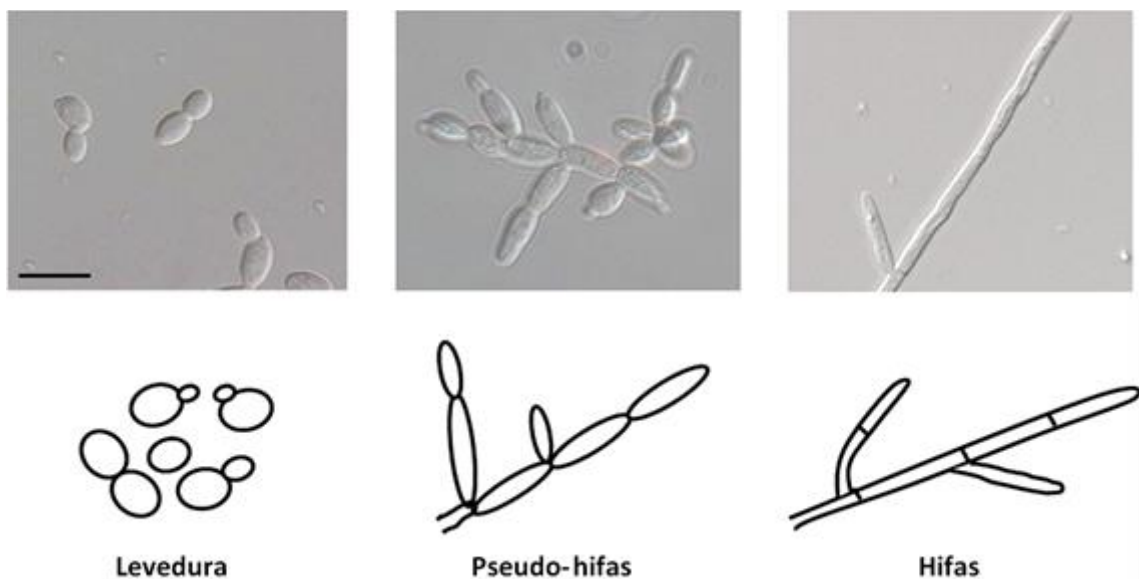


Figura 1 - Morfologias de agentes patogénicos fúngicos. (Em cima) células de *C. albicans* visualizadas por microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC) (barra = 10 μm). (Em baixo) Representação esquemática de cada morfologia. Adaptado de [9].

Candida albicans é pleomórfico, ou seja, sofre transições morfológicas reversíveis entre as três morfologias. A sua capacidade reversível de transição de morfologia de levedura para células filamentosas está associada à sua virulência e patogenicidade [5], [9].

Espécies non-*albicans Candida* (NAC) não produzem formas filamentosas tão prontamente ou robustamente como *C. albicans*. É relevante realçar que nem todas as espécies de *Candida* crescem nas três morfologias possíveis, por exemplo, *C. albicans* pode ser encontrada sob a forma de levedura, hifas e pseudo-hifas. *C. parapsilosis* é encontrada apenas na morfologia de levedura e pseudo-hifas mas cresce predominantemente sob a forma de levedura [8].

As cinco espécies mais comumente encontradas na prática médica como agentes etiológicos causadores de processo infeccioso em humanos são: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, responsáveis por 92% de todos os casos de infecção diagnosticados [10], [11]. Contudo estão identificadas mais de 200 espécies de *Candida* [5], [6], entre as quais 17 são comensais humanos [6].

2.1.1 Candidose Vulvovaginal

Comumente apelidada por Candidíase Vaginal, Candidíase Vulvovaginal ou Vaginite Aguda por *Candida*, mas com o reconhecimento subsequente de que o local dominante da inflamação e a fonte dos sintomas é a vulva, e aplicando-se o sufixo clássico das infecções por fungos -ose, consolidou-se a designação Candidose Vulvovaginal (CVV) [12], [6].

CVV é uma infecção causada por espécies de *Candida*, predominantemente por *C. albicans* [13]. De uma forma geral, 85%-90% dos isolados vaginais de pacientes pertencem à espécie *C. albicans*, os restantes pertencem a espécies NAC: *C. glabrata* (5% - 10%), *C. tropicalis* (3% -5%), *C. parapsilosis* (3% - 5%) e *C. krusei* (1% -3%) [14]. Este fungo constitui uma parte integrante da microbiota humana que, em condições normais colonizam assintomaticamente vários nichos hospedeiros como a pele, a cavidade oral, o trato gastrointestinal e urogenital que diferem na disponibilidade de nutrientes, pH e níveis de CO₂. Desenvolvem-se normalmente como organismos comensais inofensivos na microbiota das membranas mucosas, no entanto, a sua capacidade de adaptação a diferentes microambientes locais do hospedeiro é uma indicação do seu comensalismo em humanos e também uma característica importante da sua patogenicidade [6], [15], [16]. As infecções provocadas pelos fungos do género *Candida* são consideradas oportunistas, pois para se desenvolver o quadro patológico tais microrganismos carecem de alterações locais na vagina bem como alterações sistémicas do hospedeiro. Fatores que viabilizem um ambiente vaginal como pH reduzido, geralmente abaixo de 4,5, consequente de um acréscimo da quantidade de glicogénio, principalmente no período pré-menstrual, são condições favoráveis para o crescimento de *Candida*. A proliferação de *Candida* spp. tem como natural consequência o desequilíbrio entre *Candida* e os mecanismos de defesa contra *Candida*, observando-se assim um agente patogénico oportunista com a capacidade de proliferar, atravessar barreiras epiteliais e causar infecção [15]–[17]. Infecções por *Candida* são maioritariamente superficiais, mas em doentes imunocomprometidos ou com fatores de risco associados, podem-se desencadear infecções sistémicas graves [5], [18].

O processo infeccioso seja por *Candida* ou qualquer outro agente patogénico microbiano engloba algumas etapas básicas como (1) contato e aderência ao tecido hospedeiro, (2) invasão do tecido hospedeiro, (3) multiplicação, colonização e disseminação nos tecidos e (4) evasão do sistema imunológico e danos nos tecidos. A primeira etapa de contato e aderência ao tecido hospedeiro ocorre quando os seres humanos são expostos a *C. albicans* ao passar pelo canal vaginal durante o parto. Neste curso *C. albicans* coloniza as partes superiores e inferiores do trato gastro intestinal do recém-nascido a partir da cavidade bucal onde se torna comensal. Posteriormente, de modo que a *C. albicans* se adapte e prolifere nos diferentes nichos, rápidas adaptações primordiais são necessárias [5].

Os fungos respondem à mudança em componente ambiental específico através da indução de mudanças transcricionais e translacionais que promovem a sua sobrevivência nas mais novas condições ambientais. É necessário ter em conta que a maioria dos fungos patogénicos possuem um metabolismo extremamente versátil que permite a sua adaptação imediata às mudanças no ambiente, e *Candida* spp. não é exceção [5]. Por fim, a etapa de disseminação de *Candida* no hospedeiro é naturalmente facilitada se neste existirem graves distúrbios imunológicos [5].

De acordo com o agente causal, apresentação clínica e resposta ao tratamento, as infeções vulvovaginais por *Candida* spp. podem ser classificadas em dois grupos: casos não complicados e casos complicados. Os primeiros são caracterizados por menos de quatro episódios por ano com gravidade leve a moderada provocada maioritariamente por *Candida albicans*. Por outro lado, casos complicados são caracterizados por um acréscimo de episódios, designada por Candidose Vulvovaginal Recorrente (CVVR) ou Recidivante, que podem ser ainda sub-classificadas como reinfeção, quando causada pelo mesmo agente do episódio anterior e como nova infeção quando causada por uma estirpe diferente [6], [19].

À semelhança da infeção CVV, a CVVR afeta negativamente a qualidade de vida, saúde mental e atividade sexual de muitas mulheres; é uma doença debilitante de longo prazo com verdadeiros impactos negativos. A gravidade dos sintomas em mulheres com CVVR varia de moderada a grave, mas invariavelmente afeta a qualidade de vida das mulheres. Não existem diferenças de diagnóstico na prática clínica de CVV e CVVR, geralmente as pacientes são tratadas apenas com base nos sinais e sintomas apresentados. A CVVR pode ser controlada por terapia antifúngica supressiva de longo prazo, mas a cura é geralmente evasiva. A terapia supressiva em pacientes CVVR fornece resolução completa dos sintomas durante o tratamento, após a suspensão da terapia, a maioria das pacientes apresentam episódios ocasionais [19].

A vaginite provocada por espécies NAC é indistinguível clinicamente das vaginites causadas por *C. albicans*, tipicamente as espécies NAC são frequentemente mais resistentes ao tratamento. *C. glabrata* é frequentemente o agente etiológico de CVVR [20]. Apesar da patogenicidade desta condição debilitante (CVVR) ser pouco compreendida, alguns fatores de risco acrescidos são bem conhecidos como por exemplo: gravidez, diabetes descontrolada e imunossupressão [18],[19]. Na tabela 1 encontra-se sumariada a classificação clínica de CVV e CVVR.

Tabela 1 - Classificação Clínica de Candidose Vulvovaginal. (a) Pacientes com todas estas características são considerados casos não complicados (b) Pacientes com qualquer uma destas características são considerados casos complicados. Adaptado de [18].

Característica	Casos Não Complicados^(a)	Casos Complicados^(b)
Gravidade	Leve ou Moderada e	Severa ou
Frequência	Esporádica e	Recorrente ou
Organismo	<i>C. albicans</i> e	Non <i>albicans</i> <i>Candida</i> ou
Hospedeiro	Normal	Anormal, (sistema imunitário comprometido ou diabetes <i>mellitus</i> não controlada)

Yano *et al.*, (2019), referem que aproximadamente 70% de todas as mulheres terão pelo menos um episódio de CVV durante os seus anos reprodutivos [13].

Os sintomas clínicos de CVV são não específicos e podem ser associados a uma variedade de outras doenças vaginais como gonorreia, tricomoníose ou bacteriose vaginal (BV) [18], [21]. Assim CVV define-se sintomaticamente pela evidência de sintomas de inflamação na presença de espécies de *Candida* e na ausência de outros agentes infecciosos. Deste modo o diagnóstico de CVV requer uma correlação com dados clínicos e confirmação laboratorial de *Candida* [18]. Os sinais / sintomas de CVV são tipicamente caracterizados por corrimento vaginal aquoso branco ou “semelhante a queijo coalhado”, ardor, vermelhidão e prurido na vulva e vagina e dispareunia [13], [22]. CVV pode ser também acompanhada por alterações no odor vaginal [22].

Segundo a literatura, não existem evidências de um fator como causa primária para o aparecimento de CVV. Existem diversos fatores endógenos e exógenos inerentes ao hospedeiro que são associados à recorrência de episódios de infecção por *Candida*. Os fatores de risco relacionados ao hospedeiro incluem gravidez, reposição hormonal, diabetes *mellitus* não controlada, imunossupressão, uso de antibióticos e predisposições genéticas. Por outro lado, os fatores de risco comportamentais incluem o uso de anticoncepcionais orais, dispositivo intrauterino com cobre, espermicidas / preservativos e alguns hábitos do quotidiano tais como: sexuais, higiénicos e de vestuário [18], [22]. Outros fatores justificativos da reinfeção vaginal têm por base que, após a terapia aplicada as células de levedura não são totalmente eliminadas do trato genital inferior. Uma pequena porção microbiana persiste nas secreções vaginais e dados os seus mínimos números, a sua deteção em culturas de esfregaços vaginais não é fácil. Também é aceitável o facto de um pequeno número de células de *Candida* poder persistir temporariamente dentro das células da mucosa vaginal ou cervical superficial. Estas células “residuais” em condições favoráveis multiplicam-se e resulta na recorrência dos sintomas algumas semanas ou meses depois [14].

2.1.2 Epidemiologia

Micose é o nome genérico dado a infecções causadas por fungos. A biodiversidade do reino *Fungi* estima incluir 1,5 milhões de espécies onde, menos de 150 a 200 espécies podem causar doenças em humanos. As infecções fúngicas como a candidose estão intrinsecamente relacionadas com os avanços na área da saúde, portanto, não é surpreendente que a sua incidência crescente seja paralela aos avanços da tecnologia no campo da saúde. Por conseguinte, desde o início dos anos 90 o número de episódios de septicemia causada por fungos tem aumentado. As infecções fúngicas tornaram-se assim um problema crescente na assistência médica moderna [10], [11], [23].

As infecções causadas por *Candida*, sejam episódicas (CVV) ou recorrentes (CVVR) são as principais causas de morbidade e mortalidade a nível global com uma tendência crescente [10]. Apenas cinco espécies de *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei*) são responsáveis por 92% de todos os casos de infecção diagnosticados, contudo, a sua frequência relativa varia conforme a população envolvida, região geográfica, exposição anterior a agentes antifúngicos e idade dos pacientes. *Candida albicans* é a espécie, mais frequentemente isolada em todo o mundo, é detetada em cerca de 38-70% dos casos; segue-se a *Candida glabrata* sendo esta a segunda ou a terceira espécie mais frequentemente isolada em casos clínicos nos Estados Unidos da América e Europa. *C. glabrata* é particularmente frequente em pacientes idosos e pacientes com cancro previamente expostos a azóis e equinocandinas. *Candida parapsilosis* é o por outro lado predominante em recém-nascidos na América do Sul, sul da Europa e Ásia [10], [11].

Em estudos epidemiológicos de CVV publicados durante os últimos anos (2003 a 2014), foram relatadas incidências de infecção que variaram de 12,1% a 57,3%. Presente nestes estudos epidemiológicos as maiores taxas de incidência foram reportadas em países africanos, nomeadamente Nigéria (57,3%) e Tunísia (48%), seguidamente, Brasil (47,9%) e Austrália (45,7%). De forma díspar, as menores taxas de infecção foram reportadas em países europeus, nomeadamente Grécia (12,1%) e Itália (19,5%), seguidos da Índia (20,4%). Complementarmente, os estudos epidemiológicos de um espaço temporal de uma década foram consensuais em constatar maior incidência de CVV em mulheres no período reprodutivo (20 - 40 anos de idade) [18].

Tabela 2 - Estudos epidemiológicos publicados de 2003 a 2014 relativos à distribuição de *Candida* spp. em mulheres com CVV. Adaptado de [18].

País	Ano(s) de Estudo	Nº de Indivíduos	C. <i>albicans</i> (%)	C. <i>glabrata</i> (%)	C. <i>tropicalis</i> (%)	C. <i>parapsilosis</i> (%)	C. <i>krusei</i> (%)
USA	1998-2001	429	75,70	15,60	1,10	3,80	3,80
Jamaica	–	125	83,20	4,80	11,20	–	–
Brasil	2001-2003	40	70,00	20,00	7,50	–	–
Itália	1999-2001	909	77,10	14,60	2,30	0,60	4,00
Eslováquia	2000-2001	227	87,70	6,20	0,90	0,90	2,20
Áustria	2000-2004	3243	87,90	3,40	0,20	0,50	0,30
Grécia	2002-2004	576	80,20	7,30	1,60	2,10	1,00
Turquia	2004-2005	240	44,20	29,60	–	–	5,80
Índia	2003-2004	111	35,10	50,40	10,80	0,90	2,70
Índia	–	215	46,90	36,70	2,80	10,20	1,40
China	2003-2006	1070	90,40	7,90	0,90	0,60	0,10
Irão	2006-2008	175	65,10	13,10	6,20	0,60	4,00
Tunísia	2006-2008	295	76,30	19,30	1,40	–	–
Nigéria	–	517	20,30	33,80	17,90	4,30	–
Austrália	2000	1221	89,00	7,30	0,70	1,00	1,00

Em Portugal, apesar dos dados epidemiológicos serem escassos, um estudo multicêntrico realizado em 2010 – 2011, publicado em 2017 que tinha como objetivo estimar as doenças fúngicas a nível nacional constatou que analogamente ao cenário global a segunda infecção mais comum é a CVVR, com uma incidência anual de aproximadamente 2 854 casos por 100 000 mulheres portuguesas, tendo sido estes resultados semelhantes à incidência dos estudos europeus. Adicionalmente no mesmo estudo foi estimada a frequência relativa de espécies de *Candida*, tendo sido *C. albicans* a mais prevalente (40%), seguida por *C. parapsilosis* (23%), e *C. glabrata* (13%) [24].

2.1.3 Diagnóstico

Quanto mais rápido e de modo assertivo uma infecção for identificada e avaliada, maior a probabilidade de sucesso para a sua erradicação e conseqüentemente mais vantajoso será para o paciente [3]. Contudo os diagnósticos clínicos não são devesas os mais assertivos e fáceis de realizar devido a diversos fatores. Por exemplo, relativamente à saúde do trato genital feminino, existe uma variedade de outras patologias vaginais para além da CVV. A vaginite é um dos problemas mais frequentes em medicina clínica e conseqüentemente é a principal razão pela qual a maior parte das mulheres procuram apoio médico tendo como principal sintoma o corrimento vaginal excessivo ou alterado. As principais categorias de vaginite consistem em bacteriose vaginal (BV), vaginite por fungos (candidose) e vaginite por *Trichomonas vaginalis* (tricomoníose). Os sinais/sintomas são geralmente transversais às diferentes causas de vaginite/vaginose sendo os mais frequentes: o corrimento vaginal excessivo, comichão vulvar, fissuras, dor, eritema, edema, dispareunia e lesões cutâneas. O conjunto de sinais/ sintomas clínicos variados e não específicos de cada categoria de vaginite dificulta o diagnóstico e pode conseqüentemente conduzir a um diagnóstico pouco assertivo ou até incorreto [25].

Em casos de BV verifica-se um decréscimo do número normal de *Lactobacillus* e proliferação de: *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis* e outros microrganismos anaeróbios. A abordagem diagnóstica padrão confiável para a BV assenta nos critérios de Amsel (secreção leitosa homogénea aderente, pH vaginal >4.5; teste de odor positivo; e presença de células indicadoras no fluído vaginal visualizadas sob microscopia), se três dos quatro critérios forem detetados, a probabilidade de se se tratar de BV é de aproximadamente 90% [25].

Em casos de tricomoníose, é uma infecção causada por *Trichomonas vaginalis*, é altamente transmissível e está associada outras doenças sexualmente transmissíveis (DSTs). A infecção é geralmente caracterizada por irritação vaginal e por secreções espumosas acompanhadas por odor. A abordagem diagnóstica assenta geralmente na examinação microscópica direta das secreções vaginais, contudo se desta persistirem suspeitas, testes de cultura vaginal em meio especializado visando confirmar ou descartar infecção por *T. vaginalis* são necessários [25].

Adicionalmente, um fator que pode dificultar o diagnóstico clínico é a possibilidade de ocorrência de infeções mistas. Não raramente, dois processos patológicos podem coexistir (por exemplo, bacterianos e fúngicos por *Candida*). Deste modo o diagnóstico de CVV requer uma correlação com dados clínicos e confirmação laboratorial precisa [18], [26], [27]. Porém nem todos os testes realizados a nível laboratorial são suficientemente sensíveis e específicos, Khan, Z. e Mustafa, A. (2001), referiram que pacientes com infeções invasivas extensas por *Candida* em órgãos viscerais frequentemente apresentaram hemoculturas negativas em casos de candidose invasiva comprovados por autopsia [21].

Em suma, é descrito na literatura uma necessidade urgente de meios de diagnóstico assertivos para identificação do agente patogénico causador de infeção. Nomeadamente Landers, D. *et al.*, (2004), conjecturaram que as abordagens diagnósticas para infeção do trato genital inferior são imprecisas e propõem no estudo uma avaliação das abordagens típicas clínicas [28]. Os dados presentes no estudo apoiaram a hipótese de que o diagnóstico presuntivo de infeções do trato genital inferior feminino conduz a um número significativo de pacientes erroneamente diagnosticadas. A falta de testes de confirmação de qualquer tipo, pode levar a suposições incorretas de que há resistência ou reinfeção, quando o diagnóstico incorreto é o problema [28].

2.1.4 Diagnóstico Clínico

O diagnóstico clínico é o processo elementar que antecede o processo terapêutico. Em casos de suspeita de CVV é um passo crucial devido à sintomatologia não específica de CVV e pelo facto de existirem várias patologias associadas à vagina e à vulva, como as que já foram referidas anteriormente.

É necessário que o profissional de saúde realize uma anamnese adequada para além do exame físico. Sobel *et al.*, (1998), com uma visão semelhante acrescentam ainda que, “um diagnóstico confiável não pode ser feito com base na história e no exame físico sem a evidência corroborativa de testes laboratoriais” [27].

Um exame físico geral é um procedimento útil que fornece amplas indicações sobre a saúde geral do paciente, estado nutricional e saúde da pele. Outros indicadores importantes para a orientação do tratamento são a idade, o peso e hábitos corporais. A próxima etapa de avaliação do paciente é o exame físico vaginal. A inspeção cuidadosa da vulva e da abertura vaginal (intróito vaginal) é fundamental para detetar irritação e escoriação. O exame especular evidencia o corrimento branco e grumoso aderido às paredes vaginais e do colo [29]. Complementarmente podem ser realizados outros exames, tais como a análise do pH vaginal; uma medida de pH mais básico sugere bacteriose vaginal e tricomoníose que geralmente se desenvolvem em pH entre 5 e 6, já *Candida spp.* geralmente desenvolve-se em pH entre 4 e 4,5 [29].

Exame a Fresco ou Microscopia Direta com o uso de solução salina são um complemento no diagnóstico pois permite a visualização microscópica do esfregaço vaginal confirmando a presença de leveduras e/ou blastóporos ou pseudo-hifas, sensibilidade de 40-60% [27], [30]. O Exame de Microscopia Direta com a adição de KOH a 10% tem como base o mesmo princípio, contudo, este possui uma maior sensibilidade na identificação de fungos [27].

Um outro procedimento extremamente valioso no diagnóstico clínico é a execução de culturas vaginais para leveduras, mas que não são rotineiramente exigidas no diagnóstico de CVV a menos que haja suspeita de um organismo resistente [27].

2.1.5 Diagnóstico Laboratorial

Analogamente ao Diagnóstico Clínico, o Diagnóstico Laboratorial assume um papel essencial no diagnóstico de CVV. Atualmente nos laboratórios de microbiologia é possível realizar diversas técnicas que permitem uma identificação assertiva do agente causador de infecção através de combinação de testes serológicos, histológicos e moleculares visando o melhor diagnóstico possível. Diversas técnicas usadas no diagnóstico laboratorial são transversais às técnicas usadas no meio de diagnóstico clínico, nomeadamente técnicas de observação microscópica. Contudo existem outras técnicas possíveis, tais como as seguintes mencionadas:

Método de Cultura

Os meios de cultura têm um papel fundamental em microbiologia dado que possuem componentes que visam satisfazer as condições ideais para determinado microrganismo crescer, como nutrientes ou fatores de crescimento específicos. Os meios de cultura básicos usados tipicamente no isolamento de *Candida* spp. são: *Blood Agar*, *Potato Dextrose Agar* (PDA), *Yeast Extract Peptone Dextrose* (YPD), *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) entre outros [31]. Um dos meios mais comumente usado para o isolamento de espécies de *Candida* é o meio sólido SDA, neste *Candida* spp. crescem prontamente enquanto o crescimento de algumas bactérias é suprimido devido ao seu baixo pH. Este método relativamente simples consiste no espalhamento de material biológico recolhido da área afetada do paciente e a sua sementeira sob a forma de estrias em SDA, por exemplo; seguida de incubação a 37°C por alguns dias para possível desenvolvimento de colónias. Após o crescimento de colónias, estas podem ser caracterizadas a diferentes níveis [31], [32].

Meios cromogénicos (*Candida ID*, *CHROMagar Candida*, *Candiselect*) permitem a identificação rápida de espécies de *Candida*. Os substratos cromogénicos presentes são hidrolisados por enzimas secretadas pelas leveduras de *Candida*. As diferentes enzimas conferem características particulares às colónias (pigmentações que são específicas da espécie) permitindo a fácil identificação de *Candida* spp. [31]–[33].

Microscopia

Um dos métodos incluídos na microscopia é por exemplo o teste do tubo germinativo. É um teste relativamente simples e um procedimento extremamente eficiente que permite diferenciar *C. albicans* de outras espécies *Candida*: se *C. albicans* estiver presente, estruturas curtas não septadas, delgadas em forma de tubo podem ser observadas ao microscópio. Uma possível desvantagem é o facto de em alguns relatórios terem sido reportados que algumas espécies NAC, como *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* poderem também produzir estruturas semelhantes como tubo germinativo ou pseudo-hifas, conduzindo a erros de identificação se apenas testes superficiais forem realizados [31], [34].

Ainda relativamente a técnicas de microscopia, vários testes de coloração podem ser instituídos. As técnicas frequentemente usadas de coloração são a de Gram e a de Giemsa, ambas de rotina de identificação de microrganismos. A presença de leveduras em amostras pode ser reconhecida inicialmente pela técnica de Gram, contudo não é uma ferramenta de diferenciação como por exemplo na diferenciação bacteriana que permite a classificação como Gram – positiva ou Gram – negativa [34].

Identificação Bioquímica de *Candida* spp.

Devido à possível subjetividade na identificação fenotípica de culturas em meio de ágar e microscopia, os testes bioquímicos automatizados são realizados rotineiramente para uma identificação mais precisa num espaço temporal de horas [31]. É atualmente possível aplicar abordagens especializadas baseadas em instrumentos automatizados como por exemplo o sistema VITEK. Este sistema permite identificar espécies de *Candida* sensivelmente em 18 h [31], [34]. Consiste em um cartão de plástico descartável de 30 poços (em gerações mais primitivas) e 64 poços (em gerações mais atuais) como o caso do sistema VITEK 2 e ID-YST, onde cada poço contém um substrato de teste individual. Os substratos medem várias atividades metabólicas, como acidificação, alcalinização, hidrólise enzimática e crescimento na presença de substâncias inibidoras, entre outras reações bioquímicas [34].

Atualmente existem quatro tipo de cartões de reagentes para a identificação de diferentes classes de organismos:

1. **GN** - Bacilos Gram-negativos fermentadores e não fermentadores;
2. **GP** - Coccus Gram-positivos e bacilos não formadores de esporos;
3. **YST** - Leveduras e organismos semelhantes a leveduras;
4. **BCL** - Bacilos formadores de esporos Gram-positivos;

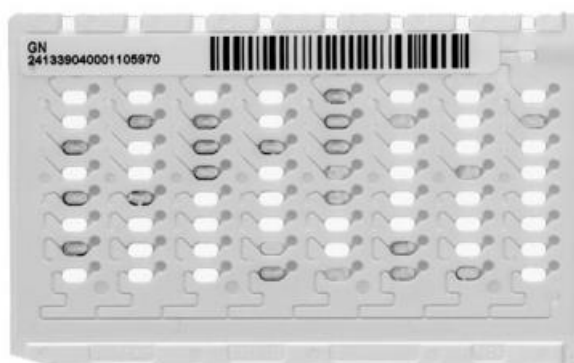


Figura 2 - Cartão de Reagentes VITEK 2 GN

Este sistema tem como vantagens: a inoculação automatizada de substratos com a mesma suspensão de cada isolado, eliminação da variabilidade do teste, capacidade de realização de diversos testes bioquímicos em simultâneo dos mesmos inóculos, bem como as taxas gerais de identificação correta variarem de 83-98%. Em contrapartida, é necessário um grande inóculo e o uso de culturas com menos de 24 horas, caso contrário, resultados duvidosos são mais prováveis [34].

2.1.6 Diagnóstico Molecular

Nos últimos anos decorre o incremento de técnicas que permitem a obtenção, manipulação e análise do ácido desoxirribonucleico (DNA) de qualquer espécie. É uma área fundamental para o entendimento da genética dos organismos, nomeadamente dos organismos de escala micro. O diagnóstico molecular baseia-se em técnicas consagradas da biologia molecular como por exemplo a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e as suas variações visando a investigação de alvos de interesse a partir da análise do material genético, o DNA e o RNA.

Atualmente, diversos métodos de PCR estão amplamente disponíveis para detetar a presença do género *Candida*, bem como a determinação de espécies específicas. Os métodos de PCR são indubitavelmente mais sensíveis do que a metodologia tradicional de cultura assim como os outros testes laboratoriais já descritos, que carecem de sensibilidade e especificidade. Não obstante, apesar da sua sensibilidade acrescida, este método pode não acarretar outra qualquer vantagem na prática clínica devido aos resultados razoavelmente sensíveis dentro de várias horas assim como o custo económico elevado associado [12], [21].

O método de PCR específico para a deteção de *Candida* spp. baseia-se na estratégia de utilizar *primers* específicos capazes de amplificar fragmentos de DNA, como por exemplo os *primers* ZU5/ZU6 que têm como alvo de amplificação o gene que codifica o Citocromo P450 L₁A₁, lanosterol 14 α -desmetilase. Este gene é essencial para a sobrevivência de *Candida* pois catalisa uma etapa essencial na conversão de lanosterol em ergosterol, um constituinte essencial à membrana celular. Dado que células humanas e bacterianas não possuem um gene homólogo a P450 L₁A₁, não existe qualquer tipo de possibilidade de falsa amplificação ou falsa sinalização positiva em amostras de origem humana, no entanto a disponibilidade de DNA na circulação sanguínea das células de levedura é um requisito essencial para que uma amplificação ocorra em um teste de PCR [21].

2.1.7 Tratamento

Idealmente antes de qualquer tratamento antifúngico ser instituído, um diagnóstico micológico assertivo da infecção deve ser efetuado invés de prescrição antifúngica considerando a possível melhora clínica como prova etiológica fúngica [35].

O tratamento para a candidose baseia-se no local anatômico da infecção, estado do sistema imunitário, fatores de risco do paciente, espécies responsáveis pela infecção e a sua resistência a agentes antifúngicos. A classificação de agentes antifúngicos primários usados para o tratamento de candidose é fornecida a seguir:

- A. Polienos: Anfotericina B.
- B. Análogo da pirimidina: Flucitosina.
- C. Azóis: Fluconazol, Itraconazol, Voriconazol, Ravuconazol, Posaconazol, Cetoconazol.
- D. Equinocandinas: Caspofungina, Anidulafungina, Micafungina

Polienos, azóis e equinocandinas dispõem de diferentes mecanismos de ação bem como diferentes alvos de atuação, estes atuam na membrana ou parede celular, como representado na figura 3. Em contraste, agentes antifúngicos como a flucitosina atuam na síntese de DNA/RNA tendo como mecanismo base a inibição da divisão celular [32], [36].

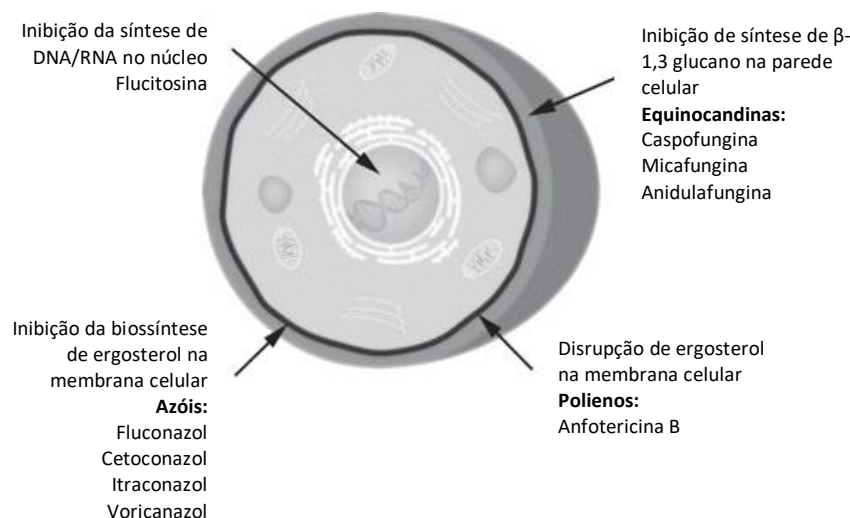


Figura 3 - Alvos de medicamentos antifúngicos na parede, membrana e núcleo das células fúngicas. Adaptado de [37].

Nos últimos 35 anos, os compostos azólicos tiveram e ainda têm um impacto significativo no tratamento de infecções fúngicas. Existem dois grupos em uso clínico: imidazóis (cetoconazol, miconazol e clotrimazol) com uso limitado para o tratamento de micoses superficiais; e triazóis (fluconazol, itraconazol, voriconazol e posaconazol) desenvolvidos de modo a atender uma ampla gama de aplicações [38]. Com foco no fluconazol, este é um dos azóis mais comumente usado na prática clínica, tem amplo espectro de ação que inclui espécies de *Candida*, *Cryptococcus* entre outras. É ativo contra *Candida albicans*, mas estirpes de *Candida krusei* e *Candida glabrata* são menos sensíveis ou mesmo resistentes [39], [40].

A enzima dependente do citocromo P 450, lanosterol 14- α -desmetilase é necessária para a conversão do lanosterol em ergosterol, um componente vital da membrana celular dos fungos que lhe confere flexibilidade e estabilidade. O fluconazol atua mediante a inibição da enzima lanosterol 14- α -desmetilase no complexo citocromo P-450 dos fungos. O resultado é a inibição da via biossintética de ergosterol interrompendo a conversão de lanosterol em ergosterol. Assim a depleção de ergosterol conduz à acumulação de precursores tóxicos e desencadeia rutura celular fúngica [32], [36], [38]–[40].

De acordo com a base de dados do INFARMED alguns dos medicamentos disponíveis em Portugal tendo como substância ativa o fluconazol encontram-se listados a seguir:

- Diflucan, cápsula 50/100/150/200 mg por dia;
- Diflucan, pó para suspensão oral 10 mg/mL ou 40mg/mL por dia;
- Fluconazol Alter^{MG}, cápsula 50/150/200 mg por dia;
- Fluconazol Basi ^{MG}, solução para perfusão 2mg/mL.

O fluconazol pode ser administrado por via oral particularmente na terapêutica de manutenção a longo prazo. Via intravenosa/parenteral é uma forma de administração geralmente reservada para casos de Candidose graves [40].

Como referido na secção de Epidemiologia, apesar de *C. albicans* ser o agente mais frequentemente isolado, tem-se registado uma taxa crescente de infeções provocadas por NAC nas últimas décadas [41]. O aumento de infeções por estas espécies assenta na administração profilática e empírica de medicamentos antifúngicos, nomeadamente de compostos azólicos devido à facilidade de uso e amplo espetro [40], [41].

O desenvolvimento de resistência aos agentes antifúngicos usados nas infeções por *Candida* é um problema sério e surge assim uma necessidade crescente de testes de suscetibilidade antifúngica *in vitro* para escolher o agente antifúngico mais adequado e eficaz [41]. Na tabela 3 está representado o perfil de MIC (do inglês – Concentração Mínima Inibitória) de fluconazol para cada uma das 12 espécies diferentes de *Candida* (13.338 isolados). Os resultados apresentados foram determinados num único laboratório de referência (University of Iowa) pelo Broth Microdilution Method (BMD) do Comité Europeu de Teste de Suscetibilidade Antimicrobiana recomendado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [39].

Tabela 3 - Suscetibilidade de isolados de *Candida* de infecções da corrente sanguínea ao fluconazol por MIC. Programa Global de Vigilância Antifúngica, 1992–2004. Adaptada de [38].

Organismo	Nº de testados	% Cumulativa em MIC ($\mu\text{g} / \text{mL}$) de ^a :									% R ^b
		0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	
<i>C. albicans</i>	7,725	27	84	94	97	98	98	99	99	>99	0,06
<i>C. glabrata</i>	1,966	<1	<1	<1	1	10	34	62	87	91	9
<i>C. parapsilosis</i>	1,623	<1	10	49	79	92	96	97	99	>99	0,5
<i>C. tropicalis</i>	1,253	2	21	52	78	94	97	98	98	98	2
<i>C. krusei</i>	312						<1	3	13	60	40
<i>C. lusitanae</i>	134	4	37	69	85	93	96	97	98	99	1
<i>C. dubliniensis</i>	103	45	83	86	87	87	87	91	93	97	3
<i>C. guilliermondii</i>	92		1	2	5	40	74	90	96	97	3
<i>C. pelliculosa</i>	34					18	79	100			0
<i>C. kefyr</i>	33	12	61	94	100	100					0
<i>C. famata</i>	19		5	21	37	42	63	74	100		0
<i>C. rugosa</i>	19	68	79	79	79	79	100				0
Total <i>Candida</i> spp.	13,338										

^a MICs de microdiluição em caldo determinados de acordo com CLSI M27-A2.

^b % R, percentagem de resistência a um MIC de 64 $\mu\text{g} / \text{mL}$.

A MIC no qual 90% dos isolados foram inibidos (MIC₉₀) foi com uma concentração de 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de fluconazol em 91% dos 13.338 isolados testados. A MIC₉₀ foi mais elevado para espécies NAC, nomeadamente *C. krusei* (MIC>64 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e *C. glabrata* (MIC 32 $\mu\text{g} / \text{mL}$); e ≤ 2 para *C. parapsilosis* (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), *C. lusitanae* (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e *C. kefyr* (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), *C. albicans* apresentou MIC de (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) [39].

2.2 *Rhodotorula* spp.

Rhodotorula é um género omnipresente na natureza [42]–[45]. Espécies deste género estão amplamente difundidas e podem ser isoladas de uma variedade de fontes que incluem: ar, solo, lagos e mares oceânicos, plantas, produtos alimentares, ambiente doméstico (principalmente em casas de banho: frequentes na argamassa da banheira, cortinas de duche e escovas dentárias); dotadas de afinidade por materiais plásticos são frequentemente isoladas de dispositivos médicos como cateteres e equipamentos odontológicos onde podem produzir biofilmes [42], [44], [45]. No corpo humano, estes microrganismos podem ser isolados através de culturas de pele, unhas, trato respiratório, trato gastrointestinal e urogenital [44].

Microbiologicamente, a maioria das espécies de *Rhodotorula* produzem colónias pigmentadas que variam de cor rosa a coral, bem como cor de cor de laranja a vermelho em meio de cultura SDA. A pigmentação característica destas leveduras resulta na síntese natural de carotenoides; descrito na literatura, os pigmentos produzidos podem conferir resistência/proteção a diversos stresses externos, como por exemplo o dano causado pela luz [44], [46]–[48]. São microrganismos nutricionalmente não fastidiosos e crescem facilmente na maioria dos meios de cultura, inclusive são caracterizados pela sua rápida taxa de crescimento [44], [46]. *Rhodotorula* spp. possuem a capacidade de crescer em temperaturas mínimas estimadas entre 0.5 e 5°C; e temperaturas máximas próximas de 35°C; contudo a temperatura ótima de crescimento é compreendida entre os 22°C e 28°C, valores externos a este intervalo limitam a taxa de multiplicação destes microrganismos [45], [46]. *Rhodotorula* spp. são capazes de sobreviver em ambientes de cariz ácido (pH mínimo de 2.2) na presença de ácido clorídrico (HCl) ou de ácidos orgânicos [46]. A capacidade de crescerem e sobreviverem em condições ambientes e nutricionais tão variáveis é a justificativa da sua ampla distribuição.

Segundo a base de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e em concordância com alguns dados da literatura, as espécies *R. glutinis* e *R. mucilaginosa* enquadram-se taxonomicamente na família *Sporidiobolaceae* [48]–[50], ordem *Sporidiobolales* [51], filo *Basidiomycota* [4], [48]–[52] do reino *Fungi* [4], [48]–[51]. Atualmente, apesar de estarem descritas diversas espécies do género *Rhodotorula*, apenas três espécies são reconhecidas por causar doença em humanos, onde se destacam *R. mucilaginosa*, *R. glutinis* e *R. minuta* [4], [49], [52].

Rhodotorula mucilaginosa previamente conhecida como *Rhodotorula rubra*, designação ainda usada na literatura médica, possui uma distribuição global e pode ser isolada de uma ampla variedade de substratos, inclusive de fontes humanas. Esta espécie é então uma das mais, senão, a mais onipresente levedura *basidiomycota*. Microscopicamente apresenta forma elipsoide ou ovoide. Reproduzem-se assexuadamente por gemulação predominantemente polar.

Leveduras pigmentadas, nas quais o pigmento varia de laranja a coral, brilhante (ocasionalmente opaco), mucoide normalmente liso, mas ocasionalmente rugoso e com margem inteira. Pseudo-hifas são geralmente ausentes ou pouco desenvolvidas e consistem em cadeias de células alongadas [51].

Rhodotorula glutinis considerada como uma levedura ubíqua, semelhantemente a outras espécies do gênero *Rhodotorula*, possui uma grande distribuição, contudo menor que *R. mucilaginosa*. Microscopicamente apresenta diferentes formas, tais como: ovoide ou cilíndrica a fusiforme. Reproduz-se assexuadamente por gemulação. Leveduras pigmentadas, nas quais o pigmento varia de vermelho coral a salmão ou levemente laranja, geralmente com aspeto mucoso enrugado brilhante com finas estrias transversais e com margem inteira, com elevação plana a convexa. Pseudo-hifas são geralmente ausentes ou pouco desenvolvidas [51].

Rhodotorula spp. quando coradas em preparação da tinta-da-china ou em coloração *Gram* podem apresentar uma cápsula ténue formada, nomeadamente *R. mucilaginosa* [44], [51], [53], [54]. Particularmente no trabalho desenvolvido por Gharaghani *et al.*, (2020), luliconazol (um novo imidazol antifúngico) demonstrou-se ineficaz face a *Rhodotorula*, onde a presença de cápsula foi considerado como fator de virulência e pode estar intrinsecamente relacionado com a resistência face a compostos azólicos [54].

Previamente considerado como contaminante de laboratório e/ou como um organismo de baixa virulência não patogénico, *R. mucilaginosa*; *R. glutinis* e *R. minuta* têm sido progressivamente reconhecidas como agentes patogénicos oportunistas capazes de causar infeções invasivas graves e até fatais, particularmente em pacientes imunocomprometidos ou indivíduos que tenham uma doença base [52], [55], [56].

2.2.1 Infecção por *Rhodotorula* spp.

O aprimoramento e desenvolvimento de técnicas usadas em meio clínico referentes a diagnóstico (clínico ou laboratorial) bem como a terapia medicamentosa aplicada têm permitido o aumento da esperança média de vida da população. Paralelamente, as incidências de infecções nosocomiais têm aumentado drasticamente [57]. O crescente número de infecções tem sido então atribuído a avanços na medicina moderna, modalidades como transplante de órgãos, dispositivos de monitorização invasivos, nutrição parenteral, agentes antimicrobianos de amplo espectro, agentes terapêuticos agressivos como outras quaisquer modalidades que visem prolongar a esperança média vida humana são estas também que expõem os pacientes a diversos microrganismos elevando o risco de infecção [52], [57]. Assim sendo, a epidemiologia de infecções invasivas sofreu drásticas mudanças em termos de infecções fúngicas em populações imunossuprimidas, onde na literatura se descreve um número significativo de infecções fúngicas sistêmicas. Um exemplo expressivo do referido anteriormente é que por exemplo no período de 1970 até 1985 não se registou qualquer infecção por *Rhodotorula* em pacientes hematológicos, contudo o número de casos de fungemia aumentou significativamente depois de 1994, quando cateteres e/ou outros dispositivos intravenosos e terapias intensivas [55] se encontravam amplamente disponíveis [4], [46].

Fungemia, uma condição debilitante caracterizada pela presença de fungos no sangue, tem elevado impacto na morbidade e mortalidade de pacientes afetados, acrescenta-se ainda neste contexto a resistência antifúngica intrínseca face ao tratamento por parte dos agentes etiológicos desta condição que compromete ainda mais as taxas de mortalidade associadas [58], as taxas de mortalidade por fungemia em pacientes hospitalizados variam entre 50% e 80% [57]. *Rhodotorula* spp. é o agente etiológico em 0,5% a 2,3% de todos os casos de fungemia descritos nos Estados Unidos da América e na Europa [4], [49], [52], [56]. A mortalidade em casos de fungemia por *Rhodotorula* é estimada em 12 - 20% [50], [52], [56], [59]. Spader *et al.*, (2019) enfatizam ainda que a taxa de mortalidade devido a fungemia por *Rhodotorula* com a administração de medicamentos como anfotericina B é aproximadamente de 15% [56]. A incidência de fungemia por *Rhodotorula* spp. está frequentemente relacionada com o uso de Cateter Venoso Central (CVC), este é reconhecido como um fator de risco e considerado como uma via de entrada do agente patogénico [60], [61].

Apesar de *Rhodotorula* ser o agente etiológico de fungemia, infecções não sistêmicas de diferentes quadros clínicos de diferentes níveis de complexidade estão descritos; estes variam desde o envolvimento de pele através de lesões superficiais localizadas em hospedeiros imunocomprometidos e imunocompetentes como casos de infecção grave que incluem úlceras, endocardite, peritonite, meningite e endoftalmite [52], [60], [62].

Como referido anteriormente, são diversos os locais nos quais *Rhodotorula* spp. podem ser isoladas; pele, unhas, trato gastrointestinal, trato respiratório e genital; geralmente a colonização destes microrganismos representa colonização inofensiva que pode ser intermitente ou permanente mesmo em indivíduos saudáveis [45], [49], [50], [60]. Um exemplo deste tipo de colonização pode ser por exemplo através de alimentos contaminados, uma vez que é um ecossistema colonizado por este tipo de microrganismos; Herbert Hof., (2019), mencionou que, a ingestão regular de alimentos colonizados por *Rhodotorula* pode levar à colonização intestinal intermitente ou permanente em indivíduos saudáveis, inclusive *Rhodotorula* spp. são relativamente resistentes à bÍlis o que facilita a sua colonização [45]. Suplementarmente, espécies de *Rhodotorula* já foram isoladas a partir de amostras de fezes [60], o que sugere a capacidade de sobrevivência em condições extremas do trato gastrointestinal. Contudo é necessário enfatizar que a colonização transitória não ocorre apenas pelo intestino, mas também por outros locais como por exemplo a pele. Assim, infecções localizadas como na pele, articulações prostéticas, peritonite, não são necessariamente sinónimos de imunossupressão, o isolamento destas leveduras de sítios não estéreis de animais e humanos, especialmente de membranas mucosas não é necessariamente sinonimo de doença [46], [56].

Rhodotorula spp. estão associadas a várias infecções distintas e não existem diferenças relevantes na apresentação clínica das diferentes espécies de *Rhodotorula*; assim no diagnóstico clínico a sintomatologia não apresenta grande relevância pela inespecificidade de sinais/sintomas e semelhança a outros quadros nosocomiais. Este fato dificulta o diagnóstico e posterga o tratamento favorecendo o aumento das taxas de morbimortalidades por infecções do género *Rhodotorula* [44]. Em suma, está descrito que espécies de *Rhodotorula* têm emergido como agentes patogénicos oportunistas, capazes de colonizar e infetar pacientes suscetíveis. A maioria dos casos de infecção são fungémias associadas a cateteres, endocardinites e meningites; infecções não sistémicas como endoftalmites e peritonites têm sido igualmente descritas [4], [52]. Representativo do mencionado, na revisão sistemática da literatura de Tuon, F. e Costa, S. (2008), de 128 casos, fungémia liderou o tipo de infecção por *Rhodotorula* spp., onde foi contabilizada em 103 casos (79%); seguida de infecção ocular com 9 casos (7%) e uma minoria de 6 casos (5%) de peritonite associada a Diálise Peritoneal Contínua Ambulatorial (DPAC). Foram ainda descritos 5 casos de meningite e 1 caso de ventriculite [52].

Em modelos animais, são também diversos os órgãos afetados por este agente patogénico. No primeiro modelo de estudo de disseminação de *Rhodotorula* em animais altamente imunocomprometidos, Fernanda Wirth e Luciano Goldani., (2011), verificaram que a maioria dos órgãos afetados por *R. mucilaginosa* foram os pulmões, baço e principalmente o fígado que apresentava grau severo de infecção; o mesmo se verificou em casos clínicos de indivíduos imunocomprometidos que apresentaram abscessos hepáticos na presença de leveduras de *Rhodotorula* [61].

2.2.2 Diagnóstico e Identificação

O quadro clínico associado as infecções por *Rhodotorula* é geralmente inespecífico devido à associação de *Rhodotorula* a distintas infecções, bem como o facto de existirem diversas condições subjacentes aos pacientes, o que naturalmente dificulta a determinação concisa da fonte de sinais/sintomas possivelmente apresentados [44]. O reconhecimento precoce da possibilidade de infecção fúngica por *Rhodotorula* em pacientes gravemente enfermos é essencial nomeadamente se apresentarem febre com etiologia desconhecida, leucocitose [49], e não tenham qualquer tipo de resposta à terapia antifúngica convencional. De extrema importância é também o histórico clínico dos pacientes, nomeadamente se tiveram algum tipo de acesso intravenoso com ou sem antibióticos, corticosteroides ou medicamentos citotóxicos.

O isolamento de *Rhodotorula* spp. é alcançado, como em muitos outros casos de isolamento de microrganismos: através do recurso a cotonetes húmidos e estéreis. No caso de estudo de Seifi Z. *et al.*, (2013), *Rhodotorula* spp. foram isoladas de várias fontes humanas e não-humanas através deste método [63]. Posteriormente à recolha foram inoculados em placas de SDA que continham cloranfenicol visando aumentar a seletividade [53], [63]. A identificação foi alcançada por sistemas comerciais automatizados, como o sistema comercial BioMerieux ID 32C [63].

Espécies de *Rhodotorula* crescem prontamente em hemoculturas e em qualquer meio adequado para leveduras [44], [53]. Isolados de *Rhodotorula* são frequentemente reconhecíveis em cultura laboratorial pela sua apresentação macroscópica, nomeadamente a pigmentação característica vermelho – laranja das colónias [44], [64]. Na cultura em SDA, as colónias são lisas, às vezes reticuladas, rugosas ou corrugadas e com aparência de leveduras húmidas a mucoides. Microscopicamente, as espécies de *Rhodotorula* na coloração *Gram* apresentam coloração violeta (figura 4); podem apresentar uma cápsula fina na preparação de tinta-da-china [53], células de levedura ovais a alongadas; hifas rudimentares geralmente ausentes e ausência de blastoconídios [64].



Figura 4 - Observação microscópica de leveduras de *Rhodotorula* por coloração de Gram. Adaptado de [64].

No entanto, o género *Rhodotorula* é muito semelhante a *Cryptococcus*, em particular na taxa de crescimento, tamanho e forma celular, possível presença de cápsula e capacidade de hidrolisar ureia[44], [64], o que pode dificultar o diagnóstico de cultura. Características que permitem distinguir espécies do género *Cryptococcus* de *Rhodotorula* é na incapacidade de *Rhodotorula* assimilar inositol e fermentar hidratos de carbono. Analogamente, observações da morfologia são por si só insuficientes para a identificação assertiva de microrganismos, especialmente na presença de leveduras macroscopicamente semelhantes, como por exemplo no caso de leveduras do género *Sporobolomyces* (figura 5 - esquerda) [44].

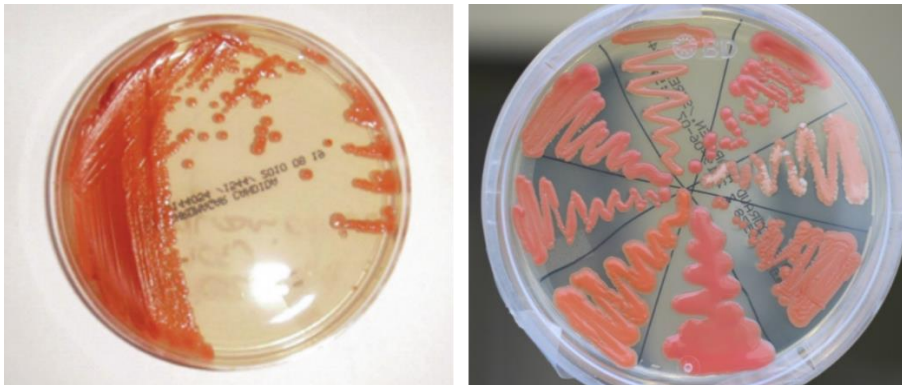


Figura 5 - (À esquerda): Cultura de *Sporobolomyces salmonicolor* Adaptado de [65].(À direita): Aspecto variado de colónias de *Rhodotorula* spp. em cultura. Adaptado de [44].

De acordo com o descrito na literatura as leveduras pigmentadas *Sporobolomyces* podem ser diferenciadas de *Rhodotorula* pelo facto de *Sporobolomyces* formarem blastoconídios, característica ausente em *Rhodotorula* [44], [46], [64]. Outras características/testes adicionais que permitem distinguir leveduras de *Rhodotorula* de outras leveduras clinicamente importantes são por exemplo ausência de fermentação de hidratos de carbono [64], o teste germinativo é negativo, o crescimento em meio de cicloheximida é negativo [53], e *Rhodotorula mucilaginosa* pode ser diferenciada de *Rhodotorula glutinis* pela sua incapacidade de assimilar nitrato [49]. Analogamente à identificação bioquímica de *Candida* spp. vários testes comerciais rápidos e sistemas automatizados foram desenvolvidos, tais como: Vitek e RapID Yeast Plus. Contudo a maioria deste tipo de sistemas de testes de identificação são mais precisos na identificação de microrganismos patogénicos comuns em vez de incomuns, o que constitui uma desvantagem na identificação de microrganismos emergentes cuja incidência seja ainda menor [44]. Uma vez que o tipo de infeção mais comum causada por *Rhodotorula* é a fungémia, o pilar no diagnóstico de *Rhodotorula* spp. invasiva é através de cultura de sangue – hemocultura [64], e dado que CVC é considerado como um fator de risco, uma das metodologias é o cultivo da ponta do cateter quando o acesso é removido de modo a “capturar” *Rhodotorula* ou outro agente de infeção em casos de hemoculturas falsamente negativas [64].

É necessário enfatizar o cuidado ao interpretar os resultados que sugerem infeções causadas por *Rhodotorula* uma vez que são leveduras omnipresentes o que pode conseqüentemente conduzir a incertezas iniciais sobre a origem deste agente, ou seja, se se representa efetivamente de caso de infeção verdadeira ou contaminação no ambiente hospitalar/laboratorial [46], [65].

2.2.3 Diagnóstico Molecular

O uso de métodos moleculares que visam a identificação de organismos baseiam-se no recurso ao material genético (DNA) que define o indivíduo; assim, a identificação molecular de isolados de fungos pode ser realizada através da comparação de uma sequência parcial de DNA de um organismo desconhecido com sequências disponíveis em bancos centrais de dados como o GenBank [44].

Porções de DNA ribossomal, como as regiões intermediárias: *Internal Transcribed Spacers* (ITS) localizadas entre a grande e a pequena subunidade ribossomal; e a região D1/D2 da grande subunidade ribossomal (28s), são as regiões de DNA mais comumente usadas na identificação de fungos [44]. Com proporção significativa de casos relatados de infecção por *Rhodotorula* a identificação por métodos normalmente disponíveis em laboratório não são confiáveis [64]. Por conseguinte é transversal na literatura o sequenciamento da região da sequência transcrita interna (ITS) como “gold standard” para a identificação confiável de *Rhodotorula* spp. [66]. Estas regiões parciais da sequência obtida através dos *primers* universais ITS1/ITS5 (*forward*) e ITS4 (*reverse*) são sequenciadas após a realização da reação de PCR e na maior parte dos casos o produto da reação é ainda purificado através de kits [56], [64], [66]. De igual modo, a região D1/D2 da grande unidade ribossomal (28s) é alvo de sequenciamento e posterior comparação de sequências [64], [65].

2.2.4 Tratamento

A identificação precisa da presença de *Rhodotorula* spp. é intensamente relevante para a gestão da infecção. O conhecimento sobre a suscetibilidade de estirpes de *Rhodotorula* para os medicamentos antifúngicos comumente administrados é essencial uma vez que diversos autores evidenciaram resistência deste género a alguns agentes tipicamente administrados em casos de infecção fúngica, como triazóis ou equinocandinas, duas classes de agentes antifúngicos aos quais *Rhodotorula* é tipicamente resistente [52], [60], [65].

Existem poucas publicações que relatem o teste de suscetibilidade *in vitro* a estirpes de *Rhodotorula* como um método padronizado, contudo é aceitável na literatura *Rhodotorula* poder ser testada de forma confiável pelo protocolo do CLSI [52].

Nas últimas décadas são diversos os estudos publicados que tem como alvo determinar o perfil de suscetibilidade de *Rhodotorula* spp. a diversos agentes antimicóticos e é transversal que flucitosina e anfotericina B são os agentes antimicóticos com maior atividade *in vitro* face a *Rhodotorula*, atividade moderada é observada em agentes como itraconazol e voriconazol. Resistência é observada para agentes como caspofungina, equinocandina e fluconazol [42], [52], [53].

Tabela 4 – Intervalos de MICs que inibem 90% dos isolados (MIC₉₀s) e médias geométricas (MGs) dos valores de MIC (mg / L) de 29 estirpes de *Rhodotorula*. Adaptado de [67].

Agente Antifúngico		<i>R. mucilaginosa</i> (nº isolados=25)	<i>R. glutinis</i> (nº isolados=4)	Total (nº de isolados= 29)
Anfotericina B	Concentrações	0,06 – 8	0,03-1	0,03-8
	MIC ₉₀	1		1
	MG	0,3	0,087	0,25
Flucitosina	Concentrações	0,06 -> 64	0,25-1	0,06 -> 64
	MIC ₉₀	4		2
	MG	0,47	0,42	0,047
Fluconazol	Concentrações	8 -> 64	64 ->64	8 -> 64
	MIC ₉₀	>64		>64
	MG	73,52	90,51	75,66
Itraconazol	Concentrações	0,06 ->8	0,12->8	0,06 ->8
	MIC ₉₀	8		>8
	MG	2,57	1	2,25
Voriconazol	Concentrações	0,5 – 8	0,25-2	0,25-8
	MIC ₉₀	8		8
	MG	3,05	0,63	2,44
Ravuconazol	Concentrações	0,12 – 8	0,03-0,06	0,03-8
	MIC ₉₀	8		4
	MG	0,4	0,043	0,31

MIC₉₀ não foi calculado se o número de isolados foi <10.

Na tabela em cima representada, presente no estudo de Gomez-Lopez *et al.*, (2005), 29 isolados de *Rhodotorula* foram testados a diversos agentes antimicóticos (6), é consensual com o descrito anteriormente, onde se verifica que a maior parte dos isolados o crescimento foi inibido por anfotericina B e flucocitosina a uma concentração <1mg/L e 4mg/L, respetivamente [67]. Compostos azólicos, itraconazol e voriconazol apresentaram atividade moderada com MIC₉₀ (concentração que inibe 90% dos isolados) em concentrações de 8mg/L. Fluconazol demonstrou baixa atividade antifúngica com MICs elevadas, MIC_{90s} > 64 mg/L. Ravuconazol foi o composto azólico com maior atividade com MIC_{90s} de 4 mg/L [67].

Ainda permanece desconhecido o mecanismo de resistência de *Rhodotorula* spp. a fluconazol, contudo, o padrão repetido de MICs elevados sugerem a existência de resistência intrínseca a este agente [52]. A resistência desenvolvida pode ser explicada com base na administração profilática e empírica de agentes antifúngicos, especialmente compostos azólicos [52], [68]. O facto de *Rhodotorula* spp. serem resistentes a fluconazol recorrentemente usado na prática clínica, origina uma pressão seletiva benéfica para estas leveduras, nomeadamente se o paciente se encontrar num ambiente clínico sob um regime terapêutico de longa duração à base de azóis [45].

Anfotericina B, é um agente antifúngico eficaz no tratamento de infeções fúngicas, a resistência a este composto *in vitro* é geralmente rara e lenta, contudo *in vivo* a resposta pode ser ocasionalmente pobre devido a possíveis interações medicamentosas ou resistências desenvolvidas, estes factos podem conduzem sinergicamente a um desfecho menos eficaz da terapêutica [56]. Este agente antimicótico, tem como via de administração a via intravenosa, a dose é dependente do peso corporal e é ajustada às necessidades individuais de cada paciente. Contudo, casos de infeção por espécies de *Rhodotorula* sem tratamento antifúngico específico pode sugerir a baixa virulência deste agente em indivíduos imunocompetentes [52].

3. Tipagem Molecular

Entre os diversos avanços na área da biologia molecular, novos sistemas têm sido desenvolvidos e validados com objetivo de obter identificação rápida de fungos patogênicos com base no estudo de DNA.

Técnicas que empregam a PCR para amplificar regiões arbitrárias de um genoma através do uso de um único *primer* têm tido uma procura crescente. A técnica RAPD – *Randomly Amplified Polimorphic DNA*, - DNA Polimórfico Amplificado Aleatoriamente, permite a identificação de organismos com recurso a *primers* arbitrários que vantajosamente permitem que não seja previamente conhecido o genoma ou as sequências de DNA de interesse dos organismos a testar. Da presente técnica resulta um conjunto de padrões ou fragmentos de DNA amplificado onde *a posteriori* a relação dos organismos é estabelecida através de um padrão de bandas que varia em diferentes microrganismos dependentemente de quão intimamente estes microrganismos estão relacionados (figura 6) [44], [69], [70]. Esta técnica tem sido amplamente usada não só para a identificação de espécies ou subespécies, mas tem aplicações em genética de populações e impressão digital genética [70].

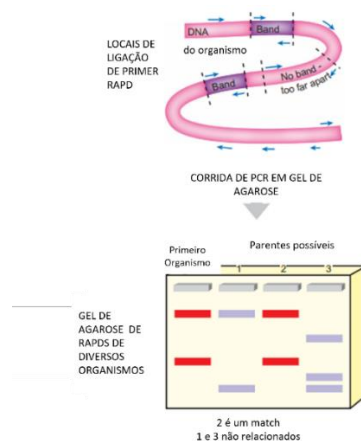


Figura 6 - Representação Esquemática de Amplificação Aleatória de DNA Polimórfico. A primeira etapa da análise RAPD é desenhar primers que se ligam ao DNA genómico em locais aleatórios que são nem muito raros nem muito comuns. Neste exemplo são três pares, mas apenas dois destes pares eram próximos o suficiente para realmente originar um produto de PCR. Consequentemente, este desenho de primer resultará em dois produtos de PCR como vistos gel marcado como “Primeiro organismo”. Os mesmos primers são então usados para amplificar o DNA genómico de outros organismos que são suspeitos de serem relacionados. Neste exemplo, suspeito # 2 mostra o mesmo padrão de bandas que o primeiro organismo e é presumivelmente relacionado. Os outros dois suspeitos não correspondem ao primeiro organismo e são, portanto, não relacionados. Adaptado de [69].

Através da utilização desta técnica, impressões digitais genéticas foram obtidas de diversos microrganismos tais como: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. lusitanae*, *A. fumigatus*, *A. flavus*, *C. neoformans*, *B. dermatitidis* e *H. capsulatum* [44].

Capítulo 2 - Objetivos

A presente dissertação teve como objetivo incrementar o conhecimento relativamente ao impacto de *Rhodoturula* spp. na infeção vulvar e estudar a evolução *in vitro* de fungos colonizadores do trato genital feminino Humano e o seu impacto na previsão de estratégias terapêuticas. Nomeadamente, procedeu-se ao estudo da estabilidade do genoma e das características fenotípicas de isolados de leveduras de casos clínicos expostos a diferentes estímulos em ambiente laboratorial, perspetivando o seu efeito no diagnóstico clínico e na terapêutica, bem como avaliando o seu potencial patogénico.

Adicionalmente pretendeu-se também:

- Identificar as espécies presentes associadas aos casos incluídos no estudo e entender a relevância das leveduras presentes no contexto de infeção;
- Avaliar o nível de estabilidade genotípica e fenotípica no contexto da infeção vulvovaginal recorrente;
- Testar a suscetibilidade *in vitro* das leveduras dos casos clínicos ao antifúngico mais utilizado na prática clínica, o fluconazol.

Capítulo 3 – Materiais e Métodos

3.1 Amostras – Origem e Colheita

Nesta dissertação foram usadas para estudo um total de 12 amostras biológicas provenientes de consulta de especialidade de ginecologia e obstetrícia em clínica privada que tinham como finalidade o diagnóstico laboratorial de casos de infeção. As pacientes não foram recrutadas especificamente para este estudo. O desenho de estudo foi aprovado previamente pela Comissão de Ética da Universidade da Beira Interior (CE-UBI-Pj-2018-022). As amostras encontravam-se em criopreservação a -80°C no Laboratório de Microbiologia II, no Centro de Investigação em Ciências da Saúde (CICS), situado na cidade da Covilhã, Portugal. Estas 12 amostras foram isoladas da vulva de pacientes sintomáticas após o tratamento com compostos azólicos para a candidose vulvovaginal.

O material biológico foi colhido com zaragatoa de algodão, da vulva, sem recurso ao uso do espéculo. Procedeu-se à sementeira imediatamente após a colheita em *Sabourad Dextrose Agar* (SDA, VWR Avantor, Estados Unidos da América). As culturas foram incubadas durante 72h à temperatura ambiente, e inspecionadas para completar o diagnóstico clínico. Após registo dos resultados, as colónias foram re-inoculadas em SDA e criopreservadas em meio *Brain Heart Infusion* (BHI, VWR Avantor, Estados Unidos da América) suplementado com 20% (v/v) de glicerol (Sigma-Aldrich, Estados Unidos da América) a -80°C até ser necessário o seu uso.

As amostras biológicas já se encontravam codificadas da origem com a finalidade de assegurar a proteção de identificação das pacientes, no entanto, foi gerado um novo código abreviado para cada amostra de modo a facilitar a organização no estudo. As codificações de origem e as codificações geradas correspondentes encontram-se na tabela a seguir.

Tabela 5 - Codificação das amostras usadas no estudo.

Codificação Preexistente	Codificação Gerada
20190329A*	MA1
20190606BR	MA2
20190606A	MA3
20181220BR	MA4
20190320A	MA5
20190517AR	MA6
20190516A	MA7
20190329A	MA8
20190315AR	MA9
20190626AR	MA10
20190524AR	MA11
20190306A	MA12

3.2 Condições de Armazenamento e Preparação das Estirpes

As estirpes alvo deste estudo encontravam-se criopreservadas em meio *Brain Heart Infusion* (BHI, VWR Avantor, Estados Unidos da América) suplementado com 20% (v/v) de glicerol (Sigma-Aldrich, Estados Unidos da América) a -80°C . Foram inicialmente transferidas para placas de meio de cultura *Sabourad Dextrose Agar* (SDA, VWR Avantor, Estados Unidos da América) com auxílio de ansas estéreis em condições de assepsia e foram incubadas a 37°C durante 24h. Após crescimento macroscopicamente visível de colónias, as culturas foram mantidas numa arca frigorífica a 4°C , durante todo o tempo de realização do trabalho.

Num período prévio máximo de 24h de cada ensaio, novas repicagens foram efetuadas das culturas armazenadas na arca frigorífica de 4°C . Parte do inóculo foi transferido das placas iniciais que se encontravam na arca frigorífica para novas placas de meio de cultura SDA. As novas placas foram incubadas a 37°C , como já referido, num período máximo de 24h visando que os microrganismos se encontrassem metabolicamente ativos no início de cada ensaio.

3.3 Criopreservação

A criopreservação de culturas microbiológicas permite conservar as características morfológicas, fisiológicas e genéticas dos microrganismos. É uma técnica que permite garantir o “stock” de amostras biológicas e a continuidade e expansão da pesquisa a curto/médio e longo prazo [71].

Neste estudo as culturas foram criopreservadas em meio BHI (VWR Avantor, Estados Unidos da América) suplementado com 20% (v/v) de glicerol (Sigma-Aldrich, Estados Unidos da América). As amostras em estudo foram cultivadas em diversos meios sólidos (tópico 3.6 do presente capítulo), parte do inóculo foi re-suspenso em 1 mL da preparação em cima mencionada em crioviais. A inoculação foi realizada com ansa de inoculação estéril descartável de 10 μL . Realizou-se a homogeneização do conteúdo dos crioviais com o auxílio de vórtex (RSlab-6pro) após a inoculação, foram devidamente identificados e criopreservados a -80°C até ser necessário o seu uso.

3.4 Identificação Bioquímica

De modo a assegurar a identificação das leveduras em estudo, recorreu-se à identificação bioquímica das amostras de forma automatizada pelo sistema VITEK.

As amostras foram para este efeito repicadas 24h antes do ensaio e entregues no Serviço de Microbiologia do Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira (CHUCB). A identificação foi feita por análise automática de perfis bioquímicos decorrentes de 46 reações bioquímicas distintas no equipamento Vitek® (Biomerieux, França).

3.5 Coloração Gram

Desenvolvida em 1884 por Hans Christian Gram, a Técnica de Coloração Gram é um dos métodos de coloração mais importantes utilizado em laboratórios de microbiologia uma vez que permite rapidamente a caracterização de amostras no âmbito do diagnóstico clínico [72].

As amostras em estudo foram inoculadas 24h antes do ensaio de Coloração Gram em meio sólido *Sabouraud Dextrose Ágar* (SDA, VWR Avantor, Estados Unidos da América). Inicialmente as lâminas de vidro foram passadas à chama do bico *Bunsen* para assegurar a sua esterilidade, posteriormente foi realizado o esfregaço em lâmina, onde uma pequena porção do inóculo presente na placa de *Petri* foi retirada com uma ansa de inoculação estéril descartável de 10µL, o inóculo foi espalhado de forma homogênea com movimentos circulares em uma gota de água purificada do sistema Milli-Q® (Merck Group) colocada com o auxílio de uma pipeta de *Pasteur* na lâmina de vidro. Primeiramente realizou-se a fixação do esfregaço na lâmina à chama e de seguida corou-se a lâmina por 1 min em Violeta de Cristal (Sigma-Aldrich, Estados Unidos da América), posteriormente à coloração inicial procedeu-se à remoção de excesso de corante da lâmina com água purificada e realizou-se a fixação de corante com Iodo (Sigma-Aldrich, Estados Unidos da América) durante 1 min, sucessivamente à lavagem da lâmina em água purificada descolorou-se a lâmina com Etanol (Sigma-Aldrich, Estados Unidos da América) por 30 segundos e lavagem em água purificada. Na etapa final, corou-se a lâmina com Safranina (Sigma-Aldrich, Estados Unidos da América) por 1 min, remoção de excesso de corante através de lavagem em água purificada e secagem das lâminas a temperatura ambiente. Para examinação com amplificação máxima (100x), foi colocada uma gota de óleo de imersão sobre o esfregaço e o conteúdo da lâmina foi observado ao microscópio (Nikon YS100, França).

3.6 Estudo da Estabilidade Genotípica e Fenotípica

Neste estudo pretendeu-se avaliar o nível de estabilidade genotípica e fenotípica de algumas leveduras clínicas em diversos meios de cultura e a duas temperaturas independentes. As amostras foram inoculadas nos meios sólidos: *Starch/PDA/Cornmeal* e SDA em duas incubadoras a temperaturas distintas: a 37°C (na incubadora Binder) e à Temperatura Ambiente (TA) (na incubadora NUAIRE), esta última define-se entre 22°C e 28°C. Após 3 e 10 dias, 72h e 240h, respetivamente, de incubação, foi realizada a fenotipagem das culturas bem como o registo fotográfico das culturas em estudo. A nível fenotípico foi registado o aspeto macroscópico apresentado, tendo sido a cor, aparência e concavidade das culturas como os principais parâmetros avaliados. De modo a manter as características morfológicas, fisiológicas e genéticas, procedeu-se à criopreservação de parte das culturas ao 3º e 10º dia, do modo já descrito na secção 3.3 do presente capítulo.

Tabela 6 - Composição de preparação de meio de cultura Cornmeal Agar

Cornmeal Agar

Por Litro:	20.0g	Sêmola de Milho	
	20.0g	Peptona	Biokar, França
	20.0g	D – Glucose	VWR, Bélgica
	15.0g	Ágar Bacteriológico Tipo E	Biokar, França

Num primeiro *shot* de 1 Litro de volume foi pesado na balança analítica (Radwag® PS 2100-R2) Peptona, D – Glucose e Ágar Bacteriológico Tipo E. Neste *shot* foram adicionados 500 mL de água purificada do sistema Milli-Q® (Merck Group). A mistura no primeiro *shot* manteve-se em repouso até uso posterior.

Num segundo *shot* de 1 Litro de volume a sêmola de milho, previamente pesada na balança analítica (Radwag® PS 2100-R2), foi cozinhada em 500 mL de água purificada do sistema Milli-Q® (Merck Group) durante 1h a 60°C no banho termostaticado (VWR® 18 litre shaking water bath). Findado o tempo de cozedura, o sobrenadante foi filtrado através de filtro de papel (MN 615, Fisher Scientific) e transferido para o primeiro *shot*; o volume da mistura foi completado até 1L com água purificada do sistema Milli-Q® (Merck Group). Posteriormente o meio de cultura preparado foi autoclavado na autoclave da Sala de Esterilização do Centro de Investigação em Ciências da Saúde (CICS).

Tabela 7 - Composição de preparação de meio de cultura Starch Agar

Starch Agar

Por Litro:	3.0g	Extrato de Carne	VWR, Bélgica
	10.0g	Starch Solúvel	Sigma - Aldrich®, Alemanha
	12.0g	Ágar Bacteriológico Tipo E	Biokar, França

Em um *shot* de 1 Litro de volume foi pesado na balança analítica (Radwag® PS 2100-R2) os reagentes em cima mencionados. Foi adicionado 1000 mL de água purificada do sistema Milli-Q® (Merck Group). Posteriormente o meio de cultura preparado no *shot* foi autoclavado na autoclave da Sala de Esterilização do Centro de Investigação em Ciências da Saúde (CICS).

Tabela 8 - Composição de preparação de meio de cultura SDA

Sabourad Dextrose Agar (SDA)

Por Litro:			
	65.0g	SDA	VWR Avantor, Estados Unidos da América

Tabela 9 - Composição de preparação de meio de cultura PDA

Potato Dextrose Agar (PDA)

Por Litro:		
42.0g	PDA	Biolife, Itália

Em 2 *shots* de 1 Litro de volume independentes, foram pesados na balança analítica (Radwag® PS 2100-R2) os reagentes em cima mencionados, SDA e PDA. Em cada *shot* foi adicionado 1000 mL de água purificada do sistema Milli-Q® (Merck Group). Posteriormente os meios de cultura preparados nos *shots* foram autoclavados na autoclave da Sala de Esterilização do Centro de Investigação em Ciências da Saúde (CICS).

Com o objetivo de avaliar a estabilidade genotípica das estirpes em estudo face aos diferentes meios de cultura em ambiente laboratorial, as amostras previamente criopreservadas a -80°C do 3º e 10º dia (72 horas e 240 horas, respetivamente) foram re-inoculadas nos diferentes meios correspondentes e incubadas nas respetivas temperaturas; 24h prévias ao ensaio de Extração de DNA Genómico que foi realizado do modo descrito na secção seguinte - 3.7, do presente capítulo. Posteriormente ao processo de Extração de DNA, as concentrações resultantes foram quantificadas, bem como o grau de pureza. Finalmente, procedeu-se à normalização das concentrações de DNA e procedeu-se à corrida de eletroforese em gel de agarose horizontal como descrito na secção 3.9.

3.7 Extração de DNA Genómico

Neste estudo pretendeu-se avaliar o nível de estabilidade genotípica e fenotípica das leveduras clínicas em diversos meios de cultura e a diferentes temperaturas, bem como identificar através de meios moleculares as leveduras em estudo. Para estes efeitos, as estirpes alvo foram respetivamente inoculadas nos respetivos meios e incubadas nas respetivas condições 24h prévias ao ensaio de Extração de DNA Genómico; para esta finalidade, inicialmente preparou-se uma suspensão a 5 McFarland em 2 mL de *Phosphate-Buffered Saline* (PBS) 1x com o auxílio do densitómetro Den- 1 (Grant-bio, Estados Unidos da América); de seguida foi pipetado 1 mL da suspensão preparada para um *Eppendorf* que foi centrifugado 5 minutos a 14000 rotações por minuto (rpm) na micro centrífuga (GYROZEN, Coreia), o sobrenadante resultante do processo de centrifugação foi descartado e foram adicionados 200 µL de solução de lise com re-suspensão do *pellet* celular. Posteriormente os *Eppendorfs* foram colocados num bloco de aquecimento (Stuart Equipment, Reino Unido) a 95°C durante 15 min e posteriormente em gelo até serem centrifugados durante 5 min a 14000 rpm na micro centrífuga. O sobrenadante resultante foi transferido para novos tubos *Eppendorf* e de seguida foi adicionado 470 µL de etanol absoluto refrigerado (Honeywell, Alemanha), os tubos de *Eppendorf* foram invertidos várias vezes, e depois deste processo mecânico procedeu-se à centrifugação de 5 min a 14000 rpm na micro centrífuga; o sobrenadante foi descartado e foi adicionado 500 µL de etanol 70% refrigerado (JMGS Lda, Portugal), procedeu-se à ultima centrifugação do ensaio (5 min a 14000 rpm) na micro centrífuga; o sobrenadante foi descartado e o conteúdo de cada *Eppendorf* foi re-suspendido em 100 µL de TE Buffer 1x, pH 8.0, (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos da América) . O DNA presente em cada *Eppendorf* foi quantificado e devidamente armazenado até a sua utilização.

Foram utilizados os seguintes reagentes no processo de extração de DNA genómico de leveduras: Solução de Lise composta por: 1 mL de solução de Cloreto de Lítio (LiCl) com uma concentração molar de 5M, 2mL de solução de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 10%, 100 uL de β-mercaptoetanol (Merck, Alemanha) e 6,9 mL de água ultra-pura (Hikma, Portugal). PBS 1x, tendo este sido preparado num *shot* de 1L com 100 mL PBS 10x* e 900 mL de água estéril e autoclavado.

* *Phosphate-Buffered Saline* (PBS) 10x - cloreto de sódio (NaCl) 1,37 M, Fisher Scientific, New Hampshire, Estados Unidos da América; 27Mm cloreto de potássio (KCl), ChemLab, Zedelgem, Bélgica; 100 mM Nadelgem, Bélgica; 100mM fosfato dissódico (Na₂HPO₄), Fisher Scientific, New Hampshire, Estados Unidos da América; 20 mM fosfato monopotássico (KH₂PO₄), ChemLab, Zedelgem, Bélgica.

3.7.1 Quantificação de DNA Genómico

De modo a assegurar a pureza e concentração conveniente de DNA Genómico resultante das extrações realizadas para os estudos posteriores, as concentrações de DNA de todas as amostras foram quantificadas por método de espectrofotometria, método que mede a quantidade de luz absorvida pelo DNA.

Neste estudo a concentração de proteínas das extrações de DNA Genómico de Leveduras foi calculado através da medição da absorbância de 3µL de cada amostra a 260/280 nm usando o equipamento Nanophotometer P300 (IMPLEN). A taxa de absorbância 260/230nm foi equivalentemente medida no mesmo equipamento para determinar o grau de pureza do DNA (concentração de álcoois). Previamente à medição de absorbâncias das amostras realizou-se a calibração do equipamento, recorrendo a TE Buffer 1x, pH 8.0, (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos da América) sem a presença de qualquer DNA.

3.7.2 Normalização de DNA Genómico

As concentrações de DNA obtidas pelo método descrito anteriormente foram normalizadas para uma concentração final de 25 ng/µL. A diluição das concentrações de DNA de algumas amostras foi realizada em água ultrapura (Hikma, Portugal). Amostras com concentrações inferiores à concentração final pretendida foram repicadas em meio sólido repetindo o processo de extração e quantificação de concentração de DNA até a normalização de todas as amostras ser possível. Este passo “intermediário” entre quantificação e realização da Reação de PCR, teve como objetivo minimizar as diferenças entre as concentrações de DNA das amostras a analisar, evitando assim qualquer diferença de padrões associada a valores de concentrações de DNA.

3.8 Detecção de *Candida* spp. por PCR

O diagnóstico molecular baseia-se em técnicas consagradas da biologia molecular como a PCR e as suas variações visando a investigação de alvos de interesse a partir da análise do material genético, o DNA e o RNA. Khan, Z. e Mustafa, A. (2001), estabeleceram métodos de PCR para a detecção de *Candida* a nível de género e espécie [21]. Os *primers* ZU5 / ZU6 foram utilizados na PCR para detecção do género *Candida* (tabela 10).

Tabela 10 - A sequência de nucleotídeos, tamanho, designação e localização no gene *P450-L1A1* de cada primer usado no estudo. Adaptada de [21].

1. **5' ATG GGT GGT CAA CAT ACT TC 3' 20 mer**
ZU5: corresponde a bases de nucleotídeos:
1063 a 1082 de *C. albicans*
763 a 782 de *C. glabrata*
738 a 757 de *C. krusei*
1558 a 1577 de *C. tropicalis*

2. **5' TAC ATC TAT GTC TAC CAC C 3' 19 mer**
ZU6: complementar às bases de nucleotídeos:
1558 a 1540 de *C. albicans*
1240 a 1222 de *C. glabrata*
1242 a 1224 de *C. krusei*
2053 a 2035 de *C. tropicalis*

Para uma reação de PCR foi preparada uma *Master Mix* com: 6,875 µL de NZY[®]Taq II 2x Green Master Mix (NZYTech, Portugal); 0,275 µL de *Primer* ZU5 e ZU6 e 4,95 µL de Água Ultrapura (Hikma, Portugal). A um volume de 11,25 µL de *Master Mix* por reação, foi adicionado 1,25 µL de DNA. A reação de PCR foi realizada no Termociclador T100™ (BIO-RAD). Os ciclos de PCR foram conduzidos da seguinte forma; 1 ciclo de 3 min de Desnaturação inicial a 95°C. 40 Ciclos de desnaturação a 94 ° C por 30 segundos, *Anneling* 52°C por 30 segundos, Extensão 72°C por 30 segundos. Extensão final a 72 ° C por 10 min. E por fim, *Infinite hold* a 12°C.

Os fragmentos de DNA amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose horizontal. Esta técnica consiste na eletroforese horizontal com gel de agarose (NZYTech, Portugal) (1%) e 3µL de *GreenSafe Premium* (NZYTech, Portugal) como marcador de ácidos nucleicos. Depositadas as amostras e o marcador de peso molecular no gel, a eletroforese foi realizada a 100 volts, durante 60 min em tina de eletroforese (BIO-RAD Sub-Cell® GT) com tampão TAE (base Tris 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM, pH 8), e com fornecimento de corrente através de fonte elétrica (BIO-RAD PowerPac™ Basic Power Supply). Findada a corrida de eletroforese, o gel foi revelado através de exposição a luz UV no Uvitec Cambridge Fire-Reader equipado com câmara UV (UVITEC Cambridge; Reino Unido) o gel foi fotografado através do *software* do equipamento Uvitec.

3.9 Tipagem Molecular RAPD – PCR

Na técnica de RAPD foi utilizado um único *primer* de sequência arbitrária que dirige a síntese simultânea de vários segmentos de DNA em diversos pontos do genoma. Neste estudo foi utilizado o *primer* M13 com o objetivo de realizar tipagem molecular das amostras em estudo.

Para uma reação de RAPD -PCR foi preparada uma *Master Mix* com: 7,5 µL de NZY[®]Taq II 2x *Green Master Mix* (NZYTech, Portugal); 0,3 µL de *primer* M13; 0,6 µL de Solução de Magnésio com uma concentração de 25 milimolar (KAPABIOSYSTEMS) e 1,85 µL de Água Ultrapura (Hikma, Portugal). A um volume de 8,25 µL de *Master Mix* por reação, foram adicionados 4 µL de DNA (de concentração normalizada para 25 ng/ µL).

A amplificação de DNA foi realizada num Termociclador T100™ (BIO-RAD). Os ciclos de PCR foram conduzidos da seguinte forma: 1 ciclo de 5 min de Desnaturação inicial a 94°C, seguida 39 ciclos de desnaturação a 94 ° C por 1 min, *Annealing* 45°C por 20 segundos, Extensão 72°C por 2 min, etapa de Extensão Final a 72 ° C por 7 min e *Infinite hold* a 4°C.

Os fragmentos de DNA amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose horizontal. Esta técnica consiste na eletroforese horizontal com gel de agarose (NZYTech, Portugal) (2%) e 3 µL de *GreenSafe Premium* (NZYTech) como marcador de ácidos nucleicos. Depositadas as amostras e o marcador de peso molecular no gel, a eletroforese foi realizada a 100 volts, durante os primeiros 10 min, findado este tempo a corrida de eletroforese teve continuação com alteração de voltagem para 140 volts durante 60 min em tina de eletroforese (BIO-RAD Sub Cell® GT) com tampão TAE (base Tris 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM, pH 8) com fornecimento de corrente através de fonte elétrica (BIO-RAD PowerPac™ Basic Power Supply). Findada a corrida de eletroforese, o gel foi revelado usando a exposição a luz ultravioleta (UV) no Uvitec Cambridge Fire-Reader equipado com câmara UV (UVITEC Cambridge; Reino Unido) o gel foi fotografado através do *software* do equipamento Uvitec.

3.10 Determinação das Condições Ótimas de Crescimento em Meio Líquido

Neste ensaio pretendeu-se determinar as condições ótimas de crescimento de leveduras de *Candida* spp. e *Rhodotorula* spp. em dois meios de cultura líquidos: RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Estados Unidos da América), suplementado com ácido 3-(N-morfolino) -propanossulfónico (MOPS, VWR, Estados Unidos da América), e YPD *Broth* (Fisher BioReagents, Bélgica); à Temperatura Ambiente (compreendida entre 22 e 28°C), 35°C e 37°C, num período máximo de 72 horas.

De forma que o ensaio fosse representativo, foi repicado um isolado de cada estirpe 24 horas prévias ao ensaio; deste modo foi repicada a estirpe ATCC10231 utilizada como controlo interno do laboratório, um isolado de *Candida famata* e um isolado *Rhodotorula glutinis/mucilaginoso* em placas de meio cultura sólido SDA (VWR Avantor, Estados Unidos da América).

Inicialmente foram preparadas as suspensões das leveduras em 5mL de meio líquido, RPMI-1640 e YPD *Broth* e a densidade ótica foi acertada a 0,5 *McFarland* com o auxílio do densitómetro Den-1 (Grant-bio, Estados Unidos da América). Seguidamente as microplacas de 96 poços foram preparadas com 6 controlos positivos (meio e inóculo) para cada isolado em estudo e 2 controlos negativos (apenas meio líquido RPMI-1640/ YPD *Broth*) para cada isolado. Posteriormente as 3 placas independentes foram incubadas à Temperatura Ambiente, 35°C e 37°C. No período de 24 / 48 / 72 horas o conteúdo de cada poço foi homogeneizado e a microplaca foi inserida no espectrofotómetro de absorção de microplacas (xMark™, Bio-Rad) com comprimento de onda ajustado a 600 nm de forma a determinar o grau de turbidez (crescimento) de cada isolado nas condições testadas.

3.11 Determinação de Unidades Formadoras de Colónias (UFC)

O presente ensaio teve como objetivo determinar aproximadamente o número de células viáveis de *Rhodotorula* spp. correspondentes a uma turbidez de 0,5 *McFarland* de suspensão. Dois isolados de *Rhodotorula* foram previamente repicados em meio de cultura sólido SDA (VWR Avantor, Estados Unidos da América).

Primeiramente, foi preparada uma suspensão da levedura de *Rhodotorula* spp. em solução de Cloreto de Sódio a 0.85% (Fisher Chemical, Bélgica) a uma densidade ótica acertada de 0,5 *McFarland* com o auxílio do densitómetro Den-1 (Grant-bio, Estados Unidos da América).

Posteriormente na placa foram realizadas diluições sucessivas até 10^{-10} da suspensão celular em água peptonada (Neogen, Estados Unidos da América). Realizadas as diluições, 4µl de cada suspensão diluída foi espalhada sobre o meio de cultura sólido SDA de modo que as células tivessem ficado distanciadas o suficiente para facilitar a contagem de colónias após as várias divisões celulares. As placas de meio de cultura sólido foram incubadas à temperatura ambiente e 48 horas após a incubação procedeu-se à contagem e registo de colónias observadas com auxílio do contador de colónias (P-Selecta® Digital S).

3.12 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC)

A determinação da Concentração Mínima Inibitória (“MIC”) foi realizada segundo a norma M27-A3 - Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica - publicada por CLSI. Segundo a norma M27-A3 consultada, MIC é definida como: “a menor concentração de um agente antimicrobiano que impede o crescimento visível de um microrganismo em um teste de sensibilidade à diluição em ágar ou caldo.” [72].

3.12.1 – Fármacos Testados

O fármaco testado nos isolados clínicos foi o Fluconazol (Sigma – Aldrich, Estados Unidos da América) dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO), com uma concentração da solução de “stock” de 25600 µg / mL. Diluições adicionais foram realizadas em meio RPMI 1640 padrão (Biochrom AG, Alemanha) e em YPD *Broth* (Fisher BioReagents, Bélgica), onde a concentração final do fármaco na placa variou entre 0,016 µg/mL e 512 µg/ mL.

3.12.2 – Reagentes

O meio sólido de cultura sólido *Sabourad Dextrose Agar* (SDA, VWR Avantor, Estados Unidos da América) foi utilizado como meio sólido para as culturas de levedura, enquanto o meio de cultura líquido RPMI-1640 (Biochrom AG, Alemanha) foi utilizado para a preparação dos inóculos de levedura de *Candida* spp. e como meio de crescimento líquido nos ensaios. O ácido 3-(N-morfolino)-propanossulfônico, foi utilizado como tampão na preparação do meio RPMI-1640. O meio de cultura líquido YPD *Broth* (Fisher BioReagents, Bélgica) foi utilizado para a preparação dos inóculos de levedura de *Rhodotorula* spp. e como meio de crescimento nos ensaios.

Para o teste de suscetibilidade *in vitro*, as estirpes em estudo foram repicadas 24 horas prévias ao ensaio, em meio de cultura SDA como descrito no protocolo M27-A3.

Primeiramente, suspensões de levedura de *Rhodotorula* spp. e *Candida* spp. foram realizadas em solução de cloreto de sódio (Fisher Chemical, Bélgica) a 0.85%; a densidade ótica das suspensões foi acertada a 0,5 *McFarland* com o auxílio do densitômetro Den- 1 (Grant-bio, Estados Unidos da América), sendo que 0,5 *McFarland* corresponde, aproximadamente a $1 - 5 \times 10^6$ células por mL de suspensão. Seguidamente, uma diluição de 1:1000 das suspensões foi efetuada em meio líquido. Posteriormente, uma segunda diluição (1:2) realizada em microplaca de 96 poços, resultando assim em uma concentração final de 500 a 2500 células por mililitro em cada poço. Numa microplaca de 96 poços estéril, 100µL da solução do composto a testar foi adicionada aos 2 primeiros poços, seguida de diluições sucessivas. Por fim, 100µL da diluição final da estirpe em meio líquido foi transferido para cada poço da microplaca.

Na microplaca foram ainda incluídos dois controlos: controlo positivo (controlo de crescimento de levedura) e controlo negativo (controlo de esterilidade do meio).

A estirpe ATCC10231, foi utilizada como controlo interno do laboratório. O ensaio foi realizado pelo menos três vezes de forma independente e em duplicado. Concluída a preparação das microplacas, estas foram então incubadas à temperatura ambiente (na incubadora NUAIRE) para os isolados de *Rhodotorula* spp. e *Candida famata* e a 37°C (na incubadora Binder), para os restantes isolados de *Candida* spp., durante 48 horas.

Após o período de incubação, o conteúdo de cada poço foi homogeneizado e leituras macroscópicas foram realizadas. Para confirmação dos resultados, a leitura da densidade ótica de cada poço da microplaca foi realizada através do espectrofotómetro de absorção de microplacas (xMark™, Bio-Rad), a um comprimento de onda ajustado a 600 nm de forma a determinar o grau de turbidez (crescimento) de cada isolado nas condições testadas.

3.13 Determinação da Concentração Mínima Letal (MLC)

Segundo Cantón *et al.*, (2003), MLC – “Minimum Fungicidal (Lethal) Concentrations” define-se como a concentração de medicamento mais baixa que matou $\geq 99.9\%$ do inóculo [73].

Para determinar a MLC posteriormente ao ensaio de determinação da MIC descrita anteriormente, o conteúdo de cada poço sem crescimento observado foi homogeneizado. Seguidamente 4µL de volume de cada poço foi subcultivado em placas de meio sólido SDA (VWR Avantor, Estados Unidos da América). Quando as alíquotas depositadas secaram, as placas foram incubadas durante 48 horas. Findado este período de incubação observações macroscópicas foram realizadas com o objetivo de verificar crescimento microbiológico. Nas placas onde ocorre crescimento, demonstram que a MLC que havia sido determinada corresponde a uma concentração fungistática. Se nas placas onde não ocorreu crescimento adota-se a MIC previamente determinada, como MLC.

Capítulo 4 – Resultados e Discussão

A presente dissertação teve como início de trabalho laboratorial o processamento de amostras biológicas provenientes de consulta de especialidade de ginecologia e obstetrícia em clínica privada que tinham como finalidade o diagnóstico laboratorial. Totalizando um conjunto de 12 amostras biológicas provenientes de 12 casos clínicos de pacientes tratadas com o diagnóstico de Candidose Vulvovaginal, as amostras provieram da vulva das pacientes.

Inicialmente procedeu-se à inoculação das amostras (MA1-MA12) em placas de meio SDA durante 72h a temperatura ambiente. Findado o período de incubação as culturas foram inspecionadas e realizou-se o registo dos resultados, os quais são apresentados na tabela 11.

Tabela 11 - Descrição da aparência das amostras biológicas em meio de cultura SDA com período de incubação de 72h.

CODIFICAÇÃO	FENÓTIPO
MA1	Presença de Colónias Brancas e Colónias Rosa
MA2	Presença de Colónias Rosa e maioritariamente Brancas
MA3	Presença de Colónias Rosa
MA4	Presença de Colónias Rosa Leitosas
MA5	Presença de Colónias Brancas e Colónias Rosa
MA6	Presença de Colónias Rosa
MA7	Presença de Colónias Rosa Leitosas
MA8	Presença de Colónias Brancas Leitosas e algumas Colónias Rosa
MA9	Presença de Colónias Brancas
MA10	Maioritariamente Colónias Rosa Leitosa presentes e algumas Colónias Brancas
MA11	Presença de Colónias Rosa
MA12	Presença de Colónias Rosa

Os resultados em cima apresentados elucidam que em 12 amostras clínicas, 5 destas apresentavam a coexistência de dois microrganismos fenotipicamente distintos, ou seja, 5 culturas mistas; e a presença de 7 culturas puras.

4.1 Identificação Microbiológica

O método de Gram é uma das técnicas de coloração diferencial amplamente utilizada em laboratórios de microbiologia em diagnóstico clínico uma vez que permite uma rápida caracterização de amostras biológicas [72], [74]. Com recurso a esta técnica obteve-se a coloração dos esfregaços das amostras biológicas MA1 a MA12.

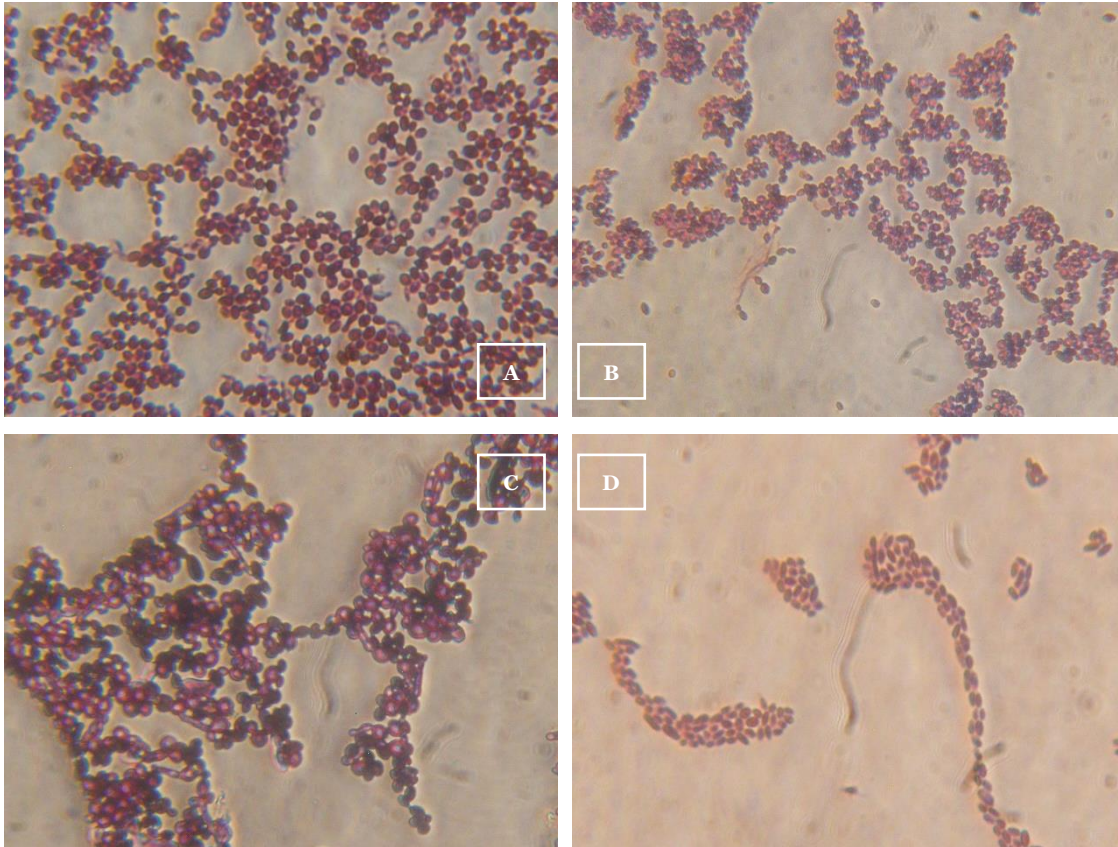


Figura 7 - Reação de coloração de Gram de esfregaços das amostras (MA1-A/ MA3-B/MA5-C/MA9-D) indicando a presença de leveduras com aparência de cor roxa e violeta. Magnificação 200×.

Dentre os resultados do estudo das amostras por Gram, verificou-se que morfológicamente a totalidade dos esfregaços corados apresentavam células grandes, arredondadas a ovais, coradas de roxo ou violeta; com maior ou menor abundância de células (figura 7A – presença de muitas células coradas). A intensa coloração das células coradas, bem como a morfologia apresentada, sugeriu assim a presença de leveduras nas amostras em estudo, como descrito por Henrici, A, (1914) [75]. A coloração de violeta/ roxo deve-se ao facto da estrutura da parede celular de leveduras ser próxima à de bactérias Gram-Positivas - camada espessa de peptidoglicano; contudo é necessário realçar que este procedimento não é uma técnica de diferenciação como a diferenciação bacteriana que permite classificar as bactérias como Gram-Positivas e Gram-Negativas [34]. Em suma, 100% dos isolados clínicos eram leveduras.

Com o intuito de assegurar e obter identificação a nível de género e espécie das leveduras em estudo, realizaram-se testes bioquímicos de forma automatizada pelo sistema Vitek®, no qual se obteve a identificação apresentada na tabela 12.

Tabela 12 - Resultados de identificação das leveduras em estudo através do sistema automatizado Vitek®.

Código	Identificação Obtida
MA1	<i>Rhodotorula glutinis</i> / <i>mucilaginosa</i>
MA2	<i>Rhodotorula glutinis</i> / <i>mucilaginosa</i>
MA3	<i>Rhodotorula glutinis</i> / <i>mucilaginosa</i>
MA4	<i>Rhodotorula glutinis</i> / <i>mucilaginosa</i>
MA5	<i>Rhodotorula glutinis</i> / <i>mucilaginosa</i>
MA6	<i>Rhodotorula glutinis</i> / <i>mucilaginosa</i>
MA7	<i>Rhodotorula glutinis</i> / <i>mucilaginosa</i>
MA8	<i>Rhodotorula glutinis</i> / <i>mucilaginosa</i>
MA9	<i>Candida parapsilosis</i>
MA10	<i>Rhodotorula glutinis</i> / <i>mucilaginosa</i>
MA11	<i>Rhodotorula glutinis</i> / <i>mucilaginosa</i>
MA12	<i>Rhodotorula glutinis</i> / <i>mucilaginosa</i>

A caracterização molecular das leveduras foi igualmente realizada através da técnica PCR com recurso a *primers* específicos de *Candida* spp. . A identificação dos isolados clínicos de *Candida* spp. foi procedida pela comparação da disposição de bandas no gel de agarose dos isolados com a banda de amplificação do controlo interno do laboratório, *Candida albicans* - ATCC 10231. A coincidência de posição entre as bandas indica que o isolado clínico é igual ao padrão, cuja identidade é conhecida, o que permite sua determinação.

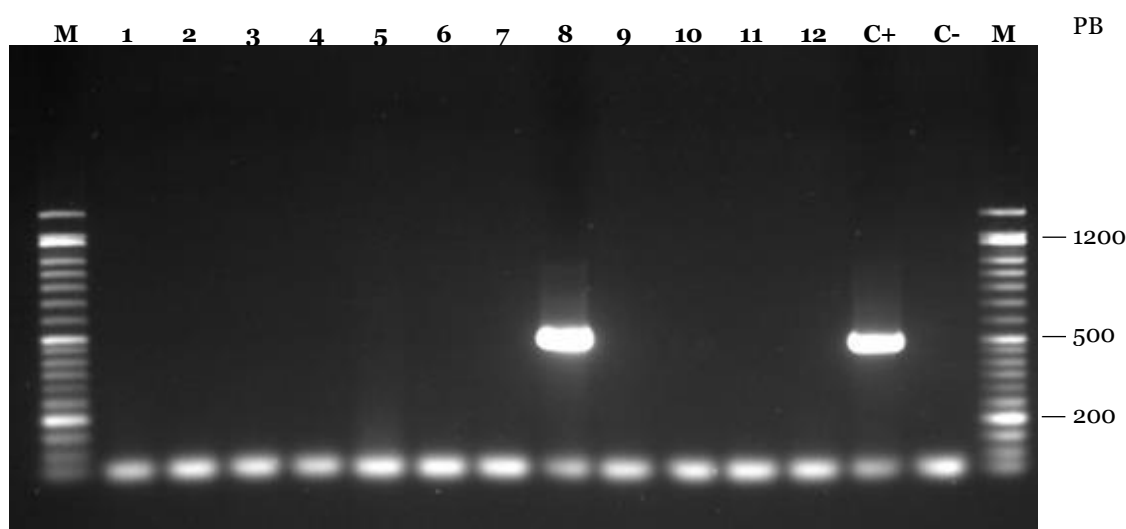


Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose, produtos de amplificação de isolados com *primers* ZU5 / ZU6 para *Candida* spp. Amplificação de um fragmento de ~490 PB de *Candida* no isolado 8 (MA8). (M) - DNA Ladder VI; (1-12) – isolados em estudo; (C+) – ATCC 10231.

Através dos resultados obtidos de caracterização molecular dos isolados em estudo obteve-se um produto de amplificação de um fragmento de sensivelmente 490 PB (pares de base) no isolado 8, compatível com o fragmento amplificado no Controlo Positivo (ATCC 10231 – *Candida albicans*) com o mesmo tamanho molecular. Estes resultados sugeriram a presença de *Candida* no isolado MA8 uma vez que o par de *primers* utilizado são específicos do género *Candida*, capazes de amplificar os segmentos de DNA do gene que codifica o citocromo P450 L₁A₁ [21]. Os resultados moleculares são em parte compatíveis com as primeiras observações de cultura macroscópicas realizadas presentes na tabela 11, uma vez que o isolado MA8 apresentava dois morfótipos; colónias brancas leitosas e colónias rosa. Associadas as observações macroscópicas com os resultados moleculares, presumiu-se então que colónias rosa estariam associadas a culturas de *Rhodotorula* e colónias brancas estariam associadas a culturas de *Candida*, estas descrições macroscópicas estão de acordo com o descrito na literatura sobre estas leveduras [5], [53], [76]. Contudo, os resultados moleculares foram díspares com o relatório de resultados de identificação pelo sistema automatizado Vitek (tabela 12), a discordância assenta na diferença de isolados identificados como *Candida*. Pelo sistema Vitek, MA9 foi identificada como *Candida parapsilosis*, pelo método molecular MA8 obteve amplificação positiva como sendo do género *Candida*. De modo a colmatar as diferenças observadas, o procedimento de caracterização molecular das leveduras em estudo foi primeiramente repetido, bem como a identificação através de testes bioquímicos de forma automatizada pelo sistema Vitek®. Os resultados obtidos constam respetivamente na figura 9 e na tabela 13.

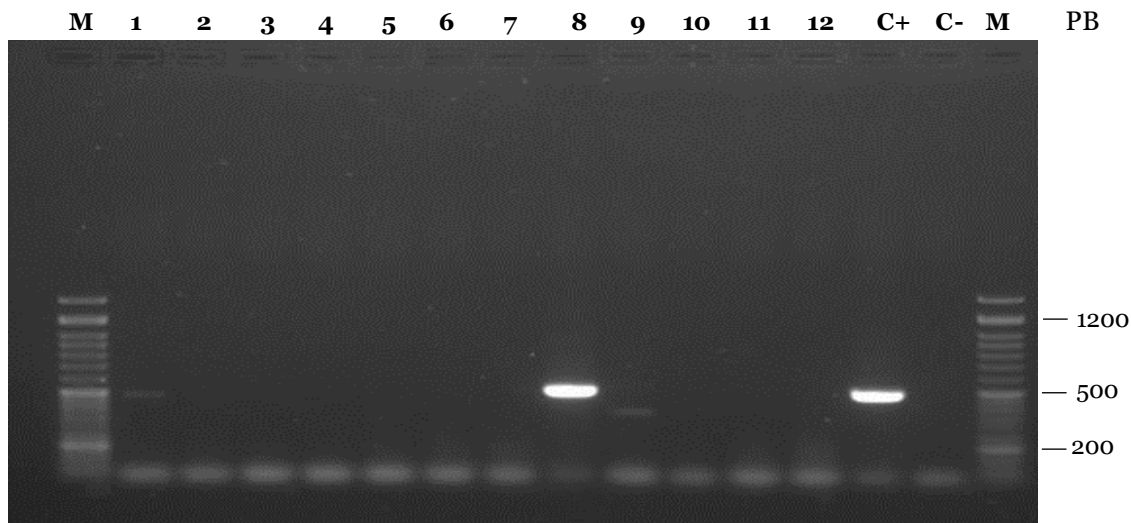


Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose, produtos de amplificação de isolados com primers ZU5 / ZU6 para *Candida* spp. Amplificação de fragmentos de ~480 pb de *Candida* no isolado 1 e 9 (MA1 e MA9); Amplificação de um fragmento de ~490 pb de *Candida* no isolado 8 (MA8). (M) - DNA Ladder VI; (1-12) – isolados em estudo; (C+) ATCC 10231

Nos resultados apresentados na figura 9, foram detetados 3 produtos de amplificação em 3 amostras distintas (MA1/MA8 e MA9) resultantes da amplificação com *primers* específicos do género *Candida*. As bandas dos fragmentos amplificados são compatíveis com a banda do controlo positivo, *Candida albicans* – ATCC10231.

A coincidência de posição entre as bandas indica que os isolados clínicos MA1, MA8 e MA9 são semelhantes à estirpe padrão cuja identidade é conhecida. A diferença de intensidade da banda amplificada pode estar relacionada com a quantidade de células de *Candida* das quais DNA foi extraído para o estudo molecular. Esta observação é fundamentada nos estudos realizados Khan, Z. e Mustafa, A. (2001), no qual DNA extraído de 100 células de *Candida* apresentou amplificação do fragmento de intensidade ténue, enquanto que o DNA extraído em 100,000 células de *Candida* apresentou uma amplificação do fragmento de intensidade mais vigorosa [21]. Realizaram-se diversas repicagens das culturas iniciais (tabela 11) visando obter culturas puras das leveduras. Por conseguinte, novas identificações foram obtidas pelo sistema Vitek (tabela 13).

Tabela 13 - Resultados da repetição de identificação das leveduras em estudo na presente investigação através do sistema automatizado Vitek®.

Isolado	Identificação
MA1 Branca	<i>Candida famata</i>
MA1 Rosa	<i>Rhodotorula glutinis / mucilaginosa</i>
MA2	<i>Rhodotorula glutinis / mucilaginosa</i>
MA3	<i>Rhodotorula glutinis / mucilaginosa</i>
MA4	<i>Rhodotorula glutinis / mucilaginosa</i>
MA5 Branca	cocus
MA5 Rosa	<i>Rhodotorula glutinis / mucilaginosa</i>
MA6	<i>Rhodotorula glutinis / mucilaginosa</i>
MA7	<i>Rhodotorula glutinis / mucilaginosa</i>
MA8 Branca	<i>Candida albicans</i>
MA8 Rosa	<i>Rhodotorula glutinis / mucilaginosa</i>
MA9 Branca	<i>Candida parapsilosis</i>
MA10	<i>Rhodotorula glutinis / mucilaginosa</i>
MA11	<i>Rhodotorula glutinis / mucilaginosa</i>
MA12	<i>Rhodotorula glutinis / mucilaginosa</i>

Os resultados obtidos através da repetição de identificação pelo sistema automatizado Vitek permitiram a identificação de três espécies diferentes de *Candida*, (MA1 Branca – *Candida famata*; MA8 Branca – *Candida albicans*; MA9 Branca – *Candida parapsilosis*). O isolado não identificado em MA5 Branca foi descartado uma vez que apresentava morfologia bacteriana.

Os presentes resultados são concordantes com a descrição macroscópica dos isolados descrita na tabela 11 onde foi confirmada a existência de culturas mistas nas amostras MA1/MA8/MA9.

O isolamento dos microrganismos presentes nas culturas mistas das amostras MA2, MA5 e MA10, foi eventualmente perdido nas repicagens efetuadas, sendo assim impossibilitada a sua identificação a nível molecular e bioquímico. Adicionalmente, estes resultados são concordantes com os resultados da repetição de caracterização molecular onde foi possível a deteção de leveduras de *Candida* nas amostras MA1, MA8 e MA9.

No primeiro relatório de identificação pelo sistema Vitek foram erroneamente identificados 2 isolados, como *Rhodotorula glutinis* / *mucilaginosa*, correspondendo assim a uma percentagem de identificação incorreta de 16,6% nesta investigação. Analogamente a outras publicações, os métodos bioquímicos com maior probabilidade de identificação bem-sucedida de *Candida* spp. foram o Vitek 2 YST (79,6%) e Auxacolor (78,6%) [77]. Também em estudos de identificação de *Rhodotorula* spp. o sistema ID32C com teste de assimilação de nitrato, apresentou 90,3% de identificação correta [66]. A caracterização bioquímica pelo sistema Vitek não permitiu a distinção entre espécies de *Rhodotorula*, tendo sido apenas fornecida a identificação dos isolados como *Rhodotorula glutinis/mucilaginosa*.

Em suma, a identificação das leveduras foi alcançada por métodos bioquímicos e corroborada por métodos de identificação molecular, resultando em 15 leveduras de 12 casos clínicos. Por entre as 15 leveduras isoladas: 12 (80%) leveduras de *Rhodotorula mucilaginosa/glutinis*; 3 (20%) leveduras de *Candida*: 1 *Candida famata*; 1 *Candida albicans*; 1 *Candida parapsilosis*, figura 10. Nesta investigação denotou-se 3 casos de infeção múltipla por *Candida* e *Rhodotorula*; de forma similar na literatura já foi descrito a presença de *Rhodotorula* em amostras vaginais [78], assim como em casos clínicos de CVV [79]–[81].

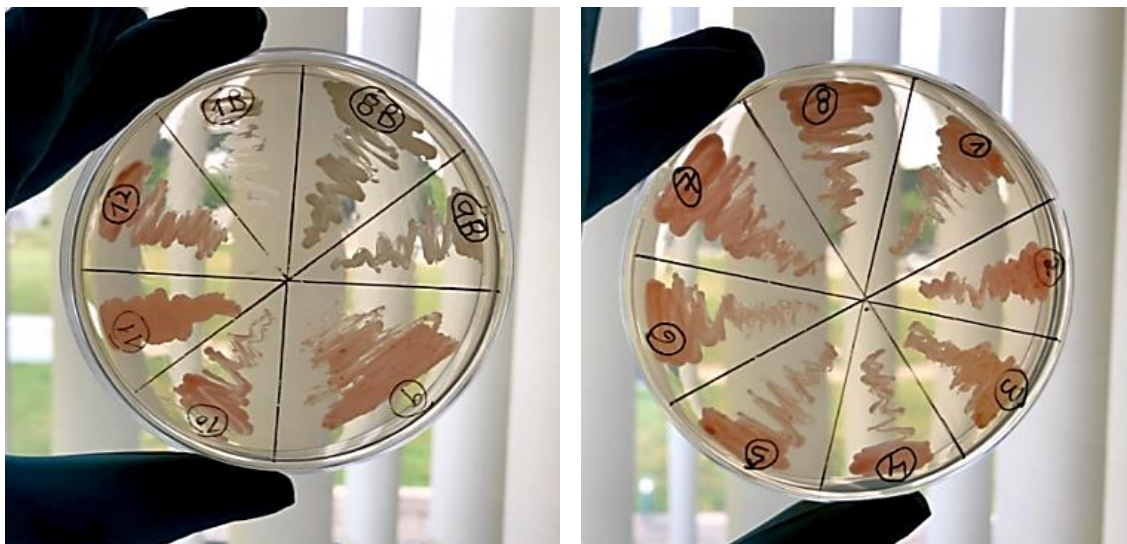


Figura 10 - Isolados Clínicos identificados presentes no estudo. À esquerda: 1B/8B/9B - isolados de *Candida* spp e de 9 a 12 - isolados de *Rhodotorula* spp. À direita de 1 a 8 isolados de *Rhodotorula* spp.

4.2 Testes de Suscetibilidade

Nesta investigação 12 isolados de *Rhodotorula* e 3 de *Candida* foram alvo de testes de sensibilidade antifúngica *in vitro* com fluconazol de acordo com as diretrizes do CLSI, descrito no documento M27-A3.

Em virtude de existirem poucas publicações que denotem o teste de suscetibilidade *in vitro* de estirpes de *Rhodotorula* com um método padronizado, é consensual na literatura que estas sejam testadas de forma confiável pelo protocolo do CLSI [52], [82], [83]. Este que está adaptado e padronizado para várias espécies de *Candida*.

Nos isolados de *Rhodotorula*, testes como a determinação de UFC bem como a determinação das condições ótimas de crescimento em meio líquido foram previamente determinadas; os resultados estão representados nas figuras 11 e 12 respetivamente.

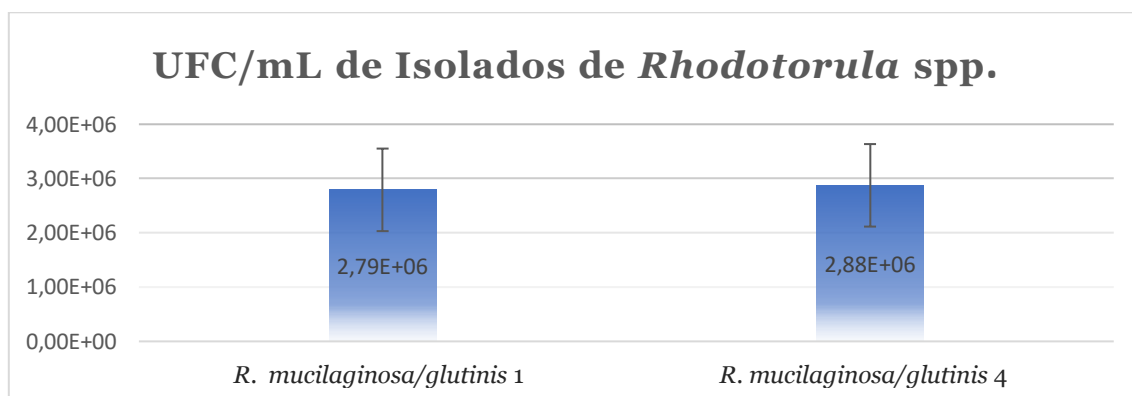


Figura 11 - Representação gráfica dos resultados de UFC/mL de 2 isolados de *Rhodotorula* (MA1 e MA4).

Através dos resultados apresentados na figura 11, foi possível determinar que uma suspensão de 0,5 *McFarland* corresponde a aproximadamente $2,8 - 2,9 \times 10^6$ UFC/mL de *R. mucilaginosa / glutinis*. Estes valores são concordantes com os valores do CLSI presentes no documento MA27-A3, no qual uma suspensão de células com uma densidade ótica ajustada a 0,5 *McFarland* corresponde a um intervalo de 1×10^6 a 5×10^6 células por mL de suspensão [84].

Relativamente à determinação das condições ótimas de crescimento de *Rhodotorula*, os parâmetros de temperatura de incubação e meio de cultura líquido adequado que permitisse um crescimento conveniente das leveduras em suspensão foram considerados. Deste modo; os meios de cultura líquidos YPD e RPMI1640 foram utilizados.

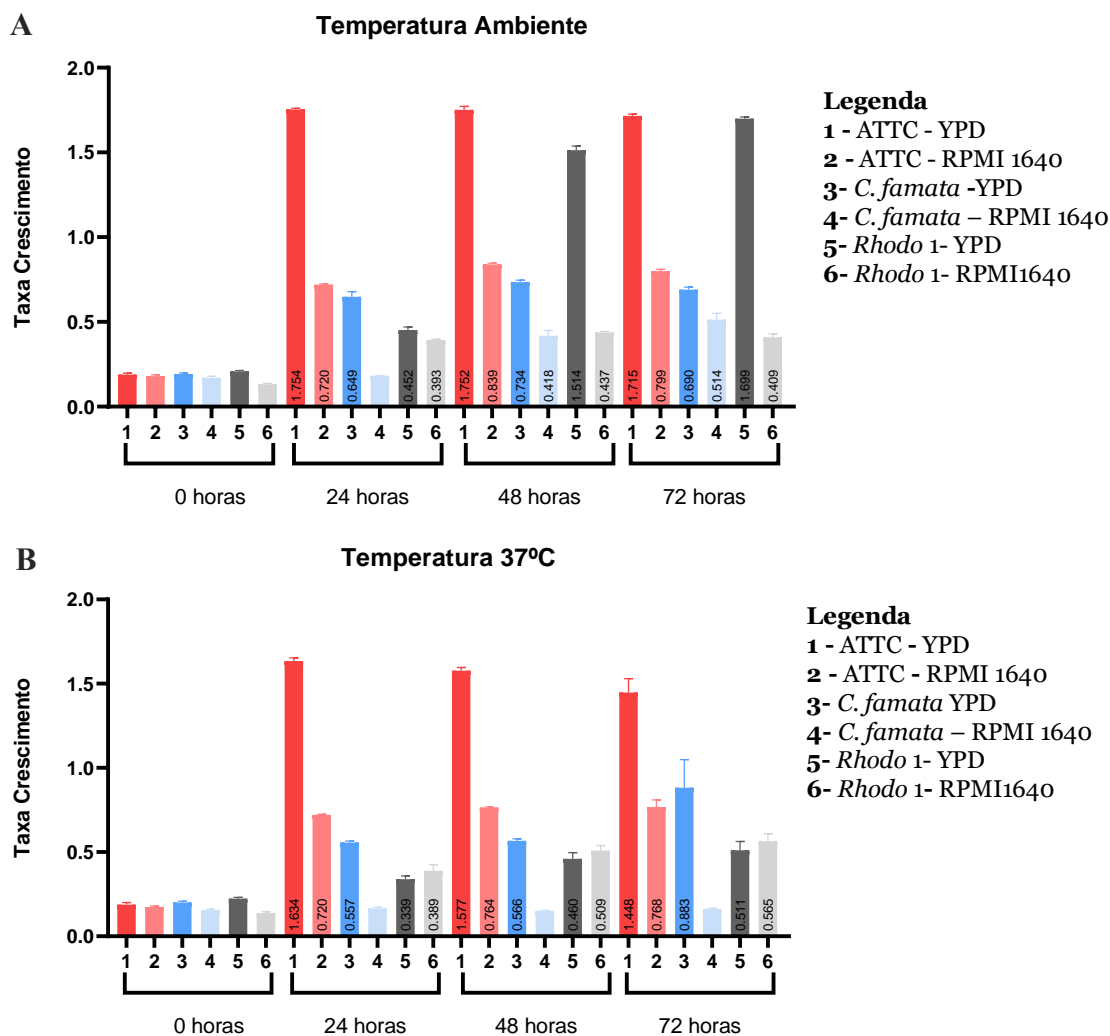


Figura 12 - Crescimento microbiológico de 1 isolado de *Rhodotorula*, *Candida famata*, e ATCC 10231. Período de Incubação máximo de 3 dias, em meio de cultura YPD e RPMI. Em A, Temperatura Ambiente, em B, Temperatura de 37°C

Perante os resultados de crescimento de diferentes isolados a duas temperaturas distintas em meios de cultura líquido quimicamente diferentes foi possível constatar que apesar de o meio líquido RPMI 1640 ser um meio de cultura padrão e a maioria dos testes de referência serem realizados com recurso a este, foi visível a discrepância de taxa de crescimento do isolado de *R. glutinis / mucilaginosa* (barra nº6) comparativamente à taxa de crescimento da estirpe de controlo de qualidade, ATCC 10231 – *C. albicans* (barra nº2), o isolado de *Rhodotorula* teve crescimento inferior em meio de cultura líquido padrão – RPMI 1640 comparativamente com o controlo interno, ATCC 10231 nas 3 temperaturas distintas (temperatura de 30°C em anexos). À temperatura de 37°C, discrepâncias de crescimento são facilmente observáveis entre a estirpe de controlo (barra nº1) e o isolado de *Rhodotorula* (barra nº5) na figura 12B, sugerindo taxas de crescimento inferiores em meio líquido YPD a 37°C no isolado de *R. glutinis / mucilaginosa*.

As diferentes taxas de crescimento observadas assentam no facto de: o meio de cultura líquido YPD ser mais nutritivo comparativamente ao meio RPMI 1640; e relativamente à temperatura de crescimento: microrganismos de *Rhodotorula glutinis/mucilaginosa* possuírem uma temperatura ideal de crescimento *in vitro* compreendida entre os 18 e 22°C, a taxa de multiplicação destas leveduras é limitado em temperaturas superiores a 33°C [45].

Assim, de modo a favorecer o crescimento de *Rhodotorula* em cultura líquida para a realização dos testes de suscetibilidade a antifúngicos *in vitro*, foram incluídas pequenas modificações: utilização de meio de cultura YPD como meio de preparação de inóculos e como meio de crescimento líquido, e temperatura de incubação de microplacas em teste à temperatura ambiente. Esta última modificação não foi condizente com os dados encontrados na literatura respetivos ao teste de suscetibilidade a antifúngicos por microdiluição em caldo, nos quais a temperatura de incubação das microplacas foi de 30°C / 35°C [54], [66], [67].

Os resultados do teste de suscetibilidade antifúngica *in vitro* de 12 isolados de *Rhodotorula* com fluconazol encontram-se na figura 13 e 14. Os valores obtidos para as concentrações mínimas inibitórias da estirpe de controlo *C. albicans* ATCC10231 estiveram de acordo com o controlo interno do laboratório.

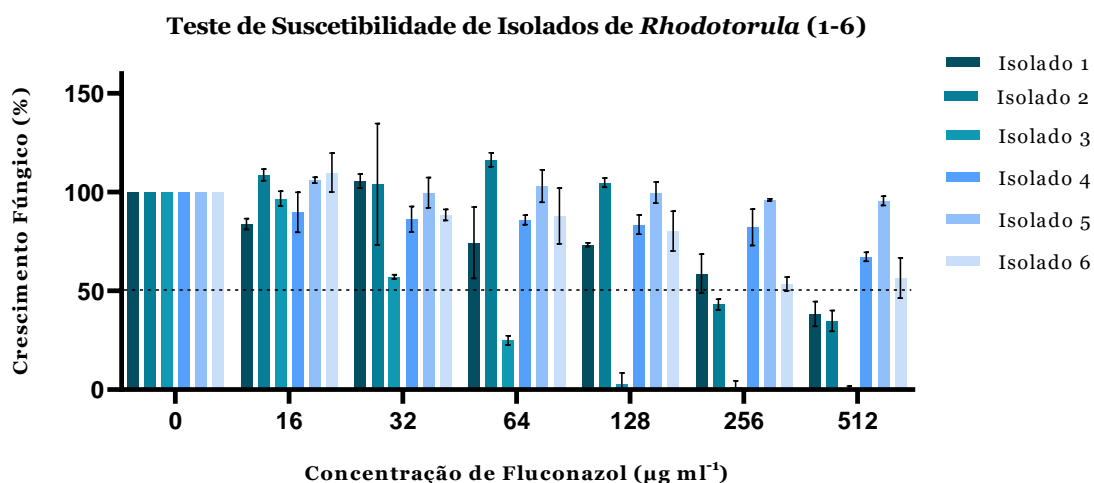


Figura 13 – Resultados do Teste de Suscetibilidade de Isolados (1-6) de *Rhodotorula* com fluconazol. (--) Valor de referência de 50% de crescimento fúngico.

O crescimento das estirpes de leveduras foi expresso em percentagem (%) em relação ao controlo de crescimento de levedura. Nos resultados obtidos de acordo com o documento MA27-A3, MIC₅₀ define-se como a concentração mínima inibitória que inibe 50% do crescimento fúngico, considerando como valor de referência o valor do controlo de crescimento da estirpe, deste modo observou-se que o crescimento dos isolado 1 foi inibido a uma MIC₅₀ de 512 µg/ mL; o crescimento do isolado 2 foi inibido a uma MIC₅₀ de 256 µg /mL ; o isolado 3 foi o que apresentou menor resistência face a fluconazol, onde o crescimento foi inibido a uma MIC₅₀ de 64 µg/ mL; os isolados 4,5 e 6 foram resistentes às concentrações máximas testadas.

Teste de Suscetibilidade de Isolados de *Rhodotorula* (7-12)

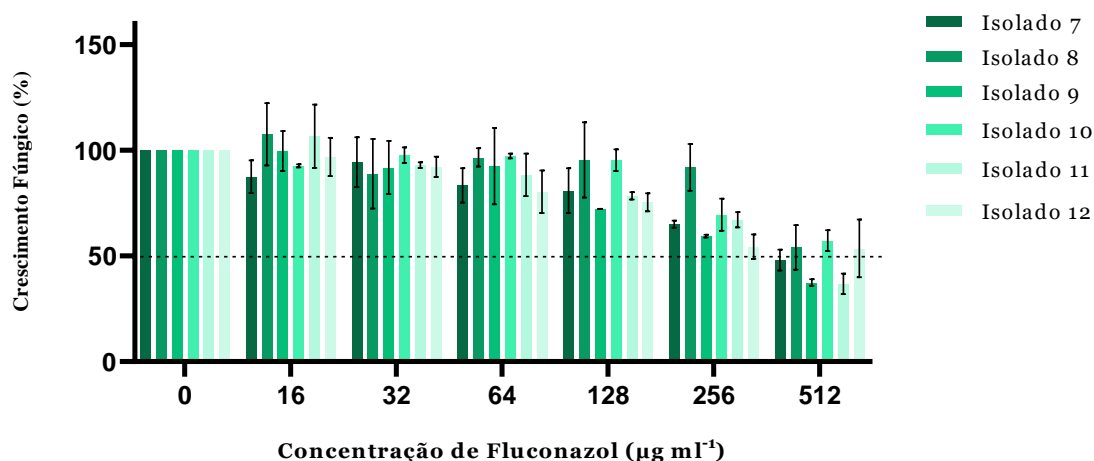


Figura 14 – Resultados do Teste de Suscetibilidade de Isolados (7-12) de *Rhodotorula* com fluconazol. (--) Valor de referência de 50% de crescimento fúngico.

No segundo conjunto de resultados de suscetibilidade antifúngica *in vitro* face a fluconazol, foi possível verificar resistência nos isolados 8/10 e 12, onde não apresentaram diminuição de 50% crescimento nas concentrações testadas. Deste modo, apenas os isolados 7/9 e 11 apresentaram redução de crescimento em 50% a uma MIC₅₀ de 512 µg/ mL de fluconazol.

Adicionalmente, nesta investigação 3 isolados de *Candida* foram também alvo de testes de suscetibilidade antifúngica *in vitro* com fluconazol, de acordo com as diretrizes de CLSI descrito no documento M27-A3. Os resultados do teste de suscetibilidade antifúngica *in vitro* dos 3 isolados de *Candida* com fluconazol encontram-se na figura 15.

Teste de Suscetibilidade de Isolados de *Candida*

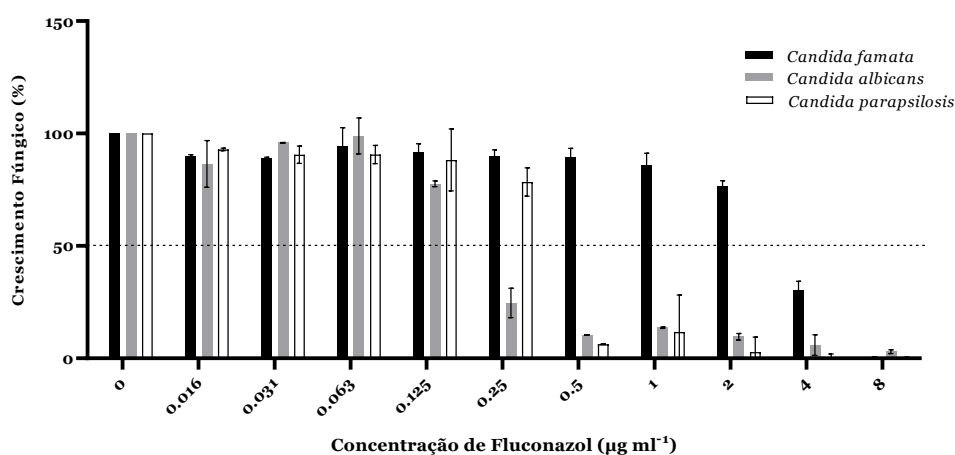


Figura 15 – Resultados do Teste de Suscetibilidade de Isolados de *Candida*, com fluconazol. (--) valor de referência de 50% de crescimento fúngico.

Através dos resultados obtidos, observou-se que o crescimento de *Candida albicans* foi inibido a uma MIC₅₀ de 0,25 µg/ mL de fluconazol. As espécies NAC, *C. parapsilosis* e *C. famata*, o seu crescimento foi inibido a uma MIC₅₀ de 0,5 µg/ mL e 4 µg/ mL, respetivamente.

Tabela 14 – (Em cima): Breakpoints definidos de Fluconazol para *Candida* spp.. Adaptado de CLSI, M60, 2ª edição 2020. Legenda: (S) suscetível; (I) intermediária; (SDD) suscetível dependente da dose; (R) resistente; (MIC) “Concentração Mínima Inibitória”. (Em baixo): resultados obtidos do teste de suscetibilidade de isolados de *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*.

Agente Antifúngico	Espécies	MIC Breakpoints e Categorias Interpretativas, µg/mL			
		S	I	SDD	R
Fluconazol	<i>C.albicans</i>	≤2	-	4	≥8
	<i>C.parapsilosis</i>	≤2	-	4	≥8

Espécies	Nº de Estirpes	Procedimento	MIC		
			Fluconazol (48h)		
			S	SDD	R
<i>C. albicans</i>	1	CLSI	1	0	0
<i>C. parapsilosis</i>	1	CLSI	1	0	0

Os resultados obtidos dos testes de suscetibilidade antifúngica *in vitro* com diferentes concentrações de fluconazol nos diferentes isolados *Candida* spp. encontram-se sumarizados na tabela 14. Na diretriz mencionada não constam MIC -breakpoints estabelecidos para *Candida famata* bem como MIC – breakpoints definidos para o género *Rhodotorula*.

Os isolados de *Candida* não apresentaram resistência ao fluconazol, *Candida albicans* e *Candida parapsilosis* foram suscetíveis, em isolados de *Rhodotorula* (n=12), a grande maioria dos isolados apresentou valores de MIC de ≥64 µg/mL. Os resultados obtidos estão maioritariamente de acordo com os resultados presentes em outros estudos de suscetibilidade a fluconazol [32], [37], [67]. Mais se conclui que, espécies NAC apresentaram um ligeiro acréscimo de resistência ao composto antifúngico em estudo, tendo-se obtido um valor de MIC superior comparativamente com o valor de MIC obtido para *Candida albicans*.

Define-se resistência microbiológica à não suscetibilidade de um fungo a um agente antifúngico por meio de testes de suscetibilidade *in vitro*, em que se verifica que o MIC do medicamento excede o breakpoint de suscetibilidade para esse microrganismo. De forma sucinta, a resistência microbiológica pode ser classificada em primária (intrínseca) e em secundária (adquirida). O primeiro tipo de resistência consiste em mecanismos de resistência naturais de um género ou espécie; o segundo tipo de resistência resulta na aquisição de resistência (por exemplo: uma estirpe previamente sensível desenvolve resistência ao antifúngico após exposição a este, por meio de alterações genotípicas) [85]. Mecanismos de resistência a antifúngicos de *Candida* spp. estão amplamente bem documentados na literatura, contrariamente a mecanismos de resistência de *Rhodotorula* spp. que se encontram ainda mistificados.

Os principais mecanismos de resistência a fármacos azólicos em *Candida* são: **a)** alteração da concentração intracelular de fármacos, pela ativação de bombas de efluxo provocando a diminuição de fármaco no local de ação; **b)** alterações na enzima 14- α - desmetilase, b1) redução da afinidade fármaco-alvo, provocada por alterações no local de ligação do fármaco à enzima através de mutações no gene *ERG11*, causando a diminuição de afinidade da enzima alvo para os azóis ou b2) produção aumentada de enzima alvo, provocada pela sobre expressão do gene *ERG11*, resultando no aumento de enzimas alvo, conduzindo à necessidade de maiores concentrações intracelulares de fluconazol para inibir todas as enzimas alvo na célula [39], [85], [86]. Assim, em concordância com os mecanismos de ação do fluconazol sobre *Candida*, a determinação da MLC (tabela 15) revelou que o fluconazol tem um efeito fungistático contra os isolados clínicos testados. De outro modo, e apesar do mecanismo de ação dos compostos azólicos contra *Rhodotorula* não estar ainda bem definido, neste estudo é perceptível que o efeito do fluconazol é um efeito fungistático, e, portanto, apenas inibitório do crescimento de *Rhodotorula*.

Tabela 15 - Comparação de MIC Visual e MLC obtidas com fluconazol em isolados de *Candida* e *Rhodotorula*.

Isolado	Espécie	MIC Visual $\mu\text{g}/\text{mL}$	MLC $\mu\text{g}/\text{mL}$	Classificação
1 / 2	<i>R. mucilaginosa/ glutinis</i>	>512	-----	-----
3	<i>R. mucilaginosa/ glutinis</i>	128	256	Fungistático
4 -12	<i>R. mucilaginosa/ glutinis</i>	>512	-----	-----
	<i>Candida famata</i>	4	>8	Fungistático
	<i>Candida albicans</i>	0,125	>0,25	Fungistático
	<i>Candida parapsilosis</i>	0,25	>0,5	Fungistático

4.3 Caracterização Fenotípica

Nesta investigação pretendeu-se avaliar a estabilidade fenotípica das leveduras em estudo através de estímulos realizados em ambiente laboratorial. Inoculações dos isolados foram realizadas em 4 meios de cultura sólidos quimicamente distintos comumente encontrados nos laboratórios de microbiologia. Por conseguinte, inoculações dos isolados foram efetuadas em meio de cultura *Starch Agar*; *Cornmeal Agar*; *Potato Dextrose Agar* (PDA) e *Sabourad Dextrose Agar* (SDA), as placas de cultura foram incubadas de forma independente a duas temperaturas distintas: temperatura ambiente (definida entre 18 e 22°C) e a temperatura de 37°C. Ao 3º e 10º dia após inoculação, as características individuais de cada isolado foram avaliadas.

4.3.1 - Caracterização Morfológica Macroscópica do Isolado 4 – *Rhodotorula mucilaginosa* / *glutinis*

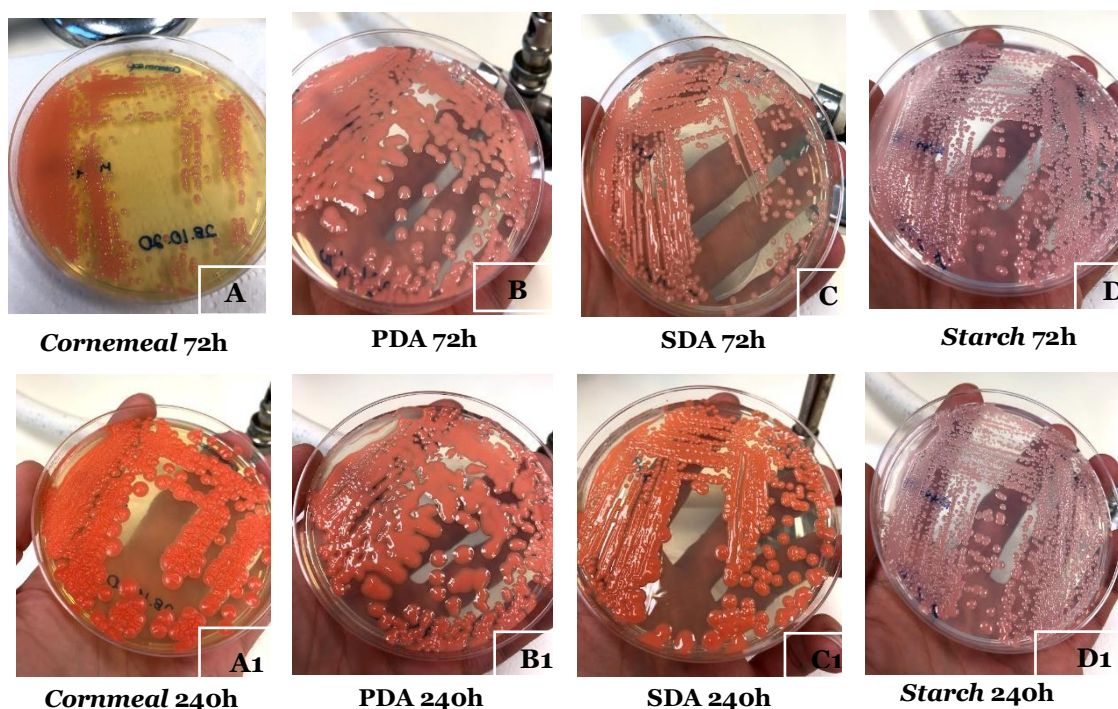


Figura 16 - Morfologia de Culturas do Isolado 4 - *Rhodotorula mucilaginosa* / *glutinis* em meio *Cornmeal*, *PDA*, *SDA* e *Starch*. Incubação à temperatura ambiente, caracterização ao 3º e 10º dia após inoculação.

Através da análise dos resultados obtidos através da inoculação do isolado 4 – *R. mucilaginosa* / *glutinis* nos diferentes meios de cultura sólidos observou-se que: após 72 horas de incubação (figura 16 A – D), crescimento microbiano foi detetado em todos os meios de cultura utilizados; maior taxa de crescimento microbiano foi observada em meio *PDA*, taxas de crescimento microbiano intermédio foi observado em meio *Cornmeal* e *SDA*; e taxas de crescimento inferiores foram observadas em meio *Starch Agar*, apesar de não ser perceptível a diferença de crescimento na figura 16-D.

Fenotipicamente e de forma transversal aos meios de cultura sólidos utilizados, as colônias apresentaram forma circular e cor rosa, com alguma elevação e margem inteira com aspeto mucoide opaco e com brilho.

Após 240 horas de incubação à temperatura ambiente (figura 16 A1 – D1), o mesmo isolado apresentou taxas de crescimento em placa de meio sólido semelhantes, cerca de 90 – 95% das placas de *Petri* encontravam-se “preenchidas”, ainda assim, o crescimento microbiano foi ligeiramente superior em meio de cultura sólido de *Cornmeal*, PDA e SDA (figura 16 A1, B1, C1) comparativamente com o crescimento microbiano observado em *Starch Agar* (figura 16, D1). Fenotipicamente, em meio de cultura *Cornmeal*, PDA e SDA (figura 16, A1, B1, C1) as colônias de forma circular desenvolveram uma elevação convexa, nomeadamente em *Cornmeal* e SDA, bem como o aumento do diâmetro de colônias, parâmetro não avaliado por métodos quantitativos. Aspeto mucoide opaco e com brilho foi detetado apenas em PDA, SDA e *Starch*. As colônias com 240 horas de incubação em *Cornmeal*, não apresentaram brilho à luz visível (figura 16, A1).

4.3.2 - Caracterização Morfológica Macroscópica do Isolado 8B – *Candida albicans*

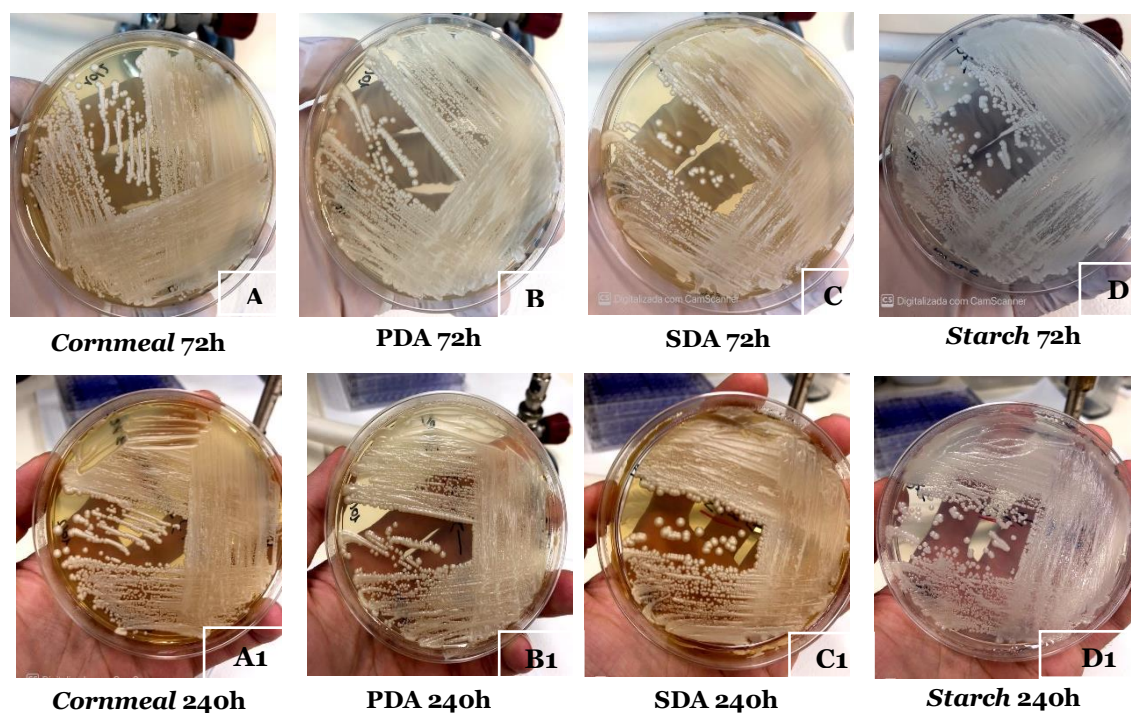


Figura 17 - Morfologia de Culturas do Isolado 8B - *Candida albicans* em meio *Cornmeal*, PDA, SDA e *Starch*. Incubação à 37°C, caracterização ao 3º e 10º dia após inoculação.

De forma similar à caracterização morfológica macroscópica dos isolados de *Rhodotorula*, os resultados obtidos através da inoculação do isolado de *Candida albicans* nos diferentes meios de cultura sólidos permitiram concluir que; após 72 horas de incubação a 37°C de temperatura (figura 17 A – D), crescimento microbiano foi detetado em todos os meios de cultura utilizados.

No isolado de *Candida albicans* as taxas de crescimento microbiano foram semelhantes nos diferentes meios, tais observações não foram detetadas nos isolados *Candida famata* e *Candida parapsilosis* que exibiram menores taxas de crescimento em meio *Starch Agar*.

Fenotipicamente e de forma transversal aos meios de cultura sólidos utilizados, as colónias apresentaram forma circular e cor branca, com alguma elevação e margem inteira com aspeto cremoso opaco e sem brilho.

Após 240 horas de incubação a 37°C de temperatura (figura 16 A1 – D1), o isolado apresentou taxas de crescimento em placa, transversal aos diferentes meios testados, cerca de 90 – 95% das placas de *Petri* encontravam-se “preenchidas”. Fenotipicamente, em meio de cultura *Cornmeal*, PDA e SDA (figura 17, A1/B1/C1) as colónias de forma circular e cor branca desenvolveram uma elevação convexa, nomeadamente em *Cornmeal* e SDA, bem como o aumento do diâmetro de colónias, parâmetro não avaliado por métodos quantitativos. Aspeto cremoso opaco e com brilho foi detetado após 240h de incubação em *Cornmeal*, PDA, SDA e nomeadamente em *Starch* (figura 17, D1).

Os meios de cultura sólidos utilizados para a avaliação das características fenotípicas distinguem-se pela sua composição bem como a finalidade de uso pretendida. Deste modo *Cornmeal Agar* é um meio usado para a cultura de numerosos fungos filamentosos e identificação de *Candida albicans* com base na formação de clamidósporos, pH 5,6 – 6,0 a 25°C, é um meio natural composto de substratos naturais – sêmola de milho. Peptona e sêmola de milho, ingredientes fonte de nitrogénio e vitaminas necessárias para o crescimento de microrganismos [87]. PDA é um meio usado para o cultivo e geralmente contagem de leveduras e fungos filamentosos (bolors) de alimentos, pH 5,6 ± 0,2 a 25°C; composto maioritariamente de dextrose e extrato de batata, dextrose é fonte de hidratos de carbono que funciona como um estimulante de crescimento enquanto o extrato de batata fornece uma base nutritiva para o crescimento exuberante de fungos [87]. SDA é um meio de cultura seletivo usado principalmente para o isolamento de fungos, o pH ácido (5,0 ± 0,6) inibe o crescimento da maioria das bactérias. SDA é composto por digestão enzimática de caseína e tecidos animais que fornecem uma fonte nutritiva de aminoácidos essenciais para o crescimento de fungos e leveduras, dextrose é um hidrato de carbono incorporado em altas concentrações, é uma fonte de carbono e energia [87]. Por fim, *Starch* (-amido) Agar, é um meio usado para a cultura de uma variedade de microrganismos com base na produção de amílase, pH 7,5 ± 0,2 a 25°C; composto por extrato de carne, fonte de diversos aminoácidos, vitaminas e minerais, amido solúvel que enriquece o meio para os microrganismos que possuem amílases e que conseqüentemente degradam o amido nas suas moléculas componentes de glucose [87], [88].

A observação de crescimento, ainda que variável, em tais meios de cultura sólidos (figura 16 e 17) evidenciam a capacidade adaptativa dos diferentes isolados a díspares fontes de carbono, nitrogénio e vitaminas.

O crescimento inferior da população microbiana de *Rhodotorula* spp. e ligeiramente superior de *Candida* spp. em meio *starch agar*, está intrinsecamente relacionado com o facto de as células não terem açúcar prontamente disponível no meio de cultura e desaceleram o crescimento, existe ainda a necessidade de produção (acrescida) de amílases que conferem atividade enzimática para a degradação de amido em açúcares simples, secreções de amílases são realizadas fora das células de levedura para ocorrer digestão extracelular.

Apesar de estas enzimas serem encontradas naturalmente em células de é necessário tempo para a produção suficiente de amilases para ocorrer a hidrólise significativa de amido [88].

Descrito por El-Fallal *et al.*, (2012), leveduras amilolíticas diferem entre si relativamente à secreção de amilases e à extensão da hidrólise do amido, por conseguinte, visível na figura 18 denota-se a presença de halo ao redor do crescimento microbiológico de colónias de *Candida albicans*, mas não de *Rhodotorula mucilaginosa / glutinis* [88].

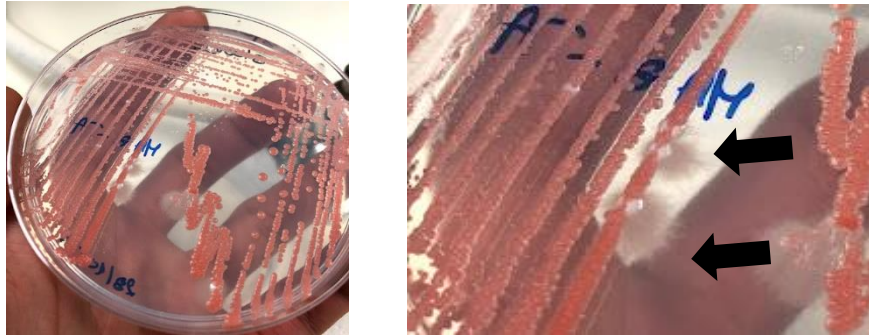


Figura 18 - Leveduras de *Rhodotorula mucilaginosa / glutinis* e *Candida albicans* em meio starch agar, com período de incubação de 240 horas à temperatura ambiente.

No que concerne à temperatura de incubação, foi possível observar ainda que os isolados de *Rhodotorula* spp. apresentaram na generalidade crescimento microbiológico abundante à temperatura ambiente nos meios de cultura testados, assim como *C. famata*; contudo o crescimento microbiológico destas leveduras a 37°C foi diminuído. Estas observações são compatíveis com o descrito na literatura onde por Herbert Hof (2019), o intervalo ótimo de temperatura para o crescimento de *R. mucilaginosa / glutinis* foi definido entre os 22 e 28°C de temperatura, e por Sibirny *et al.*, (2009) o intervalo ótimo de temperatura para o crescimento de *Candida famata* foi definido entre os 25 e 28°C de temperatura [89]. À temperatura ambiente e a 37°C observou-se crescimento microbiológico abundante nos meios de cultura testados em isolados de *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*; estas observações são de igual modo compatíveis com os intervalos de temperatura de crescimento descritas na literatura [90], [91].

Após a realização dos estímulos em ambiente laboratorial a análise do perfil bioquímico de cada isolado por sistema automatizado - Vitek® foi realizado, contudo não foi detetada nenhuma diferença de identificação através do perfil bioquímico das estirpes expostas aos estímulos comparativamente às estirpes nativas.

4.4 Caracterização Genotípica

O término desta investigação teve como ensaio a caracterização molecular de 4 dos isolados, nomeadamente, dos perfis de amplificação obtidos dos isolados expostos aos estímulos laboratoriais referidos, através da técnica RAPD-PCR com recurso ao *primer* universal M13. Consequentemente realizou-se a análise dos perfis de amplificação obtidos ao 3º e 10º dia de alguns dos isolados, nas diversas temperaturas. À semelhança da caracterização fenotípica, a caracterização genotípica dos isolados é sumarizada na presente secção, com ligeira extensão do isolado 5 de *R. mucilaginosa / glutinis* e do isolado de *Candida parapsilosis*, os perfis de amplificação encontram-se nas figuras 19 e 20, respetivamente.

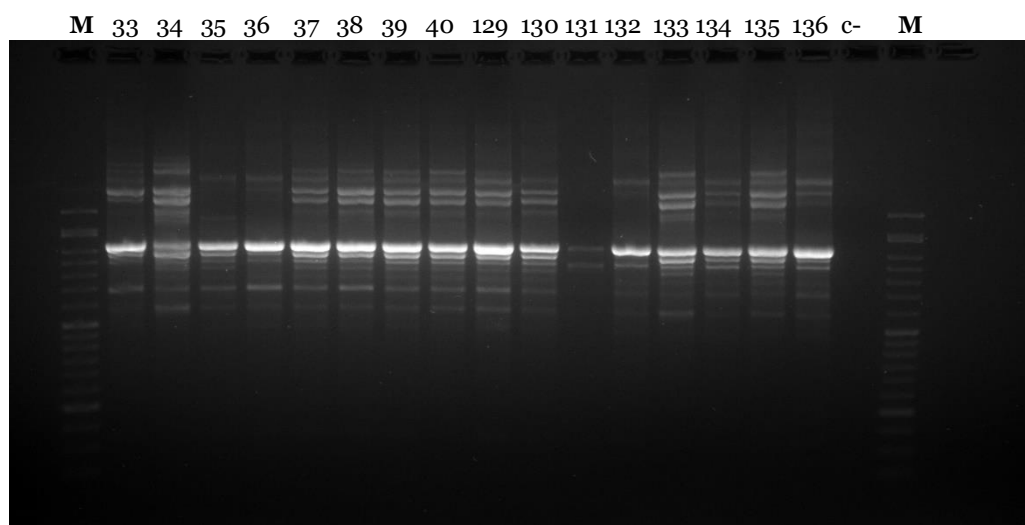


Figura 19 - Perfis de amplificação RAPD do isolado 5 de *R. mucilaginosa / glutinis* com 0,3 µL de *primer* M13. M, marcador de peso molecular; 33-40 incubação de 3 dias; 33 meio de cultura SDA T. ambiente; 34, meio de cultura SDA T. 37°C; 35, meio de cultura Starch T. ambiente; 36, meio de cultura Starch T. 37°C; 37, meio de cultura cornmeal T. ambiente; 38, meio de cultura cornmeal T. 37°C; 39, meio de cultura PDA T. ambiente; 40, meio de cultura PDA T. 37°C. 129-136 incubação de 10 dias; 129 meio de cultura SDA T. ambiente; 130, meio de cultura SDA T. 37°C; 131, meio de cultura Starch T. ambiente; 132, meio de cultura Starch T. 37°C; 133, meio de cultura cornmeal T. ambiente; 134, meio de cultura cornmeal T. 37°C; 135, meio de cultura PDA T. ambiente; 136, meio de cultura PDA T. 37°C; C-, controlo negativo.

A estabilidade/integridade de DNA pode ser avaliada através da análise dos padrões de amplificação em gel de agarose. A presença de DNA sem manchas de arrastamento – *smears* no gel, assim como bandas de DNA fortes e claras, sugerem estabilidade /integridade do DNA [92]–[94].

Através dos resultados obtidos da amplificação do isolado 5 é possível concluir que na generalidade nos perfis de amplificação resultantes, denota-se a presença de bandas claras, intensas e com ausência de arrastamento nomeadamente nos perfis com 3 dias de incubação (perfis 33-40), sugerindo assim integridade / estabilidade de DNA nas condições testadas. Contudo, nos perfis de amplificação obtidos da extração de DNA genómico ao 10º dia (perfis 129 até 136) é possível observar um ligeiro esbatimento generalizado das bandas de amplificação, sugerindo ligeira instabilidade de DNA nas condições testadas.

A exceção ao referido anteriormente é o perfil de amplificação nº131 (*Starch*, Temp. Ambiente, 10 dias de incubação) onde as bandas de amplificação obtidas foram muito ténues.

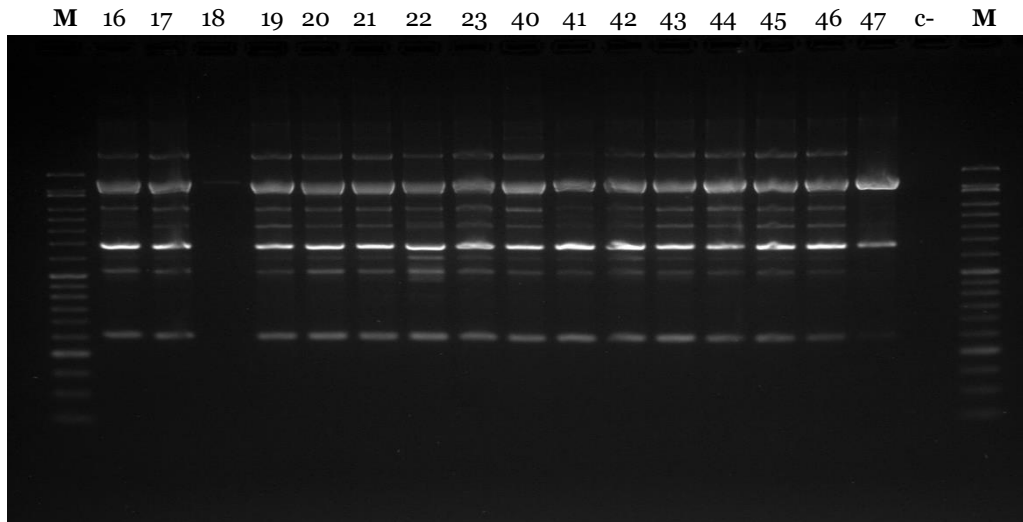


Figura 20 - Perfis de amplificação RAPD do isolado 9B de *Candida parapsilosis* com 0,3 μ L de primer M13. M, marcador de peso molecular; 16-23 incubação de 3 dias; 16 meio de cultura SDA T. ambiente; 17, meio de cultura SDA T. 37°C; 18, meio de cultura Starch T. ambiente; 19, meio de cultura Starch T. 37°C; 20, meio de cultura cornmeal T. ambiente; 21, meio de cultura cornmeal T. 37°C; 22, meio de cultura PDA T. ambiente; 23, meio de cultura PDA T. 37°C. 40-47 incubação de 10 dias; 40 meio de cultura SDA T. ambiente; 41, meio de cultura SDA T. 37°C; 42 meio de cultura Starch T. ambiente; 43, meio de cultura Starch T. 37°C; 44, meio de cultura cornmeal T. ambiente; 45, meio de cultura cornmeal T. 37°C; 46, meio de cultura PDA T. ambiente; 47, meio de cultura PDA T. 37°C.

Através da análise dos resultados, na generalidade dos perfis de amplificação obtidos denota-se a presença de bandas claras e intensas sugerindo integridade / estabilidade de DNA nas condições testadas. Ligeiras alterações na conformação das bandas são visíveis nos perfis de amplificação n^{os} 17, 23 e 45; tais observações podem estar relacionadas com as condições de realização da corrida de eletroforese em gel horizontal de agarose. Ausência de perfil de amplificação foi detetado na amostra n^o18, onde *de novo*, incubação em meio *starch*, T. ambiente, contudo com 3 dias de incubação do isolado de *Candida parapsilosis*.

A RAPD é uma técnica de amplificação de DNA polimórfico amplificado aleatoriamente e constitui uma técnica útil para o estudo de polimorfismos genéticos do DNA [95]. Através dos resultados obtidos na tipagem molecular do isolado de *Candida parapsilosis* nos diferentes meios de cultura, a duas temperaturas distintas, em dois períodos temporais, denota-se um comportamento semelhante transversal nas condições testadas, onde permanece um elevado grau de similaridade nos perfis de amplificação obtidos. Tais observações são ligeiramente discrepantes nos perfis de amplificação obtidos na tipagem molecular do isolado 5 de *R. mucilaginosa* / *glutinis* onde se verifica ligeiras alterações de padrões de amplificação nas condições testadas. Nomeadamente nos perfis n^{os} 35, 36 e 131, 132, correspondentes a incubação em meio de cultura *starch*, denota-se a “perda” de alguns padrões comparativamente com os outros meios de cultura. Tais discrepâncias podem estar intrinsecamente relacionadas com a capacidade adaptativa do isolado em questão em meio de cultura *Starch* com fatores nutricionais distintos.

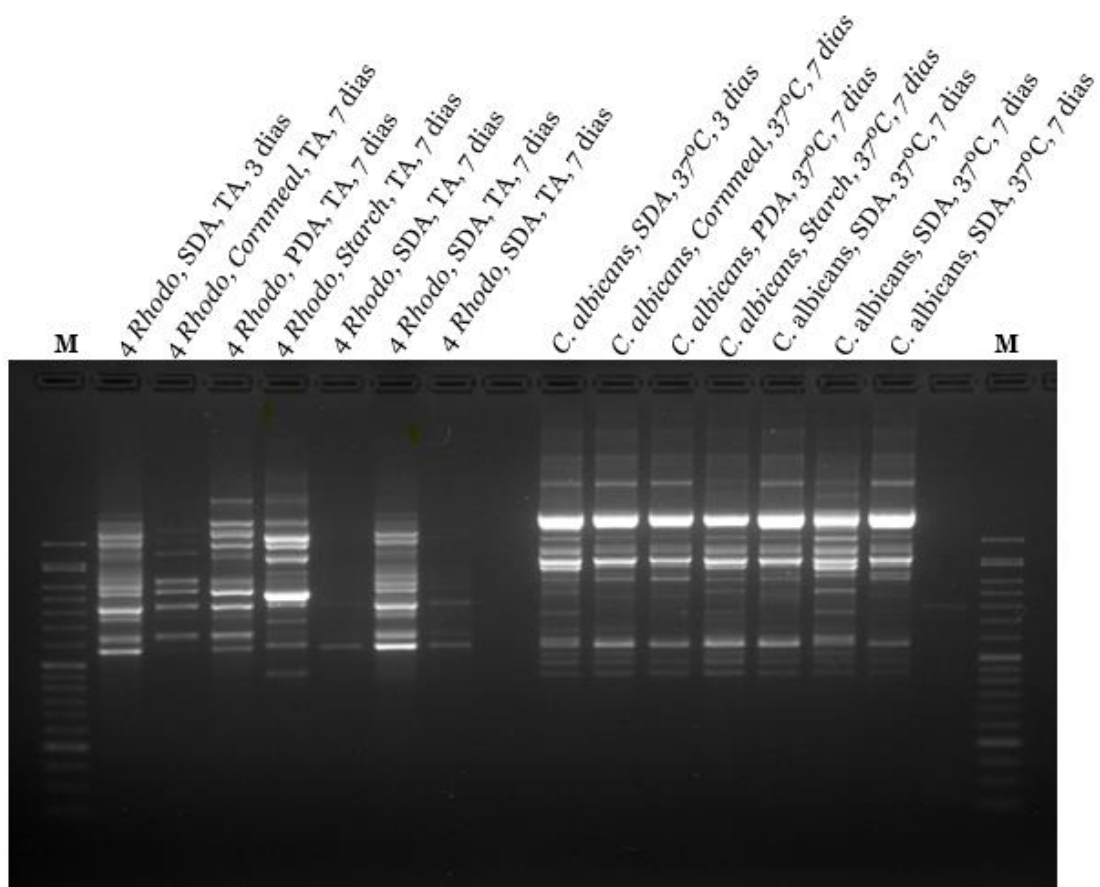


Figura 21 - Perfis de amplificação RAPD do isolado 4 de *Rhodotorula glutinis/mucilaginosa* e de *Candida albicans* com 0,3 μ L de primer M13. M, marcador de peso molecular.

Com o intuito de averiguar possível relação entre os perfis de amplificação obtidos do isolado 5 de *R. mucilaginosa / glutinis* e do isolado de *Candida parapsilosis* com os diferentes meios de cultura, foi realizada a tipagem molecular de dois outros isolados, isolado 4 de *R. mucilaginosa / glutinis* nos diferentes meios de cultura à temperatura ambiente, e do isolado de *Candida albicans* nos diferentes meios de cultura à temperatura de 37°C.

Através dos resultados obtidos, representados na figura 21, denotou-se o já constatado anteriormente. Ligeiras alterações de padrões de amplificação de *Rhodotorula mucilaginosa / glutinis* nos diferentes meios de cultura testados. Visível apenas no poço 7, onde se obteve um perfil de amplificação vigoroso de *Rhodotorula* em meio SDA, a temperatura ambiente durante 7 dias, foi possível observar um elevado grau de semelhança comparativamente com o perfil de amplificação obtido no poço 2. Tais observações permitem em parte afirmar a possível relação entre os diferentes perfis de amplificação obtidos relacionados com os diferentes meios de cultura testados, independente do fator temperatura. Consequentemente, tais observações podem efetivamente estar correlacionadas com mecanismos de adaptação que permitam a sobrevivência de *Rhodotorula mucilaginosa / glutinis* em condições que eram até então não ideais ao crescimento microbiano.

Relativamente aos perfis de amplificação gerados de *Candida albicans*, à semelhança de *Candida parapsilosis*, este género apresenta maior similaridade entre os perfis de amplificação em diferentes condições, o que em parte se pode traduzir em menores alterações necessárias por parte destes microrganismos para se adaptarem a diferentes meios de cultura.

Por último, diferenças significativas foram detetadas nos valores obtidos nas concentrações de DNA genómico extraído em meio *starch* comparativamente com os outros meios de cultura. Por conseguinte o valor médio da concentração de DNA extraído das culturas em SDA: 131,8 ng/μL; PDA: 175 ng/μL; *Cornmeal*: 155,75 ng/μL e em *Starch*: 74,8 ng/μL. Uma vez que o método de lise celular foi padronizado e não ocorreu qualquer tipo de alteração no protocolo ou soluções de lise utilizadas, as diferenças no rendimento de concentração de DNA extraído podem residir em alterações a nível de membrana / parede celular das leveduras em meio de cultura *Starch*. Estas observações não são totalmente corroboradas por fundamentos teóricos dada a escassez de dados teóricos com metodologia ou microrganismos semelhantes. Contudo testes adicionais são necessários para possíveis conclusões.

Capítulo 5 – Conclusões e Perspetivas Futuras

A prevalência de micoses causadas por fungos emergentes é um problema crescente na área da saúde, especialmente as micoses invasivas. A epidemiologia de agentes patogénicos capazes de colonizar e provocar infeção é motivo de grande preocupação e debate na comunidade científica bem como por entre profissionais de saúde. Uma explicação notável para o aumento deste tipo de infeções oportunistas assenta no crescente número de população imunocomprometida que tem como base diversos fatores, entre os quais, HIV, procedimentos cirúrgicos invasivos, transplantes, entre outros. Aditivamente, a resistência antifúngica intrínseca ou adquirida representa um problema de escala global que acarreta diversos problemas face à terapia. *Rhodotorula* e *Candida* são agentes patogénicos oportunistas associados a estados de morbidez (às vezes severa); assim como as taxas de mortalidade preocupantes em indivíduos imunocomprometidos. Fungémia destaca-se pela principal condição debilitante em casos de colonização sistémica por *Rhodotorula* spp. onde este reside como um dos agentes etiológicos da infeção em 2,3% dos casos. A identificação destes géneros emergentes é de extrema urgência, principalmente na rotina hospitalar/laboratorial, pois isto contribui para uma intervenção terapêutica precoce e diminui a frequência de desenvolvimento de resistência antifúngica.

A presente investigação visa contribuir para a identificação de *Candida* e *Rhodotorula*, bem como na determinação dos perfis de suscetibilidade *in vitro* face a compostos tipicamente usados na clínica médica. Adicionalmente características fenotípicas e moleculares foram determinadas.

Como resultados primordiais nesta investigação, observaram-se discrepâncias na identificação dos isolados obtida através do sistema automatizado Vitek® *versus* identificação molecular; tais observações permitem realçar a sensibilidade acrescida de métodos moleculares e reforçar a razão pela qual estes devem ser adotados na prática clínica, especialmente em casos clínicos duvidosos. Contudo os métodos de identificação bioquímicos automatizados, podem em parte ter sido enviesados devido à existência de co-culturas. Nesta investigação não foi possível discriminar as espécies de isolados de *Rhodotorula*. Ao longo desta investigação esta falta de discriminação de espécies não teve qualquer impacto, contudo é um dado extremamente importante em estudos epidemiológicos. De forma a contornar tal cenário, a acoplação futura de testes de assimilação de nitrato neste tipo de sistemas permitiria a distinção entre *Rhodotorula glutinis* (nitrato +) e *Rhodotorula mucilaginosa* (nitrato -).

Outro dado adquirido através dos resultados obtidos e anteriormente discutidos, assenta na importância da determinação de perfis de suscetibilidade de isolados face a medicamentos antifúngicos. No caso particular desta investigação, verificou-se uma taxa elevada de resistência a fluconazol nos isolados de *Rhodotorula*. Este dado reforça ainda a importância e necessidade de identificação do agente etiológico da infeção ao invés da adoção de terapia empírica, nomeadamente em casos de infeção por género *Rhodotorula* que é um fungo intrinsecamente resistente a fluconazol, antifúngico mais utilizado na prática clínica.

Adicionalmente, dada a inexistência de diretrizes específicas relativas aos testes de suscetibilidade em isolados de *Rhodotorula* spp. consideramos imperativo a necessidade de padronização de testes de suscetibilidade *in vitro* face a este tipo de agente patogénicos. O desenvolvimento de uma norma com especificações claras relativas a microrganismos de *Rhodotorula* permitiria a uniformização concisa de técnicas de suscetibilidade adequadas ao microrganismo e conseqüentemente permitiria uma maior base de dados de perfis de suscetibilidade obtidos através de condições padronizadas; de forma complementar, o monitoramento dos perfis de suscetibilidade de confiança face aos antifúngicos, é importante para o conhecimento de padrão de resistência do género.

Outra ilação interessante avaliada nesta investigação, foi a capacidade adaptativa dos isolados de *Rhodotorula* e *Candida* face a diversos estímulos laboratoriais. O desenvolvimento dos microrganismos em meios de cultura com fatores nutricionais distintos juntamente com diferentes condições físicas, elucida as suas capacidades adaptativas, nomeadamente de um metabolismo extremamente versátil que permite a sua adaptação imediata às mudanças no ambiente. A caracterização da estabilidade molecular destes isolados num período de 7 dias reforça ainda a capacidade adaptativa estável dos isolados, ainda que avaliado através de métodos rudimentares. Alternativamente ao método empregado, a análise *fingerprint* da estabilidade genómica pode ser futuramente avaliada por sequenciação genómica por NGS. Os dados obtidos em ambiente laboratorial transpostos para a clínica, podem elucidar o poder patogénico de fungos oportunistas de *Candida* e *Rhodotorula*, uma vez que tais resultados podem ser sinónimos da capacidade de colonização de diferentes nichos no hospedeiro com diferentes fontes nutricionais, e com diferentes condições físicas. Aditivamente ainda na perspetiva clínica e científica, seria futuramente útil averiguar o possível impacto dos diferentes estímulos realizados em testes de suscetibilidade a antifúngicos e produção de biofilme comparativamente com a estirpe nativa. Por último, seria ainda interessante averiguar o possível efeito resultante da degradação de amido na membrana/ parede celular, uma vez que, como anteriormente discutido, os rendimentos de concentração de DNA em meio de amido foram intermediariamente inferiores comparativamente com os rendimentos de concentração de DNA obtidos nos restantes meios de cultura. Uma possível hipótese seria a caracterização da parede/ membrana celular de isolados incubados em meio de amido durante 3 e 10 dias comparativamente com as estruturas observadas na estirpe nativa através de técnicas de microscopia eletrónica de transmissão.

Em suma, pode concluir-se que a implementação de medidas de cariz investigacional e pesquisa em contexto clínico pode revelar-se um aliado na identificação de agentes patogénicos emergentes e conseqüentemente na escolha de agentes antimicóticos eficazes conduzindo indiretamente à diminuição das taxas de resistência e diretamente a um acréscimo de sucesso clínico. Mais se conclui que a possível flexibilidade metabólica destes agentes patogénicos elucida o potencial de virulência de *Candida* spp. e especialmente *Rhodotorula* spp.

Referências Bibliográficas

- [1] M. E. J. Woolhouse, D. T. Haydon, and R. Antia, “Emerging pathogens: The epidemiology and evolution of species jumps,” *Trends in Ecology and Evolution*, vol. 20, no. 5. pp. 238–244, 2005.
- [2] G. D. Brown, D. W. Denning, N. A. R. Gow, S. M. Levitz, M. G. Netea, and T. C. White, “Hidden Killers : Human Fungal Infections,” vol. 4, no. 165, pp. 1–10, 2012.
- [3] C. O. Gill and M. K. Youssef, “Emerging Pathogens,” in *Encyclopedia of Meat Sciences*, vol. 38, 2014, pp. 340–344.
- [4] F. Wirth and L. Z. Goldani, “Epidemiology of rhodotorula: An emerging pathogen,” *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, vol. 2012. pp. 1–8, 2012.
- [5] I. Ahmad, F. Aqil, and M. Shahid, “Chapter 2 Virulence and Pathogenicity of Fungal Pathogens with Special Reference to *Candida albicans*,” no. August 2015, 2010.
- [6] P. Faria-Gonçalves, J. Rolo, C. Gaspar, R. Palmeira-de-Oliveira, J. Martinez-de-Oliveira, and A. Palmeira-de-Oliveira, “Virulence Factors as Promoters of Chronic Vulvovaginal Candidosis: A Review,” *Mycopathologia*, vol. 8, 2021.
- [7] R. Araujo *et al.*, *Combating Fungal Infections - Problems and Remedy*, 1st ed. New York: Springer, Berlin, Heidelberg, 2010.
- [8] D. Kadosh and V. Mundodi, “A re-evaluation of the relationship between morphology and pathogenicity in *Candida* species,” *Journal of Fungi*, vol. 6, no. 1. pp. 16–18, 2020.
- [9] D. S. Thompson, P. L. Carlisle, and D. Kadosh, “Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species,” *Eukaryotic Cell*, vol. 10, no. 9. pp. 1173–1182, 2011.
- [10] S. Antinori, L. Milazzo, S. Sollima, M. Galli, and M. Corbellino, “Candidemia and invasive candidiasis in adults: A narrative review,” *European Journal of Internal Medicine*, vol. 34. European Federation of Internal Medicine., pp. 21–28, 2016.

- [11] J. Guinea, “Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia,” *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 20, no. 6. European Society of Clinical Infectious Diseases, pp. 5–10, 2014.
- [12] J. D. Sobel, “Recurrent vulvovaginal candidiasis,” *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, vol. 214, no. 1. Elsevier Inc., pp. 15–21, 2016.
- [13] J. Yano *et al.*, “Current patient perspectives of vulvovaginal candidiasis: Incidence, symptoms, management and post-treatment outcomes,” *BMC Womens. Health*, vol. 19, no. 1, pp. 1–9, 2019.
- [14] J. D. Sobel, “Pathogenesis and treatment of recurrent vulvovaginal candidiasis,” *Clin. Infect. Dis.*, vol. 14, pp. S148-S153, 1992.
- [15] I. Zangl, I. J. Pap, C. Aspöck, and C. Schüller, “The role of lactobacillus species in the control of candida via biotrophic interactions,” *Microbial Cell*, vol. 7, no. 1. pp. 1–14, 2020.
- [16] R. Alves, C. Barata-Antunes, M. Casal, A. J. P. Brown, P. van Dijck, and S. Paiva, “Adapting to survive: How *Candida* overcomes host-imposed constraints during human colonization,” *PLoS Pathogens*, vol. 16, no. 5. pp. 1–24, 2020.
- [17] M. H. S. H. Ferrazza, M. L. F. Maluf, M. E. L. Consolaro, C. S. Shinobu, T. I. E. Svidzinski, and M. R. Batista, “Caracterização de leveduras isoladas da vagina e sua associação com candidíase vulvovaginal em duas cidades do sul do Brasil,” *Rev. Bras. Ginecol. e Obs.*, vol. 27, no. 2, pp. 58–63.
- [18] B. Gonçalves *et al.*, “Critical Reviews in Microbiology Vulvovaginal candidiasis : Epidemiology , microbiology and risk factors,” vol. 7828, 2016.
- [19] D. W. Denning, M. Kneale, J. D. Sobel, and R. Rautemaa-richardson, “Review Global burden of recurrent vulvovaginal candidiasis : a systematic review,” *Lancet Infect. Dis.*, vol. 3099, no. 18, pp. 1–9, 2018.
- [20] J. D. Sobel, “Vulvovaginal candidosis,” *Lancet*, vol. 369, no. 9577, pp. 1961–1971, 2007, doi: 10.1016/S0140-6736(07)60917-9.
- [21] Z. Khan and A. S. Mustafa, “Detection of *Candida* species by polymerase chain reaction (PCR) in blood samples of experimentally infected mice and patients with suspected candidemia,” vol. 156, pp. 95–102, 2001.

- [22] F. Blostein, E. L. Mph, J. Wagner, and B. Foxman, "Annals of Epidemiology Recurrent vulvovaginal candidiasis," *Ann. Epidemiol.*, vol. 27, no. 9, pp. 575-582.e3, 2017.
- [23] P. Tsai, Y. Chen, P. Hsu, and C. Lan, "Review article Study of *Candida albicans* and its interactions with the host : A mini review," *BioMedicine*, vol. 3, no. 1, pp. 51-64, 2013.
- [24] R. Sabino *et al.*, "Serious fungal infections in Portugal," *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 36, no. 7, pp. 1345-1352, 2017.
- [25] M. K. Owen and T. L. Clenney, "Management of vaginitis," *Am. Fam. Physician*, vol. 70, no. 11, 2004.
- [26] E. Esim, B. Bulent, K. Ayse, and Y. Karageyim, "Diagnosis of vulvovaginitis : comparison of clinical and microbiological diagnosis," pp. 515-519, 2010.
- [27] J. D. Sobel *et al.*, "Vulvovaginal candidiasis: Epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations," *Am. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 178, no. 2, pp. 203-211, 1998.
- [28] D. V Landers, H. C. Wiesenfeld, R. P. Heine, M. A. Krohn, S. L. Hillier, and R. Gibbs, "Predictive value of the clinical diagnosis of lower genital tract infection in women," in *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2004, vol. 190, no. 4, pp. 1004-1008.
- [29] P. K. Ramdial and E. Calonje, "Vulvovaginal infections," in *Pathology of the Vulva and Vagina*, Second Edi., CRC Press, Taylor & Francis Group, 2013, pp. 13-46.
- [30] J. Sherrard, G. Donders, and D. White, "European (IUSTI / WHO) guideline on the management of vaginal discharge , 2011 Bacterial vaginosis," pp. 421-429, 2011.
- [31] P. Madhavan, F. Jamal, and P. P. Chong, "Laboratory Isolation and Identification of *Candida* Species," *Journal of applied science*, vol. 16, no. 11. Asian Network for Scientific Information, pp. 2870-2877, 2011.
- [32] U. Hani, H. Shivakumar, R. Vaghela, R. Osmani, and A. Shrivastava, "Candidiasis : A Fungal Infection- Current Challenges and Progress in Prevention and Treatment," *Infect. Disord. - Drug Targets*, vol. 15, pp. 42-52, 2015.

- [33] D. R. Hospenthal, C. K. Murray, M. L. Beckius, J. A. Green, and D. P. Dooley, "Persistence of Pigment Production by Yeast Isolates Grown on CHROMagar Candida Medium," vol. 40, no. 12, pp. 4768–4770, 2002.
- [34] K. H. Neppelenbroek *et al.*, "Identification of Candida species in the clinical laboratory: A review of conventional, commercial, and molecular techniques," *Oral Dis.*, vol. 20, no. 4, pp. 329–344, 2014.
- [35] I. Olsen, A. Stenderup, I. Olsen, and A. Stenderup, "Clinical-mycologic diagnosis of oral yeast infections Clinical-mycologic diagnosis of oral yeast infections," vol. 6357, no. May, 2016.
- [36] P. Chandrasekar, "Management of invasive fungal infections : a role for polyenes," no. December 2010, pp. 457–465, 2011.
- [37] P. Chandrasekar, "Management of invasive fungal infections: A role for polyenes," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 66, no. 3, pp. 457–465, 2011.
- [38] D. Allen *et al.*, "Expert Review of Anti-infective Therapy infection management Azole antifungals : 35 years of invasive fungal infection management," vol. 7210, no. September, 2016.
- [39] M. A. Pfaller, D. J. Diekema, and D. J. Sheehan, "Interpretive breakpoints for fluconazole and Candida revisited: A blueprint for the future of antifungal susceptibility testing," *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 19, no. 2, pp. 435–447, 2006.
- [40] I. D. dos Santos Junior, I. A. M. Souza, R. G. Borges, W. J. de Santatana, and H. D. Coutinho, "Característica gerais da ação, do tratamento e da resistência fúngica ao flucanazol," *Sci. Med. (Porto. Alegre)*, vol. 15, no. 3, pp. 189–197, 2005.
- [41] F. Eksi, E. D. Gayyurhan, and I. Balci, "In Vitro Susceptibility of Candida Species to Four Antifungal Agents Assessed by the Reference Broth Microdilution Method," *Sci. World J.*, vol. 2013, p. 6, 2013.
- [42] M. E. Brandt and S. R. Lockhart, "Recent taxonomic developments with candida and other opportunistic yeasts," *Curr. Fungal Infect. Rep.*, vol. 6, no. 3, pp. 170–177, 2012.
- [43] G. C. A. de Menezes *et al.*, "Diversity, distribution, and ecology of fungi in the seasonal snow of antarctica," *Microorganisms*, vol. 7, no. 10, pp. 1–16, 2019.

- [44] W. E. Dismukes, P. G. Pappas, and J. D. Sobel, *Clinical mycology*. Oxford; New York: Oxford University Press, 2009.
- [45] H. Hof, "Rhodotorula spp. in the gut - foe or friend?," *GMS Infect. Dis.*, vol. 7, pp. 1–6, 2019.
- [46] J. Albertyn, C. H. Pohl, and B. C. Viljoen, "Rhodotorula," *Encycl. Food Microbiol. Second Ed.*, vol. 3, pp. 291–295, 2014.
- [47] A. Cobban, V. P. Edgcomb, G. Burgaud, D. Repeta, and E. R. Leadbetter, "Revisiting the pink-red pigmented basidiomycete mirror yeast of the phyllosphere," *Microbiologyopen*, vol. 5, no. 5, pp. 846–855, 2016.
- [48] I. Gientka *et al.*, "Evaluation of lipid biosynthesis ability by Rhodotorula and Sporobolomyces strains in medium with glycerol," *Eur. Food Res. Technol.*, vol. 243, no. 2, pp. 275–286, 2017.
- [49] C. J. Shoff and J. R. Perfect, *Uncommon Yeasts and Molds Causing Human Disease*. Elsevier Ltd., 2021.
- [50] G. M. Duboc De Almeida *et al.*, "Rhodotorula spp. isolated from blood cultures: Clinical and microbiological aspects," *Med. Mycol.*, vol. 46, no. 6, pp. 547–556, 2008.
- [51] J. P. Sampaio, *Rhodotorula Harrison (1928)*, vol. 3, no. 1928. Elsevier B.V., 2011.
- [52] F. F. Tuon and S. F. Costa, "Rhodotorula infection. A systematic review of 128 cases from literature," *Rev. Iberoam. Micol.*, vol. 25, no. 3, pp. 135–140, 2008.
- [53] R. Kaur, A. Wadhwa, and S. K. Agarwal, "Rhodotorula mucilaginosa: an unusual cause of oral ulcers in AIDS patients," *AIDS*, vol. 21, no. 8, pp. 1068–1069, 2007.
- [54] M. Gharaghani, S. Taghipour, and A. Zarei Mahmoudabadi, "Molecular identification, biofilm formation and antifungal susceptibility of Rhodotorula spp.," *Mol. Biol. Rep.*, vol. 47, no. 11, pp. 8903–8909, 2020.
- [55] M. A. Ghannoum and L. B. Rice, "Antifungal agents: Mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 12, no. 4, pp. 501–517, 1999.
- [56] T. B. Spader, M. Ramírez-Castrillón, P. Valente, S. H. Alves, and L. C. Severo, "In Vitro Interactions of Amphotericin B Combined with Non-

- antifungal Agents Against *Rhodotorula mucilaginosa* Strains,” *Mycopathologia*, vol. 184, no. 1, pp. 35–43, 2019.
- [57] S. Anunnatsiri, P. Chetchotisakd, and P. Mootsikapun, “Fungemia in non-HIV-infected patients: a five-year review,” *Int. J. Infect. Dis.*, vol. 13, no. 1, pp. 90–96, 2009.
- [58] V. A. Gaona-Flores, L. Campos-Navarro, R. Cervantes-Tovar, and E. Alcalá-Martínez, “The epidemiology of fungemia in an infectious diseases hospital in Mexico City: A 10-year retrospective review,” *Med. Mycol.*, vol. 54, no. 6, pp. 600–604, 2016.
- [59] A. Skiada, I. Pavleas, and M. Drogari-Apiranthitou, “Rare fungal infectious agents: A lurking enemy,” *F1000Research*, vol. 6, pp. 1–16, 2017.
- [60] P. Krzyściak and A. B. Macura, “Drug susceptibility of 64 strains of *Rhodotorula* sp.,” *Wiadomości Parazytol.*, vol. 56, no. 2, pp. 167–170, 2010.
- [61] F. Wirth and L. Z. Goldani, “Experimental *Rhodotorulosis* infection in rats,” *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.*, vol. 120, no. 3, pp. 231–235, 2011.
- [62] N. Kalia, J. Singh, and M. Kaur, “Microbiota in vaginal health and pathogenesis of recurrent vulvovaginal infections: A critical review,” *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, vol. 19, no. 1, pp. 1–19, 2020.
- [63] Z. Seifi, A. Zarei Mahmoudabadi, and S. Hydrinia, “Isolation, identification and susceptibility profile of *Rhodotorula* species isolated from two educational hospitals in Ahvaz,” *Jundishapur J. Microbiol.*, vol. 6, no. 6, 2013.
- [64] M. C. Arendrup *et al.*, “ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of rare invasive yeast infections,” *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 20, no. S3, pp. 76–98, 2014.
- [65] M. S. Simon *et al.*, “Endocarditis caused by *Rhodotorula* infection,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 52, no. 1, pp. 374–378, 2014.
- [66] J. M. Nunes, F. C. Bizerra, R. Carmona E Ferreira, and A. L. Colombo, “Molecular identification, antifungal susceptibility profile, and biofilm formation of clinical and environmental *Rhodotorula* species isolates,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 57, no. 1, pp. 382–389, 2013.

- [67] A. Gomez-Lopez, E. Mellado, J. L. Rodriguez-Tudela, and M. Cuenca-Estrella, "Susceptibility profile of 29 clinical isolates of *Rhodotorula* spp. and literature review," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 55, no. 3, pp. 312–316, 2005.
- [68] E. Anaissie *et al.*, "New spectrum of fungal infections in patients with cancer," *Rev. Infect. Dis.*, vol. 11, no. 3, pp. 369–378, 1989.
- [69] D. Clark and P. Nanette, "Polymerase Chain Reaction," in *Molecular Biology*, Second Edi., Academic Cell, 2013, pp. 163–193.
- [70] W. C. Black, "PCR with arbitrary primers: approach with care: INVITED REVIEW," *Insect Mol. Biol.*, vol. 2, no. 1, pp. 1–6, 1993.
- [71] Y. Oskouei, Bekmen, Ellidokuz, "Evaluation of Different Cryoprotective Agents in Maintenance of Viability of," *Brazilian J. Microbiol.*, vol. 90, pp. 1038–1046, 2010.
- [72] R. Coico, "Gram Staining BASIC PROTOCOL Commonly Used Techniques," *Curr. Protoc. Microbiol.*, pp. 3–4, 2005.
- [73] E. Cantón, J. Pemán, A. Viudes, G. Quindós, M. Gobernado, and A. Espinel-Ingroff, "Minimum fungicidal concentrations of amphotericin B for bloodstream *Candida* species," *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 45, no. 3, pp. 203–206, 2003.
- [74] Y. Thairu, Y. Usman, and I. Nasir, "Laboratory perspective of gram staining and its significance in investigations of infectious diseases," *Sub-Saharan African J. Med.*, vol. 1, no. 4, p. 168, 2014.
- [75] A. Henrici, "The Staining Of Yeasts by Gram's Method," *J. Med. Res.*, vol. 30, no. 3, pp. 409–416, 1914.
- [76] P. G. Pappas *et al.*, "Guidelines for Treatment of Candidiasis," *Clin. Infect. Dis.*, no. June 2014.
- [77] A. R. Costa, F. Silva, M. Henriques, J. Azeredo, R. Oliveira, and A. Faustino, "Candida clinical species identification: Molecular and biochemical methods," *Ann. Microbiol.*, vol. 60, no. 1, pp. 105–112, 2010.
- [78] A. Moharram, M. Abdel-Ati, and E. Othman, "Vaginal yeast infection in patients admitted to Al-Azhar University Hospital, Assiut, Egypt," *J. Basic Appl. Mycol.*, vol. 4, pp. 21–32, 2013.

- [79] X. P. Liu, S. R. Fan, Y. T. Peng, and H. P. Zhang, "Species distribution and susceptibility of *Candida* isolates from patient with vulvovaginal candidiasis in Southern China from 2003 to 2012," *J. Mycol. Med.*, vol. 24, no. 2, pp. 106–111, 2014.
- [80] D. Moreira *et al.*, "Difference Between the Profiles Presented by Yeasts that Colonize the Vaginal Mucosa or Cause Primary or Recurrent Candidiasis," *Mycopathologia*, vol. 186, no. 3, pp. 411–421, 2021.
- [81] J. L. Andrioli *et al.*, "Frequência de leveduras em fluido vaginal de mulheres com e sem suspeita clínica de candidíase vulvovaginal," *Rev. Bras. Ginecol. e Obstet.*, vol. 31, no. 6, pp. 300–304, 2009.
- [82] A. K. Zaas, M. Boyce, W. Schell, B. A. Lodge, J. L. Miller, and J. R. Perfect, "Risk of Fungemia Due to *Rhodotorula* and Antifungal Susceptibility Testing of *Rhodotorula* Isolates," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 41, no. 11, pp. 5233–5235, 2003.
- [83] M. R. Capoor, S. Aggarwal, C. Raghvan, D. K. Gupta, A. K. Jain, and R. Chaudhary, "Clinical and microbiological characteristics of *Rhodotorula mucilaginosa* infections in a tertiary-Care facility," *Indian J. Med. Microbiol.*, vol. 32, no. 3, pp. 304–309, 2014.
- [84] CLSI, *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts ; Approved Standard – Second Edition Serving the World 's Medical Science Community Through Voluntary Consensus*, vol. 22, no. 15. 2008.
- [85] Z. A. Kanafani and J. R. Perfect, "Resistance to antifungal agents: Mechanisms and clinical impact," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 46, no. 1, pp. 120–128, 2008, doi: 10.1086/524071.
- [86] M. T. Fera, E. La Camera, and A. De Sarro, "New triazoles and echinocandins: Mode of action, in vitro activity and mechanisms of resistance," *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.*, vol. 7, no. 8, pp. 981–998, 2009.
- [87] R. M. Atlas, *Handbook of Microbiological Media*, Fourth Edi. CRC Press, Taylor & Francis Group, 2010.

- [88] A. El-Fallal, M. Abou, A. El-Sayed, and N. Omar, “Starch and Microbial α -Amylases: From Concepts to Biotechnological Applications,” *Carbohydrates - Compr. Stud. Glycobiol. Glycotechnol.*, pp. 460–488, 2012.
- [89] A. Sibirny and A. Voronovsky, “Yeast biotechnology: Diversity and applications,” *Springer Sci.*, pp. 85–110, 2009.
- [90] S. Anand and R. Prasad, “Growth and Respiration Characteristics of *Candida albicans*,” *Candida Albicans*, pp. 46–61, 1991.
- [91] M. Vidal-Leiria, H. Buckley, and N. van Uden, “DISTRIBUTION OF THE MAXIMUM TEMPERATURE FOR GROWTH AMONG YEASTS,” *Mycol. Soc. Am.*, vol. 71, no. 2, pp. 493–501, 1979.
- [92] F. Nedel, D. A. De Almeida André, I. O. De Oliveira, S. B. C. Tarquinio, and F. Á. F. Demarco, “Buccal cells submitted to three different storage conditions before dna extraction,” *J. Appl. Oral Sci.*, vol. 17, no. 2, pp. 113–115, 2009.
- [93] Z. Dong *et al.*, “Copy-number variants detection by low-pass whole-genome sequencing,” *Curr. Protoc. Hum. Genet.*, vol. 2017, no. July, pp. 8.17.1-8.17.16, 2017.
- [94] G. Lucena-Aguilar, A. M. Sánchez-López, C. Barberán-Aceituno, J. A. Carrillo-Ávila, J. A. López-Guerrero, and R. Aguilar-Quesada, “DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis,” *Biopreserv. Biobank.*, vol. 14, no. 4, pp. 264–270, 2016.
- [95] G. Fatima, B. Zineb, K. Mebrouk, C. G, and G. an, “The reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) profiles of *Streptococcus thermophilus* strains with XD9, M13 and OPI-02 MOD primers,” *African J. Biotechnol.*, vol. 12, no. 44, pp. 6245–6252, 2013.

Anexos

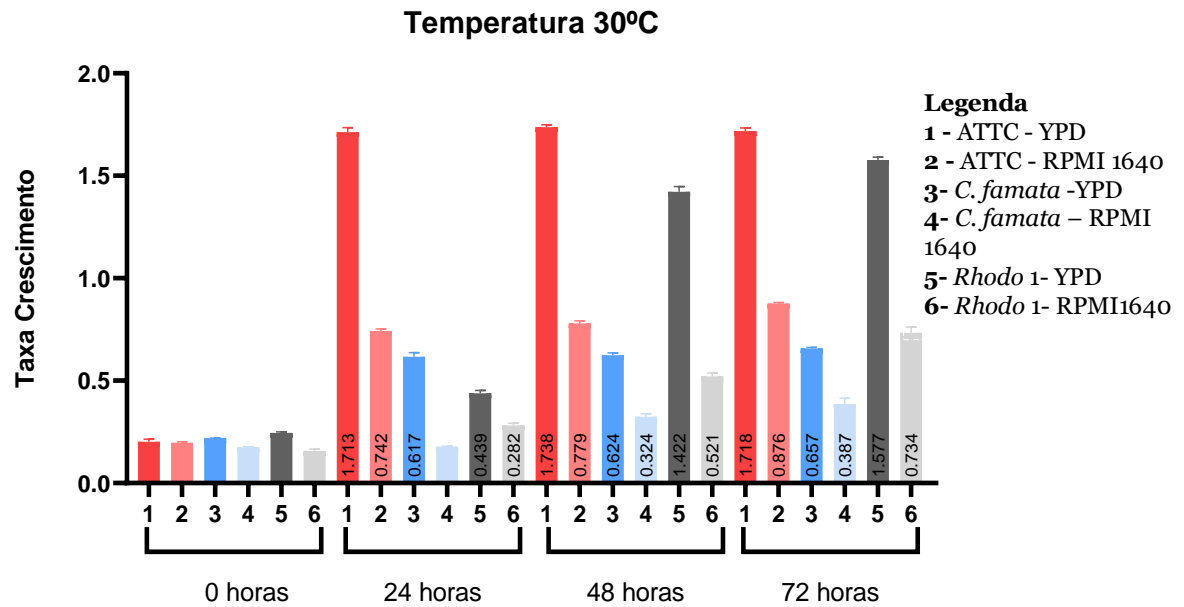


Figura 22 - Crescimento microbiológico de 1 isolado de *Rhodotorula*, *Candida famata* e ATCC 10231. Período de Incubação máximo de 3 dias, em meio de cultura YPD e RPMI. Temperatura de 30°C