

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

LÍVIA CUSTÓDIO PEREIRA

**CANDIDÍASE VULVOVAGINAL E PERSPECTIVAS ATUAIS: SINTOMAS,
DIAGNÓSTICO LABORATORIAL, PREVALÊNCIA DAS ESPÉCIES,
RESISTÊNCIA À ANTIFÚNGICOS, NOVOS FATORES DE RISCO
ASSOCIADOS E AVALIAÇÃO DA RECORRÊNCIA**

BRASÍLIA - DF
2021

LÍVIA CUSTÓDIO PEREIRA

**CANDIDÍASE VULVOVAGINAL E PERSPECTIVAS ATUAIS: SINTOMAS,
DIAGNÓSTICO LABORATORIAL, PREVALÊNCIA DAS ESPÉCIES,
RESISTÊNCIA À ANTIFÚNGICOS, NOVOS FATORES DE RISCO
ASSOCIADOS E AVALIAÇÃO DA RECORRÊNCIA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (UnB) como parte dos requisitos necessários para obtenção do Título de Doutor em Ciências Médicas, Universidade de Brasília.

Orientadora: Profª. Dra. Yanna Karla de Medeiros Nóbrega

Co-orientadora: Profª. Dra. Amabel Fernandes Correia

BRASÍLIA - DF
2021

CP436c Custódio Pereira, Livia
CANDIDIÁSE VULVOVAGINAL E PERSPECTIVAS ATUAIS: SINTOMAS,
DIAGNÓSTICO LABORATORIAL, PREVALÊNCIA DAS ESPÉCIES,
RESISTÊNCIA À ANTIFÚNGICOS, NOVOS FATORES DE RISCO ASSOCIADOS
E AVALIAÇÃO DA RECORRÊNCIA / Livia Custódio Pereira;
orientador Yanna Karla de Medeiros Nóbrega ; co-orientador
Amabel Fernandes Correia . -- Brasília, 2021.
93 p.

Tese (Doutorado - Doutorado em Ciências Médicas) --
Universidade de Brasília, 2021.

1. candidíase vulvovaginal. 2. candida albicanss. 3.
Candidiase vulvovaginal recorrente. 4. vulvovaginites. 5.
diagnóstico. I. Karla de Medeiros Nóbrega , Yanna , orient.
II. Fernandes Correia , Amabel, co-orient. III. Título.

LÍVIA CUSTÓDIO PEREIRA

**CANDIDÍASE VULVOVAGINAL E PERSPECTIVAS ATUAIS: SINTOMAS,
DIAGNÓSTICO LABORATORIAL, PREVALÊNCIA DAS ESPÉCIES,
RESISTÊNCIA À ANTIFÚNGICOS, NOVOS FATORES DE RISCO
ASSOCIADOS E AVALIAÇÃO DA RECORRÊNCIA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília como parte dos requisitos necessários para obtenção do Título de Mestre em Ciências Médicas, Universidade de Brasília.

Aprovada em 26 de abril de 2021

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Yanna Karla de Medeiros Nóbrega (UnB) - Presidente

Profa. Dra. Adriana Bittecourt Campaner (FCMSCSP - Membro)

Profa. Dra. Fabiana Brandão Alves da Silva (UnB - Membro)

Prof. Dr. Luiz Alberto Simeoni (UnB - Membro)

Profa. Dra. Walquíria Quida Salles Pereira Primo (HUB - Suplente)

DEDICATÓRIA

*Luciano, Vinícius, André e Lara.
A vocês, que são luz, horizonte e solo.
Com todo meu amor.
À vovó cuja voz firme e carinhosa ainda
posso ouvir: "Estude filha, estude sempre,
o saber não ocupa lugar"*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora, amiga, Yanna. Esse agradecimento a você está mais difícil de escrever do que tentar desvendar os mistérios da resposta imunológica, e sei que vai soltar um sorriso ao ler isso e dizer “fogo” ... Mas então é isso, acho que fogo pode ajudar a resumir o agradecimento. O fogo clareia, aquece, alimenta...Desde a decisão pela pesquisa até esse momento, você iluminou meu caminho para que eu me aprofundasse em conhecimentos que transformaram minha prática clínica, alimentou minha curiosidade de tal modo que decidi continuar trilhando por esses caminhos e me aqueceu com sua serenidade nos momentos de dificuldade. Você é uma grande professora, pesquisadora e pessoa, a quem serei eternamente grata.

A Deus pela existência, a meus pais por toda dedicação e amor.

Ao Luciano por me completar, por estar ao meu lado, nos últimos vinte anos, respeitando minhas escolhas, vibrando com os êxitos, me apoiando nos momentos difíceis, enfim, me trazendo o chão onde posso caminhar.

Aos meus amados filhos, por entenderem e perdoarem as ausências, por tão cedo já terem tanto equilíbrio. Obrigada por encherem minha existência de alegria e me permitirem esse amor sem dimensão.

Às minhas irmãs pelas palavras de carinho e incentivo, sempre.

À Dra Amabel, pela disposição e pela contribuição tão valiosa, tornando o projeto possível.

À Dra Rosane pela contribuição com a análise dos dados, e por dividir o espaço de trabalho com tanta gentileza.

À Dra Fabiana pela generosidade em contribuir com a análise estatística, com as referências e revisão do trabalho.

À Dra Zita pela contribuição na análise das amostras.

À Prof. Walquíria pela disponibilidade em ter aceitado avaliar este trabalho, e pelo apoio.

À Prof Adriana pela prontidão e disponibilidade em avaliar este trabalho.

Ao Prof. Luiz Simeoni pela gentileza em aceitar avaliar este trabalho.

À todas as mulheres, que, na posição de pacientes, concordaram em participar do estudo. Além dessas, meu agradecimento a todas as pacientes, que mesmo sem participarem deste estudo, participam do meu crescimento profissional e pessoal, confiando a mim sua saúde. São a razão da minha busca por conhecimento, e muito me ensinam compartilhando suas dores e suas histórias.

À Dra Mariana pela gentileza de sempre e auxílio na coleta de dados

Aos alunos da graduação e residentes do Hospital Universitário de Brasília que me apoiaram na coleta dos dados.

Aos professores Pratesi e Lenora, pelo incentivo e carinho com que sempre me trataram.

A todos os meus amigos que sempre me deram força, não quero ser injusta ao nominá-los todos, pois tenho o privilégio de vocês serem muitos!

EPÍGRAFE

*Se as coisas são inatingíveis... ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
A presença distante das estrelas!*

Mario Quintana

RESUMO

A candidíase vulvovaginal (CVV), é uma infecção genital comum, cujos sintomas causam grande desconforto, limitando a qualidade de vida das mulheres. É a segunda causa de infecção genital no menacme e sua prevalência não é fidedigna na literatura. A Candidíase Vulvovaginal Recorrente (CVVR) é caracterizada por 4 ou mais episódios de CVV em 12 meses. A maior parte das infecções tem com agente etiológico *C. albicans*, entretanto há um aumento de espécies não *albicans*. O tratamento de escolha são os azólicos, dados apontam resistência de *Candida* a estes antifúngicos. O objetivo deste estudo foi investigar clínica e laboratorialmente casos de CVV enumerando os principais sintomas e fatores de risco associados, e as espécies de *Candida* spp. isoladas. Para obtenção dos dados, as pacientes foram entrevistadas com as perguntas do questionário de Sintomas e Fatores de Risco, e um *swab* vaginal foi coletado. Foram incluídas 278 pacientes, do Ambulatório de Ginecologia do Hospital Universitário de Brasília (HUB), divididas em dois grupos: sintomáticas ($n = 173$) e assintomáticas ($n = 105$). As espécies de *Candida* foram identificadas por métodos fenotípicos e presuntivos, e confirmadas por espectrometria de massa *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-flight* (MALDI-TOF). O perfil de sensibilidade das espécies de *Candida* frente ao fluconazol foi determinado por antifungigrama automatizado, e a identificação de fatores de risco (FR) associados à candidíase por dados do questionário, correlacionados com resultados laboratoriais. Quanto aos sintomas de candidíase (corrimento, prurido e ardência), 50,3% dos pacientes relataram-nos concomitantemente, apresentando Valor Preditivo Positivo (VPP) de 67,8%. Em relação aos FRs, houve correlação entre candidíase e anticoncepcional, alergia respiratória, protetor diário de roupa íntima, consumo de leite e trânsito intestinal, sendo os dois últimos, novos FRs relacionados à disbiose vaginal e intestinal. O teste MALDI-TOF identificou na maioria das amostras (80,9%) *C. albicans* e em 15,2% das amostras foram identificadas as espécies não *albicans*: *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. zeylanoide* e mais 1,0% *Rhodotorula mucilaginosa* e uma espécie de *Candida* não foi identificada. Na comparação entre os métodos fenotípicos e presuntivos com MALDI-TOF, a sensibilidade média foi superior a 70,0% e a especificidade superior a 90,0% em ambos. Na avaliação da recorrência das pacientes sintomáticas 88 referiram CVVR, destas 41 (44,5%) apresentaram resultados positivos. Nessas 41 pacientes, uma primeira coleta foi realizada, e 21 permaneceram positivas, na sequência, uma segunda coleta foi realizada em 6 pacientes ainda positivas, a taxa de recorrência com diagnóstico foi 28,6%, e a prevalência de espécies na CVVR foi 66,7% *C. albicans* e 33,3% não *albicans*. Foram realizados antifungigrama em 69,6% das amostras, entre as espécies testadas 82,0% foram sensíveis ao fluconazol, 6,5% resistentes e 1,1% apresentaram Sensibilidade Dose Dependente (SDD). O estudo possibilitou a identificação precisa das espécies de *Candida*, o perfil de sensibilidade ao fluconazol, a recorrência da CVV com diagnóstico laboratorial, comprovando que: a presença de sintomas tem baixo VPP para o diagnóstico clínico de candidíase, que novos FR podem estar associados, e que o diagnóstico laboratorial é importante para o manejo clínico da CVV.

Palavras-Chaves: candidíase vulvovaginal, candidíase vulvovaginal recorrente, *Candida* spp, prevalência, diagnóstico, MALDI-TOF, disbiose vaginal, disbiose intestinal, recorrência.

ABSTRACT

Vulvovaginal candidiasis (VVC) is a common genital infection, which limits the quality of life of women for the great discomfort that its symptoms cause. It is the second cause of genital infection in the menacme, and even so, its prevalence is not well established in the literature. Recurrent Vulvovaginal Candidiasis (RVVC) is characterized by 4 or more episodes of VVC in 12 months. *C. albicans* is the etiological agent in most infections, although there has been an increase in non-*albicans* species. The treatment of choice is azoles, and studies point to *Candida*'s resistance to these antifungals. The aim of this study was to investigate clinically and laboratory cases of VVC enumerating the main symptoms and associated risk factors, and to identify *Candida* spp. species isolated. To obtain the data, the patients were interviewed with questions from the Symptoms and Risk Factors questionnaire, and a vaginal swab was collected. We included 278 patients from the Gynecology Outpatient Clinic of the University Hospital of Brasília (HUB), divided into two groups: symptomatic (n = 173) and asymptomatic (n = 105). *Candida* species were identified by phenotypic and presumptive methods and confirmed by Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. The sensitivity profile of *Candida* species against fluconazole was determined by automated antifungigram, and the identification of risk factors (RF) associated with candidiasis by questionnaire data, correlated with laboratory results. Regarding the symptoms of candidiasis (discharge, pruritus and burning), 50.3% of the patients described them concomitantly, presenting Positive Predictive Value (PPV) of 67.8%. Concerning RFs, there was a correlation between candidiasis and contraceptives, respiratory allergy, daily underwear protector, milk consumption and intestinal transit, the latter two being new RFs related to vaginal and intestinal dysbiosis. After confirmation by MALDI-TOF, seven species of *Candida* were identified: *C. albicans* (80.9%), *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. zeylanoide* totaling 15.2% and more, 1% *Rhodotorula mucilaginosa* and 1.9% of unidentified *Candida*. When comparing phenotypic and presumptive methods with MALDI-TOF, the mean sensitivity was higher than 70% and specificity greater than 90% in both. In the evaluation of the recurrence of symptomatic patients, 88 reported RVVC, of these 41 (44.5%) showed positive results. In these 41 patients, a first collection was performed, and 21 remained positive, and a second collection was performed in 6 patients still positive, the recurrence rate with diagnosis was 8.6%, and the prevalence of species in RVVC was 66.7% *C. albicans* and 33.3% non-*albicans*. Antifungigram was performed in 69.6% of the samples, among the tested species 82% were sensitive to fluconazole, 6.5% resistant and 1.1% presented dose-dependent sensitivity (DDS). The study allowed the precise identification of *Candida* species, the fluconazole sensitivity profile, the recurrence of VVC with laboratory diagnosis, proving that: the presence of symptoms has low PPV for the clinical diagnosis of candidiasis that new RF may be associated, and that laboratory diagnosis is fundamental for the clinical management of VVC.

Keywords: vulvovaginal candidiasis, *Candida* spp, prevalence, diagnosis, MALDI-TOF, vaginal dysbiosis, intestinal dysbiosis, recurrence, VVC, RVVC

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estimativa do número de Casos de CVVR.....	16
Figura 2 - Imagem de <i>Candida albicans</i> (aumento 1000x) por microscopia eletrônica.....	17
Figura 3 - Morfologia das leveduras, hifas e pseudohifas.....	19
Figura 4 - Estrutura de Parede celular de <i>C. albicans</i>	20
Figura 5 - Biofilme de <i>Candida albicans</i> em fotografia eletrônica com aumento de 1000x.....	22
Figura 6 – Classificação <i>Community State Types</i> (CSTs) da microbiota vaginal.....	25
Figura 7 - Apresentação clínica da CVV.....	27
Figura 8 - Microscopia direta a fresco e por coloração de Gram.....	29
Figura 9 – MALDI -TOF técnica.....	32
Figura 10 - Diagrama de Venn em pacientes sintomáticas.....	49
Figura 11- Grupos para comparação de fatores de risco.....	51
Figura 12 - Análise comparativa da presença de Fatores de risco para VVC.....	53
Figura 13 - Percentual de espécies de <i>Candida spp.</i> e <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> identificadas por MALDI-TOF.....	56
Figura 14 - Análise esquemática da recorrência.....	58
Figura 15 - Percentual de sensibilidade ao Fluconazol.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Grupos de pacientes categorizados na pesquisa.....	40
Tabela 2 – Avaliação dos grupos estudados categorizados por idade, estado civil e presença de sintomas.....	48
Tabela 3 – Correlação dos sintomas e diagnóstico laboratorial.....	50
Tabela 4 – Número de parceiros e tempo com parceiro atual.....	51
Tabela 5 – Diagnóstico laboratorial por métodos fenotípicos e MALDI -TOF	55
Tabela 6 - Sensibilidade e especificidade dos testes empregados, TTG e MC, em comparação com o método padrão-ouro MALDI-TOF.....	56
Tabela 7– Recorrência relatada pelas pacientes.....	57
Tabela 8 – Perfil de sensibilidade ao Fluconazol por antifungigrama automatizado e por espécie de <i>Candida</i> identificada.....	59
Tabela 9 - Perfil de sensibilidade ao Fluconazol pelo Método Concentração Inibitória Mínima pela norma M27-A2 da CLSI e por espécie de <i>Candida</i> identificada	60

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Diagnóstico diferencial de sintomas e sinais das vaginites.....	28
Quadro 2: Classificação dos fármacos antifúngicos quanto ao mecanismo de ação.....	34
Quadro 3 - Perguntas e respostas do Questionário de sintomas e fatores de risco.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	<i>American Type Culture Colletion</i>
CDC	<i>Center of Disease Control</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CFU	Unidade formadora de colônia
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CST	<i>Community State Types</i>
CVV	Candidíase vulvovaginal
CVVR	Candidíase vulvovaginal recorrente
DIU	Dispositivo Intrauterino
EMA	<i>European Medicine Agency</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPV	Papilomavírus Humano
HUB	Hospital Universitário de Brasília
IST	Infecção Sexualmente Transmissível
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-flight</i>
MIC	<i>Minimal Inhibitory Concentration</i>
MBV	Microbiota Vaginal
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PCR-RFLP	<i>Polymerase Chain Reaction –Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
POD	Enzima peroxidase
PTG	Prova tubo germinativo
rRNA	Ácido ribonucleico ribossomal
SDD	Sensibilidade Dose Dependente
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Candidíase vulvovaginal (CVV) e Candidíase vulvovaginal recorrente (CVVR) – conceitos e prevalência	15
1.2 Patogênese e fatores de risco	17
1.2.1 Morfologia e patogênese	17
1.2.2 Fatores de risco	22
1.2.2.1 Microbiota Vaginal	24
1.3 Diagnóstico Clínico-Laboratorial	26
1.3.1 Apresentação clínica e diagnósticos diferenciais	26
1.3.2 Diagnóstico laboratorial	29
1.4. Tratamento	33
1.5. Perspectivas atuais de tratamento	35
2. JUSTIFICATIVA	38
3. OBJETIVOS	39
3.1. Objetivo geral	39
3.2. Objetivos específicos	39
4. METODOLOGIA	40
4.1. População Estudada e Critérios Éticos	40
4.2. Critérios de inclusão e exclusão	40
4.3. Coleta de dados e resultados laboratoriais	41
4.4. Coleta, isolamento e conservação dos isolados fúngicos	43
4.5. Identificação fenotípica das espécies de <i>Candida</i>	43
4.5.1. Prova do Tubo Germinativo (PTG)	43
4.5.2. Identificação em Meio Cromogênico	44
4.6. Identificação por <i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-flight</i> (MALDI-TOF)	44
4.7 - Avaliação da recorrência	45
4.8. Avaliação da Resistência do Antifúngico Fluconazol	45
4.8.1. Avaliação de antifungigrama automatizado	45
4.8.2. Método de Microdiluição - Concentração Inibitória Mínima (MIC - <i>Minimal Inhibitory Concentration</i>) do Fluconazol norma M27-A2 da CLSI	46
4.9- Análise estatística	47
5- RESULTADOS	48
5.1- Caracterização da população estudada	48
5.2- Avaliação da prevalência dos sintomas em relação ao diagnóstico laboratorial	49
5.3- Avaliação dos fatores de risco pesquisados em relação ao diagnóstico	

laboratorial.....	50
*ppd (porção por dia)	53
5.4- Prevalência das espécies de <i>Candida</i> identificadas pelas técnicas empregadas no diagnóstico laboratorial.....	54
5.5- Avaliação da recorrência.....	56
5.6. Determinação do perfil de sensibilidade ao antifúngico fluconazol	58
6- DISCUSSÃO.....	61
8. REFERÊNCIAS.....	71
9- APÊNDICE	87
10. ANEXO	89

1.INTRODUÇÃO

1.1. Candidíase vulvovaginal (CVV) e Candidíase vulvovaginal recorrente (CVVR) – conceitos e prevalência

A vulvovaginite por *Candida* spp, ou candidíase vulvovaginal (CVV), é uma infecção genital comum, que ocorre por multiplicação excessiva da levedura presente na microbiota vaginal de mulheres em fase reprodutiva, processo que é favorecido por diferentes fatores predisponentes (BRANDOLT *et al.*, 2017; SOBEL, 1997). Embora a CVV seja considerada a segunda causa de infecção genital em mulheres no menacme (UNEMO *et al.*, 2013), sua prevalência não é bem caracterizada na literatura (RODRÍGUEZ-CERDEIRA *et al.*, 2019).

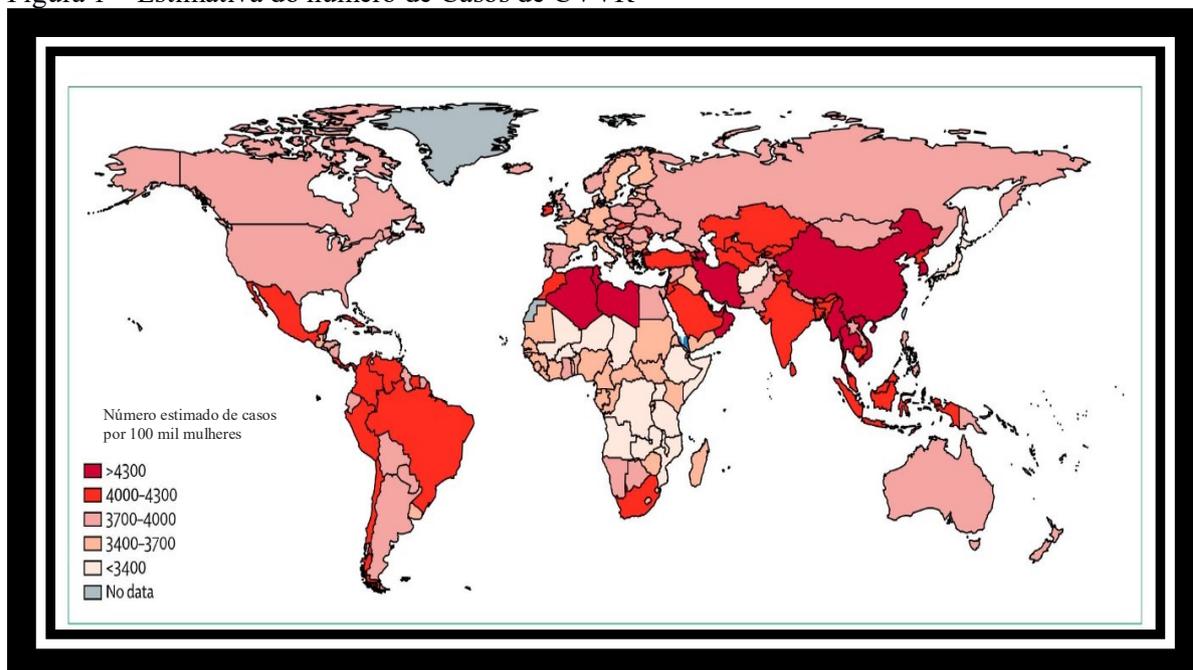
Em 1979, HURLEY estimou em 75% a prevalência da ocorrência de pelo menos um episódio de CVV entre mulheres em idade reprodutiva (HURLEY; DE LOUVOIS, 1979). Em 2014, RATHOD E BUFFLER, ao analisarem os estudos publicados sobre o tema (ACHKAR; FRIES, 2010; AMOURI *et al.*, 2011; ECKERT, 2006; FERRER, 2000; SOBEL, 1988, 2007), concluíram que os dados de prevalência frequentemente inseridos nestes estudos não são, de fato, reportados em estudos epidemiológicos de base populacional, tendo origem em reformulações de informações originárias de dados não publicados e opiniões de especialistas (RATHOD; BUFFLER, 2014), de forma que consultando a literatura atual não é possível definir ou estimar a prevalência da doença (RODRÍGUEZ-CERDEIRA *et al.*, 2019).

A candidíase vulvovaginal recorrente (CVVR), é definida arbitrariamente pela literatura como a ocorrência de 4 ou mais episódios em um período de 12 meses, e alguns autores apontam para uma taxa de recorrência variável entre 5 a 10% (AMOURI *et al.*, 2011; ILKIT; GUZEL, 2011; LIU *et al.*, 2011).

Uma revisão sistemática recente sobre prevalência global de CVVR, estimou que aproximadamente 138 milhões de mulheres são acometidas anualmente, o que corresponde a 3871 casos para cada 100.000 mulheres/ano, e cerca de 372 milhões de mulheres que serão acometidas pela CVVR ao longo da vida (DENNING *et al.*, 2018) (Figura 1). Outro estudo incluindo análise de dados de vários países, indicou uma prevalência de recorrência da CVV durante a vida, de 9% antes dos 50 anos, com pico

entre os 19 e 35 anos (BLOSTEIN *et al.*, 2017).

Figura 1 – Estimativa do número de Casos de CVVR



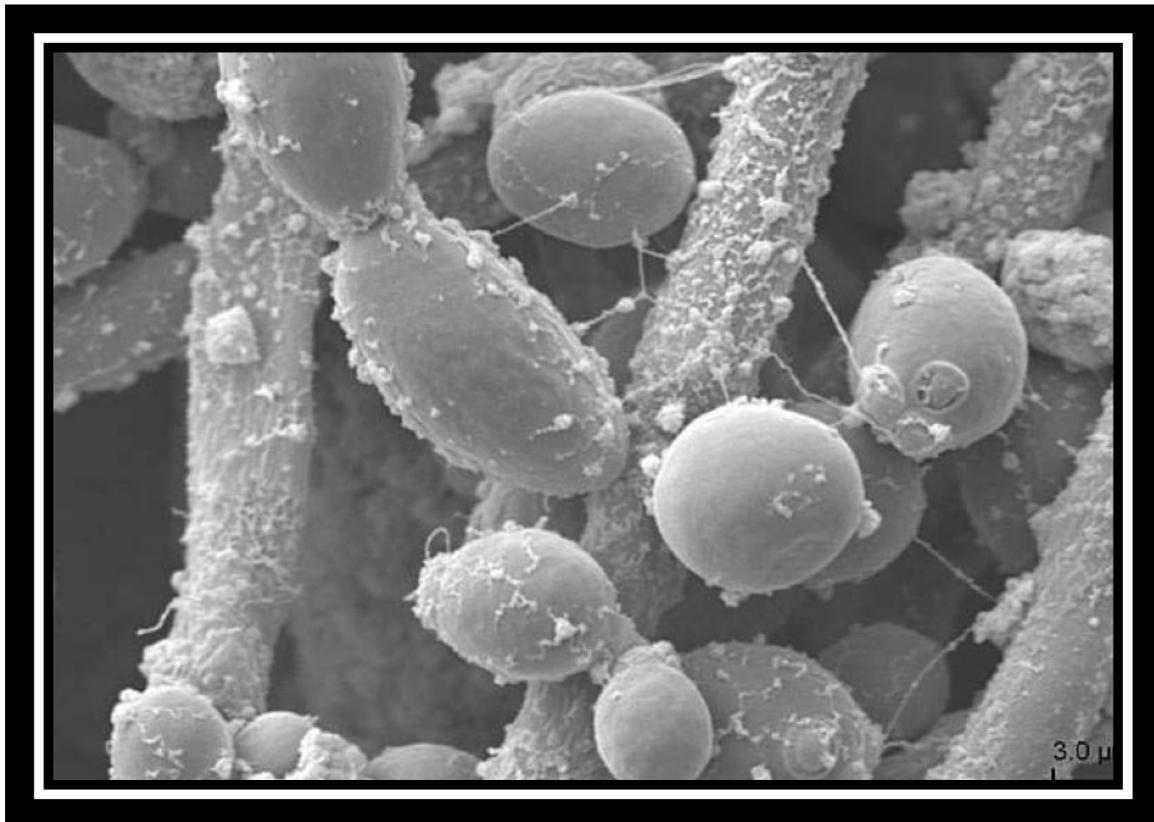
Fonte: Adaptado de DENNING *et al.*, 2018

No Brasil os dados de prevalência de vulvovaginite por *Candida* spp em estudos de base populacional são escassos, e os métodos diagnósticos utilizados são muito heterogêneos. Estudos transversais, em populações bem definidas reportam prevalências de 11,8% até 29,7% (BRANDOLT *et al.*, 2017; GUNTHER *et al.*, 2014; MASCARENHAS *et al.*, 2012; NEVES *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2011), e colonização de mulheres assintomáticas de até 18% (ANDRIOLI *et al.*, 2009).

A maioria dos casos de CVV, cerca de 80 a 90%, têm a *Candida albicans* isolada como agente etiológico (Figura 2) (AHMAD; KHAN, 2009; FAN; LIU; LI, 2008; GYGAX *et al.*, 2008; HETTICARACHCHI; ASHBEE; WILSON, 2010; SOBEL *et al.*, 1998; SOBEL, 2007; SPINILLO *et al.*, 1997) embora as espécies não *albicans* (NA), tais como: *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* têm sido relatadas como espécies emergentes agentes de CVV nas duas últimas décadas. (BRANDOLT *et al.*, 2017; GONÇALVES *et al.*, 2016; NAKAMURA-VASCONCELOS *et al.*, 2017), podendo ser responsáveis por até 30% dos episódios de CVVR em determinadas regiões

(ANDERSON; KLINK; COHRSEN, 2004; KENNEDY; SOBEL, 2010).

Figura 2- Imagem de *Candida albicans* (aumento 1000x) por microscopia eletrônica



C. albicans hifas e leveduras
Adaptado de KOBAN *et al.*, 2010

1.2 Patogênese e fatores de risco

Apesar da prevalência alta e do grande número de fatores de risco associados à infecção, os mecanismos patogênicos da CVV e da CVVR ainda não foram completamente elucidados (GONÇALVES *et al.*, 2016). Contudo, com os avanços das técnicas de biologia molecular, têm se descortinado alguns prováveis mecanismos que podem explicar o paradoxo de como uma espécie que é inofensiva ou comensal em um indivíduo saudável, pode tornar-se um dos patógenos mais bem-sucedidos em consórcios microbianos como os biofilmes (GONÇALVES *et al.*, 2016).

1.2.1 Morfologia e patogênese

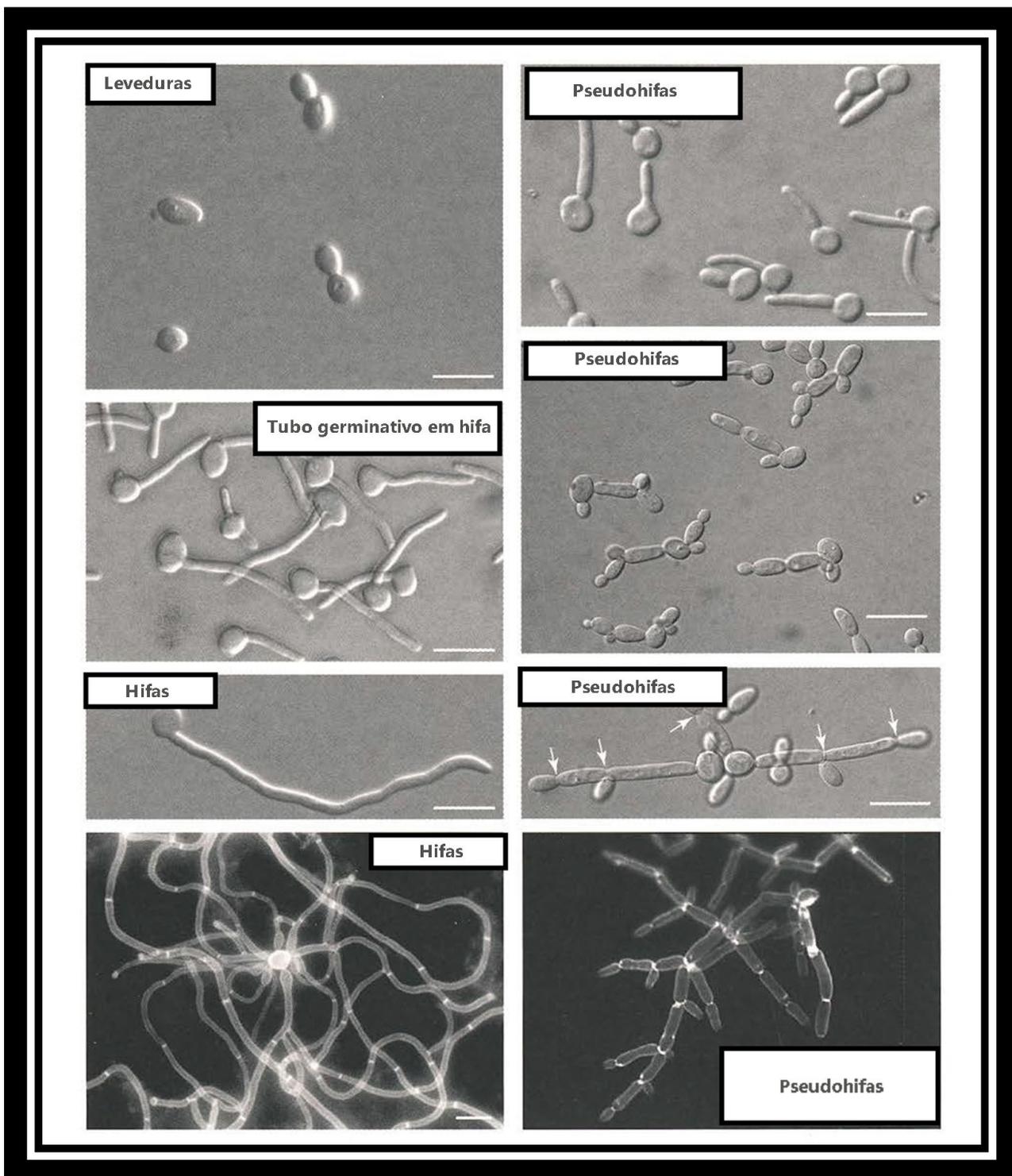
Os fungos são organismos eucariotos, com parede celular, que podem apresentar-se nas formas leveduriforme ou filamentosa (GARRY, 1996). O gênero *Candida* contém

centenas de espécies com genomas diferentes e variações fenotípicas quanto à morfologia e tamanho, bioquímicas quanto a composição da parede celular e requisitos para crescimento e adaptação (concentração de O₂ e CO₂, pH, temperatura, entre outros). Em relação à morfologia as espécies de *Candida* spp. são predominantemente leveduriformes, contudo, várias espécies deste gênero são dimórficas, ou seja, crescem na forma de leveduras e pseudo-hifas ou hifas (WHIBLEY; GAFFEN, 2015).

Uma característica biológica marcante da *C. albicans* é sua plasticidade morfológica, ou seja, a capacidade de crescer em formas morfológicas distintas, que variam de levedura, uma morfologia unicelular arredondada ou ovoide, até a transição para estruturas alongadas, formada por cadeia de células, as hifas. Entre a fase de leveduras e a formação de hifas existe um estado de transição, os tubos germinativos. As pseudohifas podem ocorrer a partir do brotamento da levedura sem que haja separação da célula mãe, o que produz filamentos alongados, que mantêm as constrições nas junções do septo, sendo que o seu comprimento é bastante variável (Figura 3) (SUDBERY, 2011).

O crescimento das hifas, foi identificado como um importante fator de virulência, pois essas estruturas filamentosas (hifas e pseudo-hifas) têm grande capacidade de invasão dos tecidos (SUDBERY, 2011; SUDBERY; GOW; BERMAN, 2004).

Figura 3- Morfologia das leveduras, hifas e pseudohifas



Adaptado de SUDBERY; GOW; BERMAN, 2004

A patogenicidade das espécies de *Candida* é mediada por múltiplos fatores de virulência, sendo de muita importância as capacidades de: adesão, produção de enzimas e formação de hifas (GONÇALVES *et al.*, 2016).

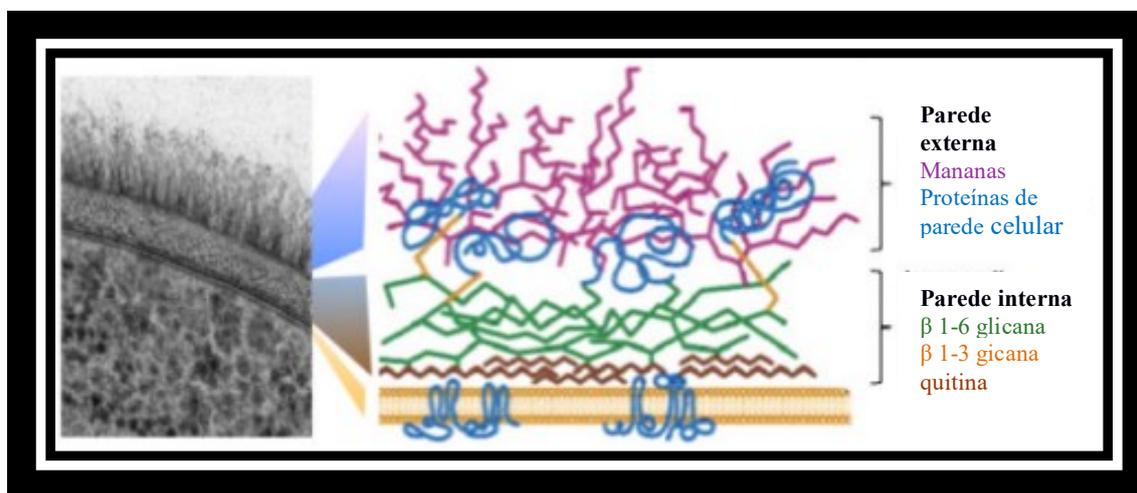
Há que se destacar entre os mecanismos pelos quais o fungo emerge do estado

comensal para o patogênico, a capacidade de remodelação e a variabilidade das estruturas de sua parede celular, a formação de biofilme, e a variabilidade genética e fenotípica das populações de *C. albicans*. Em outras palavras, é essa plasticidade que permite a adaptação a diversas condições impostas pelo hospedeiro (POULAIN, 2015).

Dentre as diferentes espécies do gênero *Candida*, a parede celular da *C. albicans*, é a mais amplamente estudada, trata-se de uma estrutura dinâmica, crucial no processo de adesão ao epitélio do hospedeiro e alvo do mecanismo de ação de alguns antifúngicos, como a caspofungina. É formada por múltiplas camadas, sendo a mais profunda constituída por quitina e β -glicanas que atuam como um esqueleto celular, garantindo a forma e rigidez da estrutura. Enquanto as camadas mais externas são formadas por polímeros de manose covalentemente ligados a proteínas (Figura 4), essenciais para adesão celular, virulência e formação de biofilme. Os componentes da parede fúngica são a chave no reconhecimento pelo sistema imune (HALL, 2015).

As proteínas e manoproteínas são capazes de induzir uma potente resposta imune humoral no hospedeiro, incluindo a produção de alguns anticorpos, o que pode ser utilizado como uma estratégia para o desenvolvimento de vacinas (LÓPEZ-RIBOT *et al.*, 2004).

Figura 4 – Estrutura de Parede celular de *C. albicans*



Adaptado de Brown *et al.*, 2014

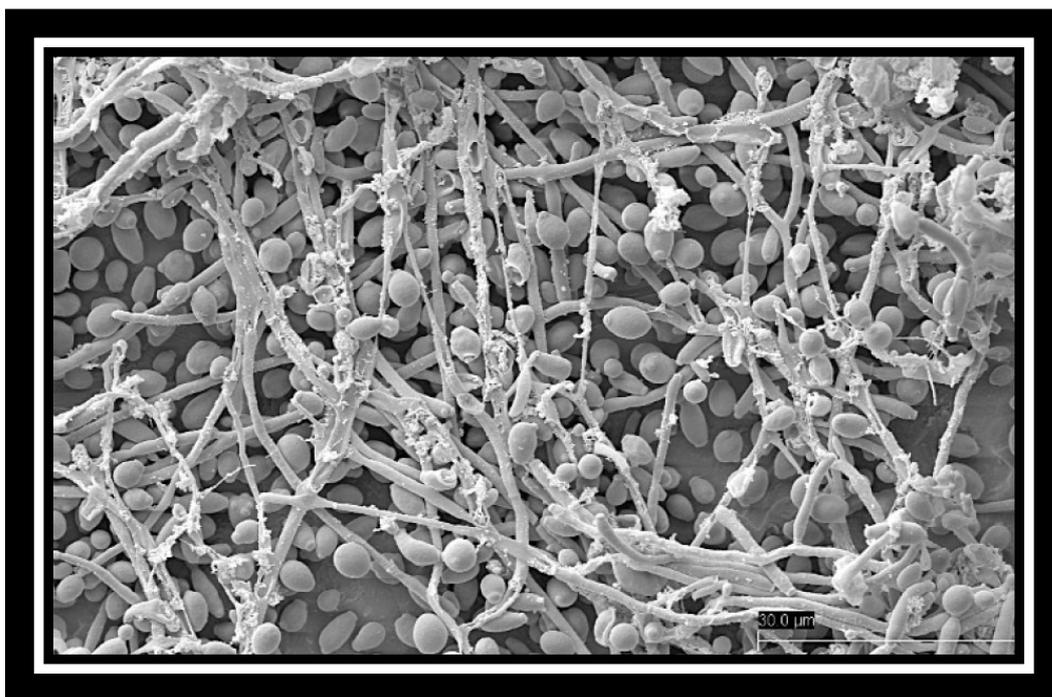
Sabe-se que leveduras de *Candida* migram do trato gastrointestinal inferior para o vestíbulo e a vagina adjacentes, rota similar à tomada por espécies de *Lactobacillus* vaginais (SOBEL, 2016). Em mulheres saudáveis não propensas à CVVR, a colonização assintomática pode persistir por meses e anos com as leveduras vivendo em simbiose com

a microbiota vaginal. Episódios agudos com desenvolvimento de sintomas de CVV ocorrem a partir de um colapso nessa relação simbiótica implicando no supercrescimento de *Candida* e concomitante alteração nos mecanismos de defesa do hospedeiro, que agem para manter um baixo número de leveduras, ao mesmo tempo em que regulam a resposta inflamatória imune destinada a tolerar um baixo número de micro-organismos (SOBEL, 2016).

A adesão das espécies de *Candida* ao epitélio é o primeiro evento na CVV (KING; LEE; MORRIS, 1980; VIDOTTO *et al.*, 2003), e é mediado por adesinas, proteínas da superfície celular que reconhecem, no hospedeiro, ligantes como as proteínas séricas e componentes da matriz extracelular dos tecidos (laminina, fibronectina, colágeno, vitronectina e entactina). Os genes que codificam adesinas fúngicas são propensos a recombinação, o que torna a colonização mais eficiente e a possibilidade de recorrência maior, dependendo do perfil fenotípico resultante expressado pelo fungo (VERSTREPEN; KLIS, 2006).

Na sequência da adesão ao epitélio, outro fator importante de persistência e recorrência das infecções é a formação do biofilme. Os biofilmes (Figura5) são caracterizados como comunidades microbianas sésseis altamente organizadas que se ligam irreversivelmente a um substrato, e produzem uma matriz extracelular que ao longo do tempo agrega novos micro-organismos, diminui a susceptibilidade aos agentes antimicrobianos e simultaneamente aumenta a disseminação da resistência a estes compostos, proporcionando assim um refúgio seguro para outros agentes patogênicos oportunistas (RODRÍGUEZ-CERDEIRA *et al.*, 2019).

Figura 5 – Biofilme de *Candida albicans* em fotografia eletrônica com aumento de 1000x



Leveduras e Blastocóndios no biofilme
Adaptado de KOBAN *et al.*, 2010 (KOBAN *et al.*, 2010)

Estudos demonstram a capacidade desta levedura de aderir também a superfícies abióticas, como cateteres, sondas e o Dispositivo Intrauterino (DIU) (DEMIREZEN; DIRLIK; BEKSAÇ, 2005), o que torna a presença deste dispositivo também um fator de risco para infecções recorrentes em mulheres predispostas, o que será explorado no tópico seguinte.

1.2.2 Fatores de risco

A resistência à colonização é pouco estudada e entendida, mas entre os fatores de risco que contribuem para o desenvolvimento da CVV, podemos destacar: fatores genéticos determinando a susceptibilidade do hospedeiro à infecção, desenvolvimento da resposta inflamatória, disbiose da microbiota vaginal (BRANDOLT *et al.*, 2017), idade, atividade sexual, patologias como *Diabetes mellitus* (GONÇALVES *et al.*, 2016), além de uso de contraceptivos orais a base de estrógenos, terapia de reposição hormonal, uso de antibióticos (SOBEL, 1997) e gravidez (ÁLVARES; SVIDZINSKI; CONSOLARO, 2007).

Com base na presença de fatores de risco, estudo recente de Sobel (2016) reforça que a recorrência de vaginites causadas por *Candida* pode ser atribuída ao aumento da

colonização vaginal por essa levedura, e classifica os fatores que favorecem essa colonização de forma agrupada em: associados ao hospedeiro (HIV, *Diabetes mellitus* descompensada, uso de antibióticos, uso de esteroides, terapia de reposição hormonal, dieta e presença de atopia vaginal), genéticos (polimorfismo, fatores familiares e associado à raça), comportamentais (uso de contraceptivo oral, uso de esponja contraceptiva, uso de Dispositivo Intrauterino – DIU, prática de sexo oral e a frequência da atividade sexual), dermatose vulvar, vaginoses bacterianas, infecções por espécies não *albicans*, e causas idiopáticas (SOBEL, 2016).

Além dos fatores de risco conhecidos envolvidos nas formas recorrentes, há que se considerar outras fontes de infecção como: *Candida* adquirida do intestino, por meio de contato sexual, ou de uma recaída resultante de um tratamento anterior que não conseguiu erradicar completamente a levedura (KANG *et al.*, 2018; SOBEL, 2016).

Entre os fatores de risco para CVVR listados, um de descoberta mais recente, pode estar implicado diretamente na patogênese da infecção: trata-se da disbiose vaginal, definida como o desequilíbrio da microbiota vaginal. A microbiota vaginal (MBV) tem um papel importante na prevenção da colonização por organismos patogênicos, incluindo agentes infecciosos do trato urinário e infecções sexualmente transmissíveis (ISTs), e atua na manutenção da saúde reprodutiva e ginecológica da mulher (MARTIN *et al.*, 2012).

Considerando-se a estreita relação entre a microbiota vaginal e a microbiota intestinal, há que se destacar a possibilidade da associação entre dieta e risco para CVV, uma vez que a disbiose intestinal pode estar fortemente associada ao tipo de dieta. Estudos funcionais em modelos animais, juntamente com estudos descritivos de associação em humanos, fornecem evidências para o papel da dieta na patogênese de doenças, por meio de seus efeitos sobre o microbioma intestinal (ALBENBERG; WU, 2014; WEISS; HENNET, 2017).

É conhecido que diferentes padrões alimentares, em particular a composição de macronutrientes e micronutrientes da dieta, contribuem para a remodelação da microbiota intestinal (MOSZAL; SZULINSKA; BGDANSKI, 2020). Em 2018, um estudo avaliou a colonização retal por *Candida* spp. em 120 pacientes divididas em dois grupos: um tratado apenas com antifúngico e outro tratado com antifúngico associado à dieta restrita em: açúcar, alimentos ultraprocessados, carboidratos simples, leite, gorduras saturadas, embutidos e álcool. A cultura resultou negativa após o tratamento em 85% do grupo cujo tratamento foi associado a dieta, e no grupo que recebeu apenas antifúngico resultou

negativa em 42%. (OTAŠEVIĆ *et al.*, 2018).

Outro estudo que buscou identificar fatores de risco em mulheres diagnosticadas por métodos laboratoriais com CVV, comparando-as com mulheres assintomáticas e com testes laboratoriais que excluíram colonização por *Candida* spp. encontrou associação entre consumo de leite e derivados e alterações do hábito intestinal e a ocorrência de CVV (PEREIRA *et al.*, 2021). Assim, considerando que as leveduras podem migrar da porção final do intestino para a vagina, pode-se inferir que a dieta, ao favorecer a colonização do reto, juntamente a outros fatores predisponentes, pode sim ser elencada como fator de risco para CVV.

1.2.2.1 Microbiota Vaginal

A alteração da microbiota vaginal é afetada por fatores internos e externos, incluindo mudanças hormonais (estrogênio), menstruação, microbiota intestinal (pela proximidade do reto), uso de produtos de higiene íntima, interação sexual e uso de contraceptivos (REID, 2018).

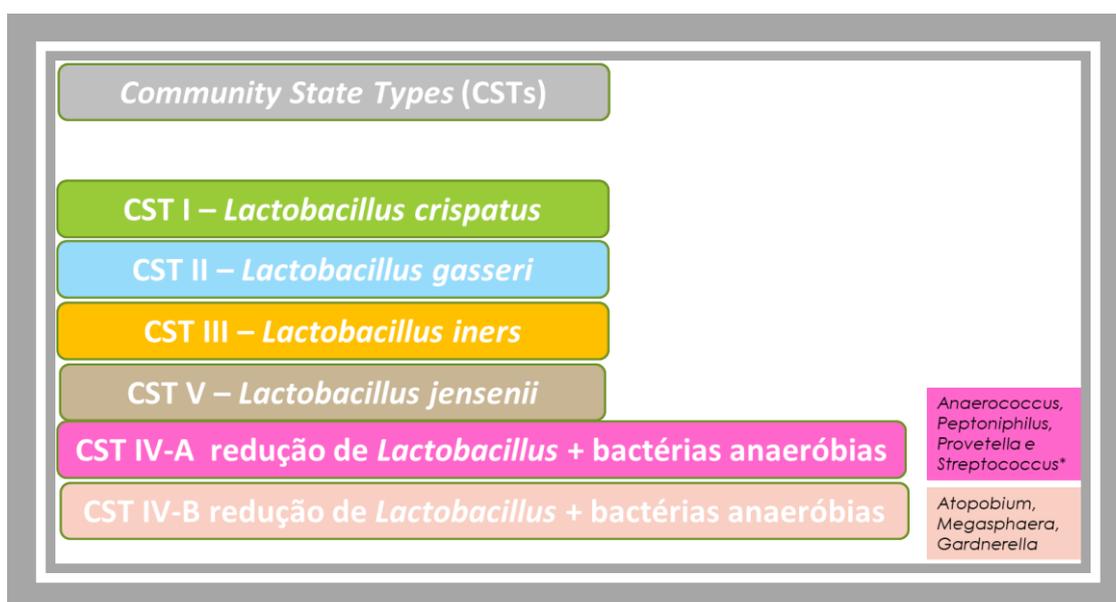
Apesar de sua importância, o estudo mais aprofundado da microbiota vaginal não era possível até um passado recente, pois 90% das espécies microbianas principais que a compõe, não são cultiváveis em laboratório (AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995), e essa identificação só pode ser realizada empregando técnicas moleculares. Na última década, análises filogenéticas de amostras vaginais (principalmente sequenciamento do gene RNA ribossômico 16S bacteriano) mostrou que as comunidades bacterianas na vagina são mais complexas do que se conhecia anteriormente (WIJGERT *et al.*, 2014).

O primeiro estudo usando métodos moleculares para caracterizar o MBV foi publicado em 2002 (BURTON; REID, 2002), e desde então, vários estudos têm demonstrado que a redução do número de *Lactobacillus* spp. que compõem a microbiota vaginal normal favorece o crescimento de bactérias anaeróbias, e outros patógenos, com aumento do risco de infecção por *Gardnerella vaginalis* e outras vaginoses bacterianas (PETROVA *et al.*, 2015), além de permitir a entrada de outros patógenos como: Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), Papiloma Vírus Humano (HPV) e *Trichomonas vaginalis* (MITRA *et al.*, 2016).

A partir do início da década, a identificação por técnicas moleculares da composição de microbiota vaginal de mulheres de diferentes etnias, suscitou a proposição de uma nova classificação da microbiota vaginal, agrupando os principais micro-

organismos encontrados em cinco categorias, referidas como *Community State Types* (CST). A distribuição e classificação da microbiota vaginal (Figura 6). procede da seguinte forma (Figura 6): CST I (dominada por *Lactobacillus crispatus*), CST II (dominada por *Lactobacillus gasseri*), CST III (dominada por *Lactobacillus iners*), CST IV-A (possui proporções menores de *Lactobacillus* spp. e altas proporções de micro-organismos pertencentes ao gênero *Anaerococcus*, *Peptoniphilus*, *Prevotella* e *Streptococcus*; e espécies que podem estar associadas à infecções como *Gardnerella vaginalis* ou *Mobiluncus* spp.), CST IV-B (reduzida quantidade de *Lactobacillus* spp. e proporções elevadas de *Atopobium vaginae*, *Megasphaera* spp., *Clostridiales*, entre outras espécies que causam vaginose bacteriana) (BROTMAN *et al.*, 2014; GAJER *et al.*, 2012; MITRA *et al.*, 2016; RAVEL *et al.*, 2011).

Figura 6 – Classificação *Community State Types* (CSTs) da microbiota vaginal



Fonte: Adaptado de RAVEL *et al.*, 2011; GAJER *et al.*, 2012; BROTMAN *et al.*, 2014; MITRA *et al.*, 2016

Ainda que existam outros micro-organismos presentes na microbiota vaginal normal, *Lactobacillus* spp. são predominantes em aproximadamente 70% das mulheres, sendo mais prevalentes: *Lactobacillus crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners* e *L. jensenii*. São encontrados também *L. salivarius* e *L. vaginalis*, e além destes, também estão presentes *Lactobacillus* provenientes do trato gastrointestinal como o *L. rhamnosus*, *L. casei* e *L. plantarum*, uma vez que o intestino funciona como reservatório desses micro-organismos,

que acabam por acessar o trato genital inferior por meio da região perianal adjacente (CASTRO *et al.*, 2015; GONÇALVES *et al.*, 2016).

Estudos têm demonstrado que os *Lactobacillus* formam uma importante barreira defensiva contra a infecção por *Candida* spp., agindo mediante diferentes mecanismos como: a competição pelos nutrientes disponíveis, a formação de co-agregados bloqueando a ligação dos fungos a receptores epiteliais, a expressão de substâncias que são capazes de inibir a transição levedura-hifas (peróxido de hidrogênio - H₂O₂, lactocinas e acidolinas), a modulação da resposta imune com produção de citocinas do perfil Th1 (secreção de IL-8 e IL-10), ou uma inibição das citocinas pró-inflamatórias (IL-1 e IL-6) no epitélio infectado (JØRGENSEN *et al.*, 2017; MALIK *et al.*, 2016).

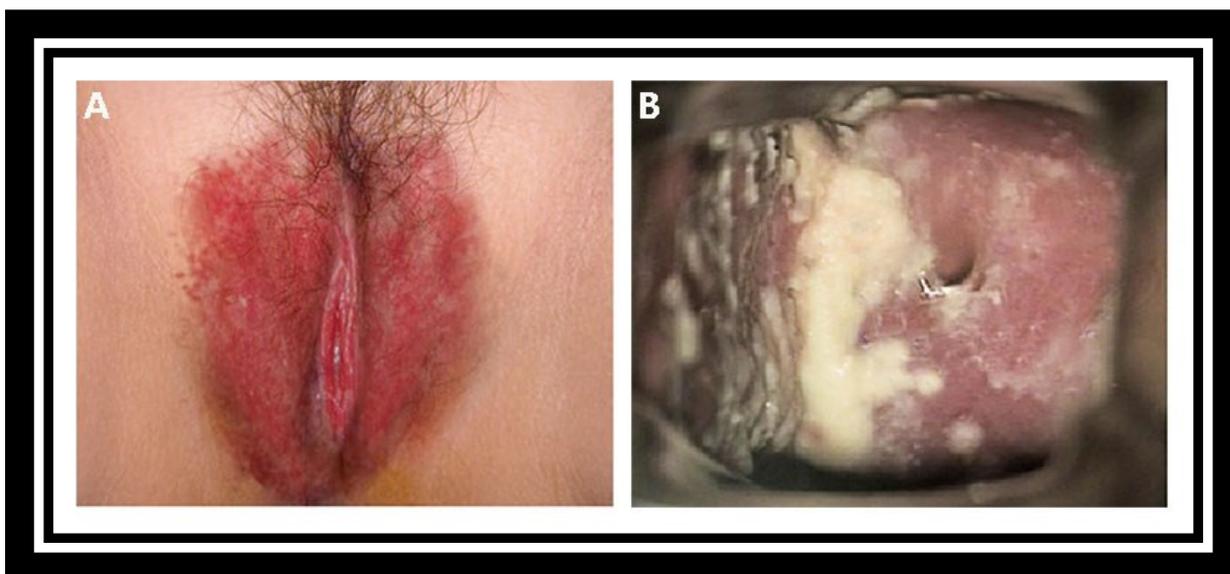
1.3 Diagnóstico Clínico-Laboratorial

1.3.1 Apresentação clínica e diagnósticos diferenciais

O diagnóstico clínico da CVV não complicada tem como base a presença de sintomas característicos e no achado de secreção vaginal espessa, em grumos, que pode variar do branco ao amarelo-esverdeado, acompanhada ou não por vulvite, eczema e fissuras (GONÇALVES *et al.*, 2016; SOBEL, 2007). O prurido, é o sintoma mais notório da CVV, porém nem todas as mulheres que apresentam esse sintoma são confirmadas como portadoras dessa condição.

Ademais, não é possível saber se o prurido é causado pela infecção em si, ou pelo contato da vulva com a secreção, uma vez que as paredes vaginais são desprovidas de receptores para prurido (VIEIRA-BAPTISTA; BORNSTEIN, 2019). Fissuras e escoriações podem causar dor vulvar e disúria terminal, o edema quando presente, é mais exuberante nos pequenos lábios, e a hiperemia vulvar é vista em até 40% dos casos. A vagina e o colo uterino podem estar cobertos por uma secreção espessa e de coloração frequentemente branca (Figura 7), mas geralmente não há aspecto de cervicite, podendo porém ocorrer sangramento ao tentar-se remover os grumos aderidos à parede vaginal (MENDLING, 2015).

Figura 7 – Apresentação clínica da CVV



A - Vulvite (Adaptado de VIEIRA-BATISTA; BORNSTEIN, 2019) e B - Exame especular de paciente com candidíase, cultura positiva para *C. albicans* (Arquivo Pessoal)

Embora essa apresentação clínica seja frequente na CVV, esses sintomas não são específicos, e podem estar associados a outras condições clínicas, tais como vaginite descamativa ou aeróbia, vaginite citolítica, tricomoníases (ANDERSON; KLINK; COHRSEN, 2004) (Quadro 1). Essas vaginites têm sido descritas como condições inflamatórias decorrentes de uma disbiose vaginal, com proliferação excessiva de determinados micro-organismos como é o caso das vaginites, aeróbia e citolítica, ou são definidas como infecções de transmissão sexual, como a tricomoníase (VIEIRA-BAPTISTA; BORNSTEIN, 2019).

Quadro 1 – Diagnóstico diferencial de sintomas e sinais das vaginites

	VARIAÇÃO DOS SINTOMAS COM CICLO MENSTRUAL	SINTOMAS	SINAIS
CANDIDÍASE	Pode piorar na fase lútea, pode melhorar com a menstruação	Prurido, disúria terminal, dispareunia, irritação, queimação	Edema e eritema de vulva, fissuras, secreção branca, espessa, aderida, sem odor
TRICHOMONÍASE	Piora durante a menstruação	Assintomática ou pode apresentar disúria, prurido, queimação, irritação	Edema , eritema , fissuras, cervicite (colo com aspecto de framboesa), secreção amarelo esverdeada, com odor de podre
VAGINITE AERÓBIA	Piora na menstruação	Queimação, ardência, irritação, disúria	Secreção amarelo esverdeada, purulenta, erosões , eritema , mau odor
VAGINITE CITOLÍTICA	Piora na fase lútea	Predomina queimação e ardência, eventualmente prurido	Secreção branca, fluida pode haver algum eritema

Fonte: VIEIRA BAPTISTA; BORNSTEIN,2019; YANG,2017; HU,2015; DONDERS 2002

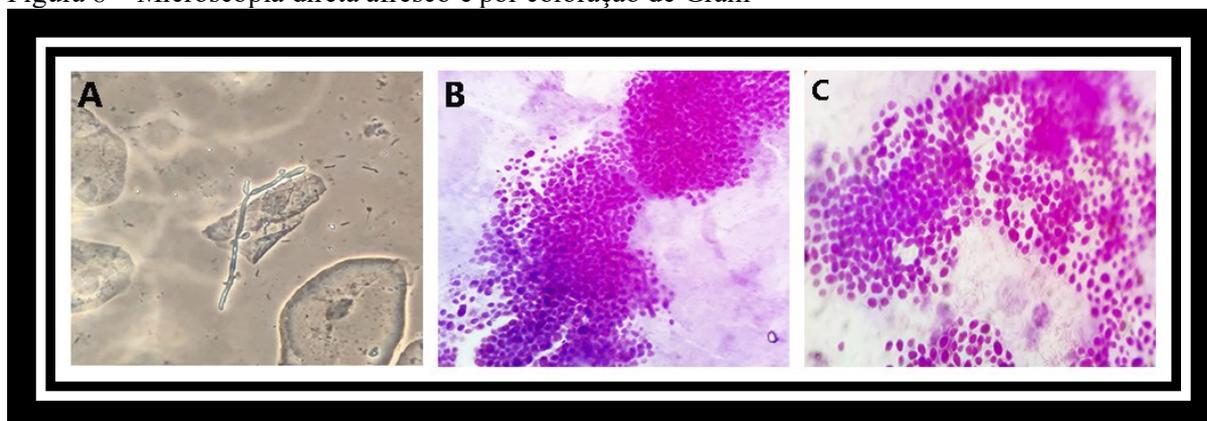
A vaginite aeróbia, descrita em 2002 por Donders, é uma condição inflamatória que pode cursar com sintomas irritativos e leucorreia, e tem origem em um desequilíbrio da microbiota vaginal, com aumento de micro-organismos aeróbios comensais do intestino, como as Enterobacterias e *Streptococcus agalactiae* do grupo B, em detrimento da diminuição do número de *Lactobacillus* spp. (DONDERS *et al.*, 2002, 2005). A reação inflamatória ocorre em vários graus e pode ser caracterizada pela quantidade de leucócitos presentes no esfregaço vaginal e também pela presença de leucócitos com grânulos tóxicos (DONDERS; SOBEL, 2017). A forma mais severa, foi descrita pela primeira vez em 1968 (GARDNER, 1968) como vaginite descamativa e mais tarde classificada como um tipo de vaginite aeróbia (DONDERS *et al.*, 2005).

Já a vaginite citolítica é descrita como proliferação excessiva de *Lactobacillus*, principalmente a espécie *L. Crispatus*, levando ao aumento da concentração de ácido láctico, que cursa com diminuição importante do pH e conseqüente citólise. Sintomas irritativos como queimação, ardência, disúria e eventualmente prurido caracterizam a apresentação clínica, além de aumento significativo da secreção vaginal (HU *et al.*, 2015; YANG *et al.*, 2017). Não estão elucidados os mecanismos que levam ao crescimento excessivo dos *Lactobacillus*, porém , a piora de sintomas frequentemente descrita durante a fase lútea, gestação ou perimenopausa corrobora a hipótese pela qual variações hormonais podem ter papel importante (SOARES, 2017).

1.3.2 Diagnóstico laboratorial

A microscopia direta, é considerada o principal meio de diagnóstico das infecções fúngicas (WILLINGER; HAASE, 2013). Pode ser realizada a fresco, utilizando Hidróxido de Potássio (KOH) 10-20%, que degrada os componentes proteicos presentes nas amostras biológicas, deixando a parede celular dos fungos intacta, o que permite sua visualização (Figura 8A) (LEASE; ALEXANDER, 2011; SOBEL, 2016), ou pelo método da coloração de Gram (FIGURA 8B e 8C). A microscopia direta é um teste de baixa complexidade e de baixo custo, porém apresenta baixa sensibilidade, que varia de 40-70%, pois o resultado é dependente da experiência do microscopista (SOBEL, 2016).

Figura 8 – Microscopia direta afresco e por coloração de Gram



A-Microscopia Direta a fresco (Microscópio de contraste de fase, aumento 400x) (Adaptado de VIEIRA-BATISTA; BORNSTEIN, 2019), B e C – Microscopia direta por coloração de Gram (Microscópio Óptico, aumento 400x em B e 1000x em C) (Arquivo Laboratório de Microbiologia e Imunologia Clínica – LabMIC – UnB)

Outra forma de visualizar fungos em microscopia direta, pode ser pela reação com outros corantes, como o lactofenol e/ou azul de algodão, que quando em contato com células fúngicas marcam a parede celular externa; ou ainda pela adição de um fluoróforo que se liga à quitina presente nas paredes das células fúngicas, o *Calcofluor white* (LEASE; ALEXANDER, 2011; OTAŠEVIĆ *et al.*, 2018).

Estes testes iniciais positivos, confirmam a presença de leveduras, o que pode ajudar a estabelecer uma terapia inicial, ainda que empírica. Contudo, na impossibilidade de realização da microscopia direta, ou no seguimento do diagnóstico laboratorial, recomenda-se a realização da cultura para fungos, que foi considerada o padrão-ouro na identificação de fungos por muitos anos, embora apresente também baixa sensibilidade (LEASE; ALEXANDER, 2011; SOBEL, 2016).

A cultura de fungos dependerá de meios de cultivo para a realização de um

isolamento primário dos fungos, e poderá no caso das leveduras do gênero *Candida*, empregar meios cromogênicos, que permitem uma rápida identificação presuntiva das espécies, diferenciando as espécies *albicans*, das não *albicans* (LEASE; ALEXANDER, 2011; WILLINGER *et al.*, 2001).

Quando o emprego de meios cromogênicos não permitem a identificação das espécies, para a identificação das leveduras é necessário a realização de subcultivos da cultura isolada para a realização de testes bioquímicos de assimilação de compostos como por exemplo, açúcares e aminoácidos, dentre outros substratos (MAHMOUD *et al.*, 2012).

Estes testes bioquímicos podem ser adquiridos comercialmente para realização manual após incubação da amostra fúngica isolada, ou podem empregar métodos semi-automatizados e automatizados, que utilizam painéis de identificação rápida para leveduras com vários substratos (WINSTANLEY; COURVALIN, 2011), embora apresentem falhas durante o processo de identificação das leveduras.

Mais recentemente, com o advento da era molecular, métodos que empregam DNA para identificação de fungos são cada vez mais utilizados, sendo capazes de fornecer resultados precisos e em um tempo menor que o da cultura, apesar de apresentar valor mais elevado no custo final do exame (SOBEL, 2016).

Embora o primeiro teste molecular para determinação de espécies de *Candida* tenha sido descrito em 1987 (SCHERER; STEVENS, 1987), somente na última década, com o maior desenvolvimento da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction* – Reação em Cadeia da Polimerase), vários estudos vêm sendo publicados demonstrando sensibilidade da técnica > 90% em identificar as espécies de *Candida*, quando comparada à cultura e aos métodos bioquímicos (AHMAD *et al.*, 2012; AVNI; LEIBOVICI; PAUL, 2011; NGUYEN *et al.*, 2012; TELLAPRAGADA *et al.*, 2014).

Uma alternativa que vem surgindo é a espectrometria de massas, técnica analítica utilizada para identificar compostos desconhecidos, quantificar compostos conhecidos e elucidar a estrutura e as propriedades químicas das moléculas. Esta técnica consiste na ionização de átomos ou moléculas de uma amostra, na separação destes átomos ou moléculas em função da sua relação massa/carga (m/z) e em seguida sua identificação e quantificação (GOULART; RESENDE, 2013).

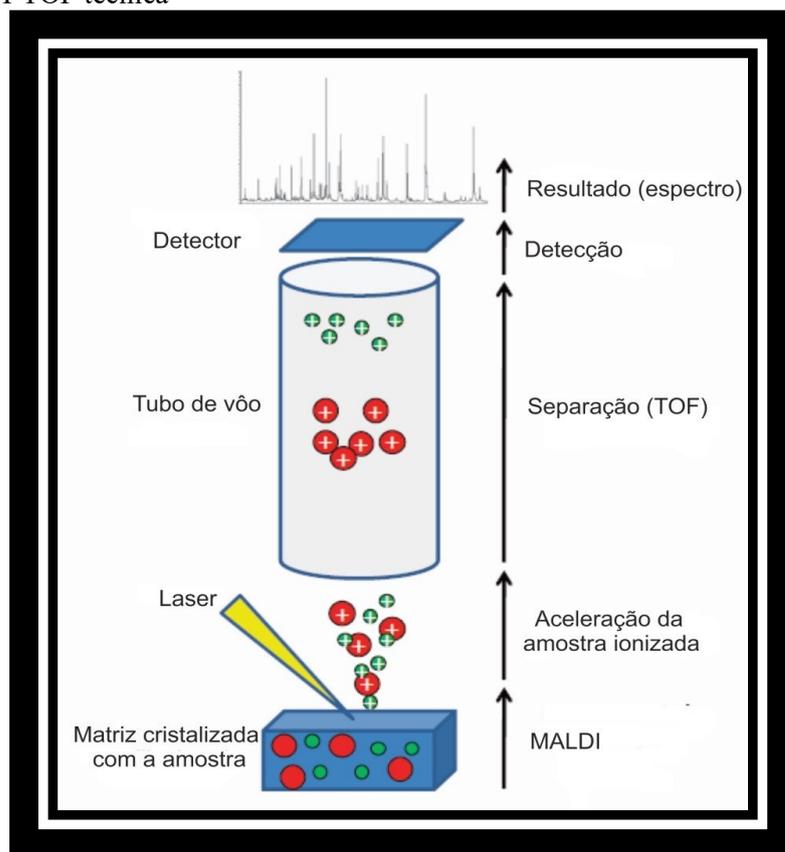
Diferentes abordagens desta técnica, baseadas em vários sistemas de ionização e detecção, têm sido desenvolvidas. Atualmente, um dos métodos mais amplamente utilizados para a análise de biomoléculas é o de Ionização por Dessorção a Laser assistida

por Matriz, cuja sigla em inglês é MALDI (*Matrix Assisted Lazer Desorption Ionization*), seguida pela detecção em um analisador do tipo tempo de voo, sigla TOF (do inglês *Time of flight*), MALDI-TOF (TANAKA, 2003; WIESER *et al.*, 2012).

Resumidamente, a técnica da MALDI-TOF (Figura 9) consiste na deposição de uma determinada amostra em uma matriz capaz de fornecer prótons (ou H⁺) para o processo de ionização dos componentes da amostra. Quando esta matriz absorve a energia emitida por um laser, ocorre a transferência de prótons da matriz para os componentes da amostra e ao mesmo tempo desencadeia-se um processo de dessorção, o que possibilita a passagem da amostra do estado sólido para o gasoso (GOULART; RESENDE, 2013; JANG; KIM, 2018).

Os componentes da amostra ionizados e dessorvidos são direcionados para o analisador TOF, onde são acelerados através de um campo elétrico dentro de um tubo a vácuo, até que atinja o detector. Neste tubo a vácuo, os componentes da amostra são separados de acordo com sua massa/carga (m/z), chegando ao detector em diferentes tempos. Desse modo, os analitos ou substâncias das amostras, separados por TOF formam espectros de massas (como a impressão digital dos seres humanos, cada um tem uma diferente) de acordo com sua razão m/z (massa/carga) e com picos que indicam quantidades variáveis de cada substância analisada (analito). Para a identificação dos analitos, cada pico é comparado com um banco de dados, arquivo contendo todas as impressões digitais das moléculas (GOULART; RESENDE, 2013; JANG; KIM, 2018) .

Figura 9 – MALDI-TOF técnica



Adaptado de GOULART; RESENDE, 2013

O MALDI-TOF, tem sido aceito como uma ferramenta rápida e confiável para identificação precisa de leveduras, pois os espectros gerados na identificação são como assinaturas únicas de cada micro-organismo, sendo considerada então, por apresentar mais de 90% de especificidade na identificação de espécies, a metodologia ideal para ser empregada na identificação de espécies fúngicas (ALIZADEH *et al.*, 2017; CROXATTO; PROD'HOM; GREUB, 2012; MARKLEIN *et al.*, 2009).

Essas novas estratégias de identificação de fungos, embora representem um maior custo na identificação, apresentam uma especificidade elevada na identificação correta das espécies fúngicas que causam infecção, além de um tempo de resposta mais rápido, o que pode gerar um melhor custo-benefício ao paciente, e a possibilidade de identificação de mais de uma espécie fúngica na mesma infecção, no caso do emprego de técnicas moleculares como o RT-PCR.

No caso da CVV em especial, isso pode representar um diagnóstico correto, e mais que isso, uma intervenção de tratamento mais efetivo. Quando estudos de microbiota vaginal são realizados em simultâneo à identificação das leveduras das espécies de *Candida* que causam candidíase, há ainda a possibilidade de correção dessa microbiota

vaginal, promovendo um tratamento ainda mais amplo e com maior chance de cura.

1.4. Tratamento

Os antifúngicos disponíveis com ação contra os fungos do gênero *Candida*, são classificados segundo o seu mecanismo de ação (Quadro 2) em:

(1) Poliênicos, foram os primeiros fármacos antifúngicos, atuam na membrana celular, ligam-se ao ergosterol e promovem a formação de poros, que culmina com a sua ruptura e morte celular, têm uma leve afinidade com o colesterol, o que explica sua alta toxicidade, nesta classe estão, a nistatina, liberada apenas para uso tópico, e a anfotericina B, para uso endovenoso nos casos de candidemia sistêmica ou tópico por via vaginal;

(2) Azólicos que atuam em etapas diferentes da via da biosíntese do ergosterol, bloqueando sua síntese, o que leva a alterações na conformação da membrana, inibindo assim o crescimento e replicação do fungo (fungistáticos). São divididos em dois grupos: o primeiro, compreendendo os imidazólicos (clotrimazol, miconazol e cetoconazol) e o segundo, com espectro de ação um pouco maior e menor toxicidade, compreendendo os triazólicos (fluconazol, itraconazol, voriconazol);

(3) Equinocandinas, mais recentemente aprovadas pelo *Food and Drug Administration* (FDA) e pela *European Medicines Agency* (EMA) que atuam na parede celular fúngica bloqueando a síntese de β -(1,3) -D-glicana, um importante componente da parede celular fúngica, levando a alterações estruturais e lise celular, apresenta menor toxicidade, porém, meia vida curta e pouca absorção gastrointestinal, sendo seu uso intravenoso. Nesta classe estão a caspofungina e micafungina;

(4) Análogos de pirimidina, que atuam no núcleo, inibindo a síntese dos ácidos nucleicos e proteínas (ex.: 5-fluorocitosina) (CAMPOY; ADRIO, 2017; GHANNOUM; RICE, 1999; MAUBON *et al.*, 2014; PERLIN, 2011; SANGUINETTI; POSTERARO; LASS-FLÖRL, 2015)

Quadro 2: Classificação dos fármacos antifúngicos quanto ao mecanismo de ação

CLASSE	MECANISMO DE AÇÃO	FÁRMACOS DISPONÍVEIS
POLIÊNICOS	MEMBRANA CELULAR: ligam-se ao ergosterol, ruptura e morte celular, afinidade com o colesterol: toxicidade	NISTATINA ANFOTERICINA B
AZÓLICOS	FUNGISTÁTICOS: inibem enzima dependente do cromossomo P450, bloqueiam a síntese de ergosterol (membrana), inibe o crescimento e replicação do fungo	IMIDAZÓLICOS: Clotrimazol, miconazol, cetoconazol
		TRIAZÓLICOS: fluconazol, itraconazol, voriconazol
EQUINOCARDINA	PAREDE CELULAR: bloqueia a síntese de β -(1,3)-D-glicana, lise celular, menor toxicidade, meia vida curta e pouca absorção gastrointestinal	CAPSOFUNGINA MICOFUNGINA
ANÁLOGOS DA PIRIMIDINA	NÚCLEO: inibindo a síntese dos ácidos nucleicos e proteínas	5-FLUOROCITOSINA

Fonte: GHANNOUM; RICE, 1999; PERLIN, 2011; MAUBON et al., 2014; SANGUINETTI; POSTERARO; LASS-FLÖRL, 2015

Na prática clínica, o tratamento das candidíases é normalmente empírico. O *Centers of Disease Control* (CDC), em seu último *guideline* publicado em 2015, recomenda como primeira escolha para tratamento de episódio agudo de CVVa administração de azólico tópico ou oral de curta duração, ou seja, dose única ou tratamentos de 1 a 3 dias, sendo mais comum a utilização do fluconazol por via oral. Para os casos de CVV severa, recomenda um regime estendido, com 3 doses de azólico por via oral com intervalos de 72h e 7 dias, ou tratamento tópico, com a mesma classe de fármaco, por 7 a 14 dias. Para os casos de CVVR recomenda o tratamento inicial tópico de 7 dias e regime de manutenção com doses semanais de 100 a 200 mg de fluconazol por 6 meses, ressaltando que ainda pode ser observada uma taxa de recorrência de 30 a 50% ao final dos 6 meses (BURSTEIN; WORKOWSKI, 2003).

Quanto à CVVR, sabe-se as espécies não *albicans* (NA), têm papel importante pela possibilidade de apresentarem resistência intrínseca, tais como a *C. glabrata* e a *C. krusei*. Além das espécies NA, deve-se considerar sempre a possibilidade de resistência da *C. albicans*, nesse aspecto torna-se imperativa a realização do antifungograma. Cumpre ressaltar que os padrões de sensibilidade de *C. albicans* ao fluconazol foram alterados recentemente:: as cepas são consideradas sensíveis atualmente apenas na vigência de um MIC ≤ 2 $\mu\text{g/mL}$, enquanto referências anteriormente utilizavam um valor de MIC ≤ 8 $\mu\text{g/mL}$ (SOBEL; SOBEL, 2018). Não obstante, o valor de MIC ≤ 8 $\mu\text{g/mL}$ continua a ser

liberado em resultados laboratoriais de rotina nos testes de sensibilidade a antifúngicos, como MIC suscetível, reduzindo as chances de efetividade do tratamento ao paciente e/ou contribuindo na seleção de linhagens resistentes. A frequência de mulheres com CVVR resistente ao fluconazol vem aumentando, e um agravante do insucesso no tratamento pode ser a possível resistência cruzada aos azólicos (SOBEL; SOBEL, 2018).

Apesar de não haver estudos controlados disponíveis, na experiência de alguns autores, o ácido bórico administrado em cápsulas vaginais com 600 mg por 14 dias, resultou em alívio rápido dos sintomas e culturas negativas (DE SETA *et al.*, 2009; IAVAZZO *et al.*, 2011; PATEL *et al.*, 2004), e essa alternativa encontra-se recomendada no *Guideline* 2015 do CDC com uma posologia semelhante 600 mg de ácido bórico uma vez por dia por duas semanas (BURSTEIN; WORKOWSKI, 2003). Além disso, em estudo *in vitro* o ácido bórico foi capaz de interferir no desenvolvimento de biofilme e na transformação em hifa das leveduras da espécie *Candida albicans* (DE SETA *et al.*, 2009), evidenciando um possível mecanismo de ação para este composto.

1.5. Perspectivas atuais de tratamento

Tanto a resistência da *C. albicans* aos azólicos e outras classes de fármacos, quanto o aumento das infecções por espécies não *albicans*, têm movido pesquisadores à investigação de novos medicamentos e ao estudo da eficácia de terapias alternativas. Entre os novos fármacos de potencial interesse estão as isoquisolinas e aminopiperidinas, novos compostos da classe dessa última, possuem atividade contra cepas de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei* resistentes ao fluconazol (HATA *et al.*, 2010). Já os derivados de isoquinolina mostraram, além de ausência de toxicidade contra células humanas *in vitro*, atividade contra *C. glabrata* resistente a azólicos (KRAUSS *et al.*, 2014).

Além de compostos sintéticos, um grande número de estudos envolvendo produtos naturais, derivados de plantas, com efeitos anti-*Candida*, especialmente *C. albicans*, tem sido conduzidos nas últimas décadas. Os estudos utilizam diferentes plantas medicinais e diferentes frações, como extratos aquosos e óleos essenciais. Diversos mecanismos de ação já foram identificados, e alguns produtos mostraram-se eficazes tanto em estudos *in vitro* como *in vivo*, representando alternativas promissoras para o tratamento das candidíases (ZIDA *et al.*, 2017).

O crescimento dos trabalhos envolvendo uso de nanopartículas nas últimas décadas torna seu uso contra candidíase uma estratégia interessante. Nanopartículas

contendo óxido de zinco (ZnONPs) - composto grandemente empregado como microbicida, com eficácia e segurança - tem despontado como agentes promissores, sozinhas ou em combinação a fungicidas. BARAD et al(2017) mostraram que ZnONPs revestidas com quitosana-ácido oleico são efetivas na inibição do crescimento e da formação de biofilmes de *C. albicans* (BARAD et al., 2017). DAS et al (2016) mostraram que ZnONPs são ativas contra *C. krusei* e que sua ação antifúngica provavelmente está relacionada a estresse oxidativo e produção de espécies reativas de oxigênio (DAS et al., 2016).

Mais uma linha de pesquisa, a dos mecanismos de defesa induzidos na vagina durante a infecção por *Candida*, evidenciados em modelos animais, está conduzindo a estudos com objetivo de desenvolver vacinas e imunoterapias (BERNARDIS et al., 2018).

Duas dessas vacinas passaram na fase 1 de ensaios clínicos para segurança e imunogenicidade, e uma delas entrou em um ensaio clínico de fase 2. Ambas as vacinas evidenciaram proteção em modelos de rato e camundongo de infecção vaginal por *C. albicans*, embora com um mecanismo ligeiramente diferente de proteção imunológica (CASSONE, 2008, 2013; CASSONE; CASADEVALL, 2012; EDWARDS, 2012; IANNITTI; CARVALHO; ROMANI, 2012; MORAGUES et al., 2014).

Em 2018, Edwards publicou resultados de estudo randomizado placebo-controlado de fase 2, de vacina contendo a porção N-terminal da proteína de sequência 3 (Als3) semelhante à aglutinina de *Candida albicans*, um fator de virulência específico de hifas que é mediador no processo de adesão e invasão de células epiteliais humanas

O estudo em 178 mulheres com CVVR mostrou que 1 dose intramuscular da vacina era segura e gerou respostas imunes de células B e T rápidas e robustas. Análises exploratórias *post hoc* revelaram um aumento estatisticamente significativo na porcentagem de pacientes sem sintomas em 12 meses após a vacinação, porém o impacto positivo foi menor nas pacientes com mais de 40 anos, 23% contra 77% no grupo < 40 anos (EDWARDS et al., 2018).

Embora o mecanismo de resposta imunológica desta vacina não tenha sido completamente elucidado foi considerada com potencial terapêutico, uma vez que houve redução de sintomas, sem erradicação do micro-organismo. Existem indícios de que ela atue induzindo tanto a resposta mediada por linfócitos T quanto incrementando a resposta imune via linfócitos B (CASADEVALL; PIROFSKI, 2018).

Outra abordagem a ser considerada, diante da notável evolução no conhecimento

acerca da microbiota vaginal e intestinal, é o uso dos probióticos. Diferentes mecanismos de ação dos *Lactobacillus* contra *Candida* sp. têm sido descritos, e envolvem o bloqueio da adesão das leveduras, da formação de biofilme, da transformação em hifas, bem como diminuição da expressão de genes de virulência (RIBEIRO *et al.*, 2019).

Um crescente número de estudos *in vivo* e *in vitro* tem avaliado a eficácia de administração de diferentes cepas de *Lactobacillus*, tanto por via oral como por via vaginal, e embora, sejam estudos heterogêneos, às vezes ainda limitados em número de participantes, têm demonstrado resultados promissores (HAPPEL *et al.*, 2017; HECZKO *et al.*, 2015; KIM; PARK, 2017; MATSUBARA *et al.*, 2016; PAROLIN *et al.*, 2015; PENDHARKAR *et al.*, 2015; RIBEIRO *et al.*, 2019; ROSTOK *et al.*, 2019; RUSSO *et al.*, 2019).

O repovoamento vaginal com *Lactobacillus* pode ser realizado por via oral, embora com tempo mais longo em relação à administração por via vaginal, e dependente da viabilidade das cepas ao atravessarem estômago e intestino (MORELLI *et al.*, 2004).

Entretanto, a vantagem da suplementação oral é a colonização do reto, podendo reduzir a transferência de leveduras e outros micro-organismos patogênicos do reto para a vagina (BURTON; REID, 2002). Algumas cepas de *Lactobacillus*, com atividade microbicida contra diversos patógenos urogenitais, mostram características tidas como ideais para uso vaginal, como capacidade de adesão às células epiteliais e de formação de biofilmes (CAMILLETTI *et al.*, 2018; ROSTOK *et al.*, 2019).

Diante de uma infecção altamente prevalente, que afeta mulheres de diferentes etnias em todo o mundo, está clara a urgência de mudar o paradigma do tratamento empírico e passar a considerar com prioridade a identificação do agente etiológico das infecções, com a maior precisão possível, bem como melhor identificar e estudar os fatores de risco associados, a fim de evitar custos elevados e efeitos adversos de tratamentos prolongados de baixa eficácia, proporcionando assim, uma melhor qualidade e vida às mulheres afetadas.

2. JUSTIFICATIVA

A revisão de literatura que fundamentou a elaboração do presente estudo não identificou estudos longitudinais, com acompanhamento das pacientes diagnosticadas com vulvovaginite por *Candida* spp, e análise de recorrência. Elevada parte dos dados de prevalência de CVVR e fatores de risco, são obtidos por questionários de sintomas relatados, sem inclusão sistemática de diagnóstico laboratorial, sendo constatada durante essa revisão, uma relativa escassez de estudos desenhados de forma a estabelecer relação entre sintomas e diagnóstico laboratorial por método de alta sensibilidade.

Destaca-se que no Brasil, há poucos estudos tanto de prevalência e incidência de espécies de *Candida* em mulheres acometidas por CVV, quanto de análise de sensibilidade a antifúngicos de espécimes coletados de pacientes sintomáticas. Neste contexto, este trabalho ao possibilitar a identificação precisa das espécies de leveduras presentes em amostras de pacientes com candidíase, ao avaliar o perfil de sensibilidade frente a um antifúngico amplamente empregado no tratamento da infecção, ao avaliar a recorrência da candidíase de forma prospectiva em seguimento terapêutico e ao elencar novos fatores de risco que podem estar associados à infecção por *Candida* spp., justifica-se por trazer uma importante contribuição para o estudo da CVV, fomentando o desenvolvimento de novas estratégias de pesquisas que forneçam soluções para o manejo clínico da candidíase.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Investigar clínica e laboratorialmente casos de CVV enumerando os principais sintomas e fatores de risco associados, e as espécies de *Candida* spp. isoladas.

3.2. Objetivos específicos

Identificar os principais sintomas e fatores de riscos associados à candidíase na população estudada.

Avaliar Valor Preditivo Positivo dos sintomas para o diagnóstico da CVV.

Isolar espécies de *Candida*, por métodos fenotípicos e presuntivos.

Identificar as espécies por espectrometria de massa *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-flight* (MALDI-TOF).

Descrever a prevalência e as espécies de *Candida* (identificadas na população estudada).

Determinar perfil de sensibilidade ao antifúngico fluconazol.

Avaliar a recorrência da CVV por coleta de nova amostra em paciente sintomática e análises laboratoriais.

4. METODOLOGIA

4.1. População Estudada e Critérios Éticos

Foram incluídas neste estudo prospectivo, pacientes atendidas no Ambulatório de Ginecologia do Hospital Universitário de Brasília (HUB), no período de julho de 2016 a dezembro de 2019, com suspeita clínica de candidíase vulvovaginal (sintomáticas) e assintomáticas em consulta ginecológica. Epidemiologicamente o estudo foi classificado como observacional analítico transversal.

A prevalência da Candidíase Vulvovaginal (CVV) no Brasil em grupos específicos varia de 11,8 a 29,7% (BRANDOLT *et al.*, 2017; GUNTHER *et al.*, 2014; MASCARENHAS *et al.*, 2012; NEVES *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2011), o que representa uma média estimada de 20% de CVV, utilizando o soft Epi Info 7, o cálculo da amostra resultou em um mínimo de 246 mulheres, considerando-se um intervalo de confiança de 95% e um erro máximo admissível de 5%.

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina (CEP-FM) por meio do parecer consubstanciado número 1.572. 449. Todos as pacientes incluídas no estudo, assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE1) concordando em participar da pesquisa.

As pacientes foram alocadas em dois grupos distintos, de acordo com a participação voluntária na pesquisa (tabela 1), que incluiu 278 pacientes.

Tabela 1 – Grupos de pacientes categorizados na pesquisa

Grupo	Descrição	n
Pacientes Sintomáticas	Pacientes com sintomas ou sinais suspeitos de candidíase atendidas no serviço médico de ginecologia	173
Pacientes Assintomáticas	pacientes sem sinais ou sintomas suspeitos de candidíase atendidas no serviço médico de ginecologia	105
Total pacientes		278

4.2. Critérios de inclusão e exclusão

Para o desenvolvimento da pesquisa foram definidos fatores de inclusão e exclusão que nortearam o recrutamento voluntário das pacientes. Foram incluídas pacientes em qualquer faixa etária com sintomas ou sinais sugestivos de vulvovaginite fúngica e pacientes assintomáticas que procuraram espontaneamente o Ambulatório de

Ginecologia do HUB para consulta ginecológica e se disponibilizaram a participar da pesquisa. As pacientes atendidas neste serviço, mas que não preencheram esses critérios foram excluídas, ou seja, pacientes que relataram uso de medicamentos antifúngicos nos últimos 30 dias que antecederam a consulta, pacientes gestantes e pacientes incapazes de compreender o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

4.3. Coleta de dados e resultados laboratoriais

A coleta do material biológico para análise laboratorial e a entrevista para preenchimento do Questionário de Sintomas e Fatores de Risco (APÊNDICE 2) (quadro 3) foram realizados no primeiro atendimento, quando as pacientes com diagnóstico clínico de candidíase vulvovaginal ou pacientes assintomáticas foram incluídas voluntariamente na pesquisa.

Quadro 3 - Perguntas e respostas do questionário de sintomas e fatores de risco

Perguntas	Opções de resposta
Demografia	Idade Estado Civil
Presença de pelo menos um sintoma	Sim Não
Número de episódios semelhantes nos últimos 12 meses	≤ 1 ≤ 3 ≥ 4
Sintomas (respostas sim ou não)	corrimento, prurido, ardência, dispareunia, mal odor, disúria
Uso de medicamento nos últimos 30 dias	antibiótico, antifúngico ou outro
Antecedentes e hábitos	
Antecedente obstétrico	nº gestações, nº de partos e nº de abortos
Método contraceptivo	Hormonal combinado, outros (DIU, preservativo, outros)
Quanto tempo com parceiro atual	≤ 6 meses 6 meses ≤ 1 ano ≥ 1 ano NA
Número de parceiros nos últimos 12 meses	0 1-2 3-4
Uso de medicamentos, doenças (resposta sim ou não)	diabetes, uso de hipoglicemiantes orais, uso de corticoides ou imunossupressores
Hábitos pessoais (resposta sim ou não)	Tabagismo, uso regular de preservativo, ducha vaginal, protetor diário de roupa íntima
Ingestão de leite e derivados	< 1 porção por dia ≥ 1 porção por dia
Hábito intestinal	Normal, constipado ou diarreia

As pacientes foram atendidas, examinadas, tiveram material coletado para exames laboratoriais realizados no hospital e foram tratadas dentro da rotina do serviço. Não houve postergação do tratamento de pacientes sintomáticas e com diagnóstico clínico em virtude da coleta de material para pesquisa. Diante do diagnóstico clínico, foi realizada coleta de material para cultura a ser realizada pelo laboratório do hospital quando cabível, prescrito tratamento empírico com azólicos disponíveis no Sistema Único de Saúde (SUS), conforme rotina do serviço e as pacientes tiveram o retorno já agendado para controle.

4.4. Coleta, isolamento e conservação dos isolados fúngicos

As amostras biológicas de secreção vaginal foram coletadas pelo pesquisador, durante realização de exame especular com espéculo descartável, estéril. A amostra de secreção vaginal foi coletada em fundo de saco posterior e paredes laterais da vagina em *swab* com meio de transporte *Stuart* para o isolamento de espécies fúngicas, e foram encaminhadas para identificação laboratorial, que foi realizada no Núcleo de Parasitologia e Micologia da Gerência de Biologia Médica do Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal (NPM-GBM-LACEN-DF).

A obtenção dos isolados fúngicos foi realizada a partir de cultivos a 35°C (± 2 °C) no período de 24 horas, em tubos de ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol (HiMedia, Mumbai, Índia).

Todas as amostras isoladas foram conservadas em solução aquosa de glicerol a 50% e congeladas em microtubos de centrifugação de 2,0mL a temperatura de 20°C negativos, para recuperação e contraprova posterior, se necessário, e foram encaminhadas para identificação.

4.5. Identificação fenotípica das espécies de *Candida*

Para a realização da identificação fenotípica foram realizadas a prova do tubo germinativo (PTG) e a identificação presuntiva em meio cromogênico.

4.5.1. Prova do Tubo Germinativo (PTG)

A prova do tubo germinativo foi realizada para diferenciar *Candida albicans* (PTG positivo) das espécies de *Candida* não *albicans* (PTG negativo) (MATARE *et al.*, 2017). Foram utilizadas quatro colônias puras e frescas, subcultivadas em ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol (HiMedia, Mumbai, Índia) por 24 horas a 35°C (± 2 °C), as quais foram inoculadas em 0,5 mL de soro humano em tubos de ensaios de 5 mL e incubados a temperatura de 35 °C (± 2 °C) por 3 horas. Os resultados foram observados por meio de microscópio óptico (400X), utilizando preparações com lâminas e lamínulas (MATARE *et al.*, 2017). Foi considerado resultado positivo os isolados que apresentaram projeções alongadas, denominadas “Tubos Germinativos”. Uma cepa de referência *American Type Culture Collection* (ATCC) de *Candida albicans* (ATCC 90028) foi

empregada como controle positivo.

4.5.2. Identificação em Meio Cromogênico

O meio cromogênico é indicado para identificação presuntiva de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei*. Estas espécies de *Candida* são diferenciadas a partir da produção de colônias de cores diferentes devido à reação com os substratos cromogênicos presentes no meio. *Candida albicans*, produz colônias de coloração verde clara a verde médio, *Candida tropicalis* apresenta colônias azuis esverdeadas a metalizadas, com ou sem halo violeta, e *Candida krusei* apresenta colônias cor-de-rosa claro a vermelho claro com rebordo esbranquiçado. Outras colorações são atribuídas às espécies de leveduras do gênero *Candida* como: *Candida parapsilosis*, *Candida guilliermondii*, *Candida famata*, *Candida glabrata*, entre outras (ODDS; BERNAERTS, 1994; WILLINGER *et al.*, 2001).

A partir de subcultivos em ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol (HiMedia, Mumbai, Índia) por 24 horas a 35°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) foram obtidas colônias puras e frescas, que foram inoculadas no meio cromogênico com alça e em seguida incubadas por 24 a 48 horas. A leitura das placas foi realizada por meio visual, onde foi observada a presença de colônias de coloração específica para cada espécie de *Candida*. Como controle positivo foram utilizadas cepas de referência de *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida tropicalis* ATCC 28707 e *Candida krusei* ATCC 34135.

4.6. Identificação por *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-flight* (MALDI-TOF)

O emprego da técnica de espectrometria de massas (MALDI-TOF), que é um método quimiotaxônomico de identificação fenotípica de fungos, permitiu a identificação confirmatória das espécies de *Candida* spp.

O princípio metodológico da técnica utiliza células leveduriformes inteiras, que possuem biomarcadores moleculares, como peptídeos ou proteínas ribossômicas que são detectados nos espectros gerados após a leitura no equipamento. Esses espectros de proteínas são característicos de cada espécie fúngica, e funcionam como a impressão digital (*Fingerprinting*) de cada espécie microbiana, que são posteriormente comparados a espectros depositados em bancos de dados que permitem a identificação por

comparabilidade (JANG; KIM, 2018; NEPPELENBROEK *et al.*, 2014; ZHAO *et al.*, 2018).

Para a realização do MALDI-TOF, foram realizados subcultivos em ágar Sabouraud com cloranfenicol (HiMedia, Mumbai, Índia) a 35 °C (± 2 °C) durante 24 horas. Quantidade mínima das colônias de *Candida* spp. íntegras, foram aplicadas no *spot* do *slide* alvo (Biomérieux, Marcy l'Etoile, França) e após secagem desse *slide* à temperatura ambiente foi adicionado 0,5 µL de ácido fórmico 25% (v/v) (Biomérieux, Marcy l'Etoile, França).

O material aplicado sobre o *slide*, permaneceu mantido à temperatura ambiente novamente para secagem, e sobre a camada formada entre a colônia de *Candida* spp e o ácido fórmico aplicou-se 1 µL de solução de matriz 3,1% (ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico - CHCA, Biomérieux, Marcy l'Etoile, França). Após secagem da matriz, novamente à temperatura ambiente, os *slides* foram transferidos para a estação de leitura do Sistema Vitek MS[®] (Biomérieux, Marcy l'Etoile, França), onde as identificações microbianas foram realizadas por meio da obtenção de espectros.

Os espectros foram analisados utilizando a base de conhecimento Vitek MS[®] (Biomérieux, Marcy l'Etoile, França) Versão 3.0. Foram realizadas comparações dos picos formados com os padrões característicos da espécie, gênero ou família do micro-organismo, resultando na identificação deste. Os resultados foram considerados válidos quando os percentuais de probabilidade de identificação foram iguais ou superiores a 90,0% (KIM *et al.*, 2014).

4.7 - Avaliação da recorrência

Durante o período da pesquisa, 41 pacientes sintomáticas que voluntariamente compareceram ao serviço, foram avaliadas quanto à recorrência, com reaplicação do questionário de sintomas e fatores de risco pelo pesquisador e coleta de amostra para avaliação laboratorial.

4.8. Avaliação da Resistência do Antifúngico Fluconazol

4.8.1. Avaliação de antifungograma automatizado

O sistema Vitek 2 (BioMerieux Vitek, Inc., Hazelwood, MO, EUA) é um equipamento automatizado para identificação de leveduras por testes bioquímicos e

realização de Concentração Inibitória Mínima (MIC) de antifúngicos. O sistema inclui um computador programado com *software* de interpretação de resultados, uma unidade leitora-incubadora, um módulo de enchimento, um módulo selador e uma impressora, e necessita apenas do isolamento por meios de cultivo convencionais da levedura para iniciar a identificação automatizada por fluorescência no equipamento (SUDHAN *et al.*, 2016).

O equipamento utiliza cartões plásticos descartáveis compostos por 64 poços com 47 testes bioquímicos fluorescentes, que permitem a identificação das 27 espécies de leveduras de importância médica em 15h. Para a realização do MIC, o equipamento emprega tiras plásticas individuais, cuja apresentação podem vir em *kits* de 10, 30 e 100 tiras, para os antifúngicos (anfotericina B, anidolafungina, caspofungina, fluconazol, fluocitosina, cetoconazol, micafungina, posaconazol e voriconazol), que também são lidos por fluorescência (SUDHAN *et al.*, 2016).

4.8.2. Método de Microdiluição - Concentração Inibitória Mínima (MIC - *Minimal Inhibitory Concentration*) do Fluconazol norma M27-A2 da CLSI

O método de microdiluição obedeceu aos critérios descritos na norma M27-A2 da *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI). A partir de inóculo fúngico em solução salina 0,85%, com concentração equivalente a 0,5 da escala de McFarland (1×10^5 CFU/mL) (CLSI, 2008), o ensaio de microdiluição foi realizado em placa com 96 poços estéril.

Inicialmente o antifúngico liofilizado fluconazol foi pesado em balança analítica para preparação das soluções padrões antifúngicas a serem testadas. Para este fármaco a norma da CLSI recomenda concentrações de 0,125 a 64 $\mu\text{g/mL}$ em diluição seriada, que correspondem a oito diluições sucessivas.

Em uma placa de fundo chato de 96 poços estéril, contendo *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 (Gibco, Estados Unidos) adicionado pelo tampão 3:ácido (3*N*-morfolino) propanossulfônico (MOPS) (Sigma-Aldrich, Brasil) (RPMI-MOPS), foram realizadas diluições seriadas do fluconazol em meio, e 100 μL de cada diluição foram adicionados a cada poço. Em seguida, cada poço da placa de microdiluição recebeu 100 μL de *Candida* spp. na concentração final de 1×10^3 CFU/mL, totalizando um volume final de 200 μL /poço. A microplaca foi em incubada a $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ por 48h.

A Concentração Inibitória Mínima (MIC) foi determinada pela subcultura de 10

μL do conteúdo de cada poço em Ágar Sabouraud Dextrose (Acumedia, Brasil) e as placas incubadas a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48h. O MIC correspondeu à menor concentração do antifúngico testado capaz de inibir crescimento microbiano visível (CLSI, 2008) que após subcultivo não revelou crescimento de CFU. Todos os ensaios foram realizados em triplicata técnica e biológica.

4.9- Análise estatística

Para os testes estatísticos foi utilizado o software GraphPad Prism version 8.00 para Windows (La Jolla, Califórnia, Estados Unidos). Na análise dos fatores de risco para VVC foi empregado o *Fisher's Exact Test* para verificar se havia uma correlação entre a VVC e a presença de cada fator de risco pesquisado. No cálculo do Valor Preditivo Positivo (VPP), foi utilizada a equação $\text{VPP} = (\mathbf{a} / (\mathbf{a} + \mathbf{b}))$, onde **a** refere-se aos pacientes com resultados laboratoriais positivos, aqui chamados de Verdadeiros Positivos, e **b** resultados Falso Positivos.

5- RESULTADOS

Os dados obtidos por meio das respostas dos questionários (dados clínicos e fatores de risco) e dos ensaios laboratoriais, possibilitaram a construção dos resultados apresentados a seguir.

5.1- Caracterização da população estudada

O presente estudo incluiu 278 pacientes voluntárias, cuja média de idade foi de $37,4 \pm 7,7$ anos. A faixa etária que englobou a maior parte das pacientes, foi a de 26 e 40 anos que representa 59,6% do total de pacientes incluídas no estudo, seguida pela faixa etária de 41 a 55 anos. A faixa etária >55 anos, foi a que incluiu o menor número de pacientes no estudo (tabela 2). Em relação ao estado civil, 61,3% das pacientes se declararam casadas e 38,7% solteiras.

Para a análise dos dados, as pacientes foram divididas em dois grupos: sintomáticas, que representam 62,2% do total de pacientes e mulheres assintomáticas que representam 37,8%. Em relação à positividade de exames laboratoriais 53,2% do grupo de pacientes sintomáticas apresentaram positividade de exames laboratoriais, enquanto entre as pacientes assintomáticas essa positividade foi de 12,4% (Tabela 2).

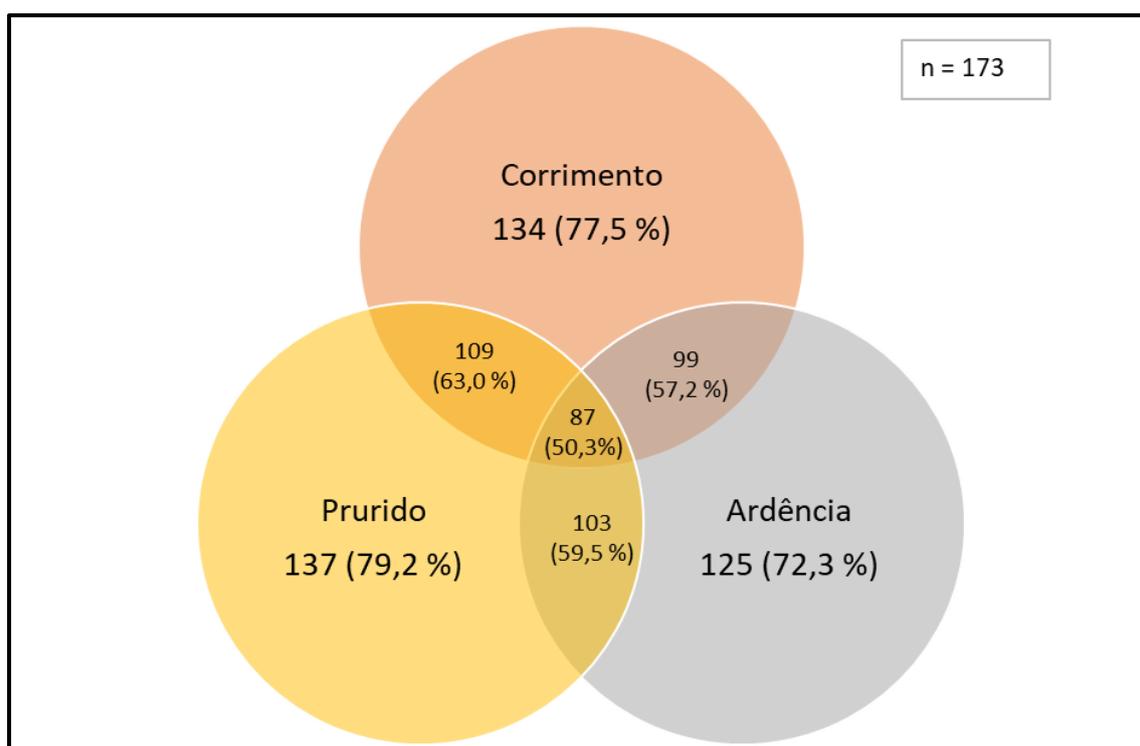
Tabela 2 – Avaliação dos grupos estudados categorizados por idade, estado civil e presença de sintomas

Categoria	Sintomática		Assintomática		Total
<i>n</i>	173 (62,2%)		105 (37,8%)		278
	Diagnóstico Laboratorial Negativo	Diagnóstico Laboratorial Positivo	Diagnóstico Laboratorial Negativo	Diagnóstico Laboratorial Positivo	
<i>n</i> por grupos	81 (46,8%)	92 (53,2%)	92 (87,6%)	13 (12,4%)	
Idade (média \pm DP)	38,5 \pm 5,0	38,5 \pm 4,2	38,5 \pm 11,3	40 \pm 0,0	37,4 \pm 7,7
Categoria idade					
19-25	13 (16,0%)	8 (8,7%)	8 (8,7%)	0	29 (10,3%)
26-40	46 (57,0%)	61 (66,3%)	51 (55,5%)	7 (53,8%)	168 (59,6%)
41-55	17 (21,0%)	19 (20,7%)	27 (29,3%)	5 (38,4%)	69 (24,5%)
>55	5 (6,0%)	4 (4,3%)	6(6,5%)	1 (7,8%)	16 (5,6%)
Estado Civil					
Casada	46 (56,8%)	54 (58,7%)	62(67,4%)	8 (61,5%)	170 (61,1%)
Solteira	35 (43,2%)	38 (41,3%)	30(32,6%)	5 (38,5%)	108 (38,9%)
Total					278

5.2- Avaliação da prevalência dos sintomas em relação ao diagnóstico laboratorial

Em relação aos aspectos clínicos avaliados nas pacientes sintomáticas, os sintomas relatados com maior frequência, foram: corrimento, prurido e ardência, sendo que apenas 50,3% (Figura 10) das pacientes relataram a presença dos três sintomas concomitantemente.

Figura 10- Diagrama de Venn em pacientes sintomáticas



Quando correlacionados ao diagnóstico laboratorial, a presença dos sintomas apresentou Valor Preditivo Positivo (VPP) inferior a 60% em análise individual, e na presença dos três sintomas mais frequentes em concomitância, o VPP foi de 67,8% (Tabela 3).

Tabela 3 – Correlação dos sintomas e diagnóstico laboratorial

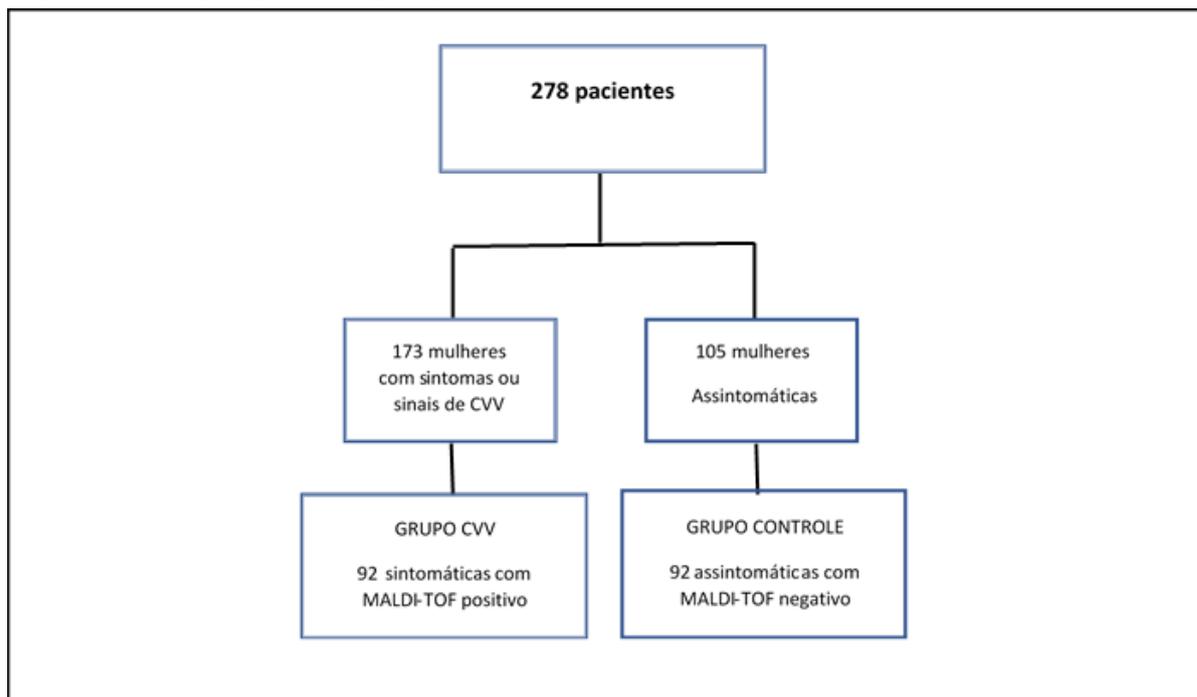
Categoria	Sintomática			
n	173 (61,3%)			
	Total	Diagnóstico Laboratorial Negativo	Diagnóstico Laboratorial Positivo	**VP P
n por grupos		81 (46,8%)	92 (53,2%)	
Corrimento				
NÃO	39 (22,5%)	24 (61,5%)	15 (38,5%)	57,5%
SIM	134(77,5%)	57 (42,5%)	77 (57,5%)	
Prurido				
NÃO	36 (20,8%)	26 (72,2%)	10 (27,8%)	59,8%
SIM	137(79,2%)	55 (40,1%)	82 (59,9%)	
Ardência				
NÃO	48 (27,7%)	30 (62,5%)	18 (37,5%)	59,2%
SIM	125(72,3%)	51 (40,8%)	74 (59,2%)	
Presença de Corrimento Prurido Ardência	87 (50,3%)	28 (32,2%)	59 (67,8%)	67,8%
Dispareunia				
NÃO	87 (50,3%)	41 (47,1%)	46 (52,9%)	54,2%
SIM	83 (48,0%)	38 (45,8%)	45 (54,2%)	
*NA	3 (1,7%)	2 (66,6%)	1 (33,4%)	
Mal odor				
NÃO	155(89,6%)	71 (45,8%)	84 (54,2%)	44,4%
SIM	18 (10,4%)	10 (55,5%)	8 (44,5%)	
Disúria				
NÃO	120(69,4%)	62 (51,7%)	58 (48,3%)	64,2%
SIM	53 (30,6%)	19 (37,8%)	34 (64,2%)	

*NA (Não se aplica), **VPP (Valor Preditivo Positivo)

5.3- Avaliação dos fatores de risco pesquisados em relação ao diagnóstico laboratorial

Para análise dos fatores de risco relacionados à candidíase vulvovaginal, as pacientes foram divididas em dois grupos (figura 11): grupo VVC formado por 92 pacientes sintomáticas com diagnóstico por MALDI-TOF positivo e grupo controle formado por pacientes assintomáticas não colonizadas, ou seja, com diagnóstico laboratorial negativo. Os fatores analisados estão descritos na figura 12.

Figura 11- Grupos para comparação de fatores de risco



Em relação ao número de parceiros nos últimos 12 meses e ao tempo com o parceiro atual, a maioria das pacientes dos dois grupos tiveram entre um e dois parceiros, e também a maioria das mulheres nos dois grupos estavam com o mesmo parceiro há mais de um ano, portanto não foi realizada análise comparativa para essas duas variáveis (tabela 4).

Tabela 4- Número de parceiros e tempo com parceiro atual

Categoria	Sintomática		Assintomática		Total
n	173 (62,2%)		105 (37,8%)		278
	Diagnóstico Laboratorial Negativo	Diagnóstico Laboratorial Positivo	Diagnóstico Laboratorial Negativo	Diagnóstico Laboratorial Positivo	
n por grupos	81 (46,8%)	92 (53,2%)	92 (87,6%)	13 (12,4%)	
Número Parceiros					
≤1	72 (88,9%)	82 (89,2%)	85(92,4%)	12(92,3%)	
2	8 (9,9%)	5 (5,4%)	4 (4,3%)	1 (7,7%)	
≥3	1 (1,2%)	5 (5,4%)	3 (3,3%)	0	
Tempo com parceiro atual					
≤ 1 ano	17 (21%)	21(22,8%)	10 (10,9%)	1 (7,7%)	
>1 ≤3 anos	10(12,3%)	11(12%)	12 (13%)	2 (15,4%)	
>3 anos	54 (66,7%)	60(65,2%)	70 (76,1%)	10 (76,9%)	
Total					278

As pacientes dos dois grupos foram questionadas sobre o consumo de leite e derivados, sendo essa variável categorizada em menos de uma porção por dia, ou uma ou mais porções por dia. A análise comparativa dos dados constatou que no grupo das portadoras de VVC, a ingestão de leite e derivados foi significativamente maior que no grupo controle, sendo $p < 0.0001$ (Figura 12A).

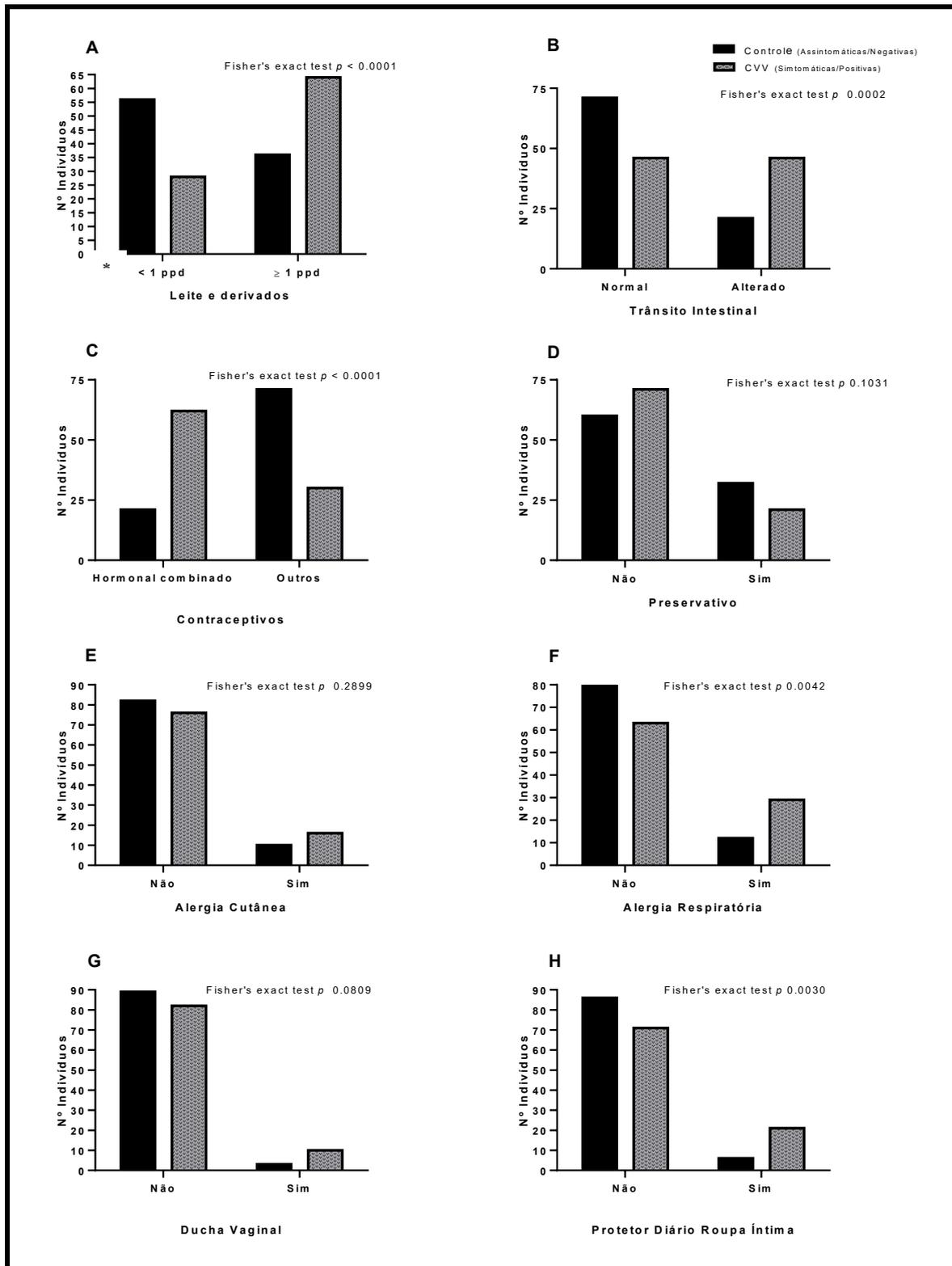
As pacientes foram também questionadas sobre seu hábito intestinal, foi considerado com trânsito intestinal alterado relatos de constipação ou diarreia crônicas. Entre as sintomáticas com exames laboratoriais positivos (grupo VVC), houve frequência significativamente maior de alterações do trânsito intestinal, do que no grupo controle, sendo $p = 0,0002$ (Figura 12B).

Quanto ao uso de contraceptivo hormonal, a frequência de uso foi significativamente maior entre as pacientes portadoras de VVC em relação às assintomáticas com laboratório negativo, $p < 0,0001$ (Figura 12C). Já em relação ao uso de preservativo, não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos, sendo $p = 0,1031$ (Figura 12D).

A ocorrência de alergias respiratórias ou cutâneas, também foram levantadas nos dois grupos, em relação à alergia cutânea, não houve diferença significativa entre os dois grupos ($p = 0,2899$) (Figura 12E). Contudo, no caso da alergia respiratória, a ocorrência foi significativamente maior no grupo das pacientes sintomáticas com laboratório positivo, com $p < 0,0042$ (Figura 12F).

No tocante aos hábitos pessoais, não houve diferença significativa entre os grupos em relação ao uso de ducha vaginal ($p = 0,2899$) (Figura 12G), porém, entre as pacientes do grupo VVC a frequência do uso de protetor diário de roupa íntima foi significativamente maior, sendo $p < 0,0042$ (Figura 12H).

Figura 12 - Análise comparativa da presença de fatores de risco para VVC



*ppd (porção por dia)

5.4- Prevalência das espécies de *Candida* identificadas pelas técnicas empregadas no diagnóstico laboratorial

A identificação das espécies foi realizada pelos meios fenotípicos da prova do tubo germinativo e pelo meio cromogênico (presuntivo), e na sequência confirmada por MALDI-TOF. Para as análises realizadas em MALDI-TOF, entre as 173 pacientes sintomáticas, 92 (53,2%) das amostras foram positivas para leveduras e entre as 105 pacientes assintomáticas, 13 (12,4%) das amostras foram positivas (Tabela 5).

A Prova do Tubo Germinativo (PTG), que é positiva apenas para a espécie *C. albicans*, foi positiva em 75 amostras entre as pacientes sintomáticas, enquanto o meio cromogênico identificou 79 amostras positivas para *C. albicans* (Tabela 5), o que sugere que a PTG falhou na identificação de 4 amostras de *C. albicans* identificadas por meio cromogênico e confirmadas por MALDI-TOF, ou estas cepas passaram por alguma mutação e não produzem tubo germinativo.

Para as análises realizadas em meio cromogênico, que distingue espécies de *Candida*, com exceção da falha na identificação de uma outra espécie de levedura, todos os resultados foram concordantes com o MALDI-TOF

O MALDI-TOF confirmou o diagnóstico das 78 *C. albicans*, e identificou uma espécie entre as amostras das pacientes sintomáticas que não foi identificada nem pelo PTG e nem pelo meio cromogênico, identificada como *Rhodotorula mucilaginosa*.

Tabela 5 – Diagnóstico laboratorial por métodos fenotípicos e MALDI-TOF

Métodos Laboratoriais fenotípicos						
Sintomática			Assintomática			Total
173 (62,2%)			105 (37,8%)			278
PTG*	Meio cromogênico	MALDI-TOF	PTG	Meio cromogênico	MALDI-TOF	
75 positivos (43,4%) 98 negativos (56,6%)	90 positivos (52%) 82 negativos (47,4%)	92 positivos (53,2%) 81 negativos (48,8%)	6 positivo (5,7%) 99 negativos (94,3%)	13 positivos (12,4%) 96 negativos (87,6%)	13 positivos (12,4%) 96 negativos (87,6%)	
74 <i>C. albicans</i> (42,7%) 1 <i>candida spp.</i> (0,6%)	79 <i>C. albicans</i> (48,4%) 12 não <i>albicans</i> (7,4%)	78 <i>C. albicans</i> (45%) 13 não <i>albicans</i> (7,5%) 1 outras espécies (0,6%)	6 <i>C. albicans</i> (5,7%)	7 <i>C. albicans</i> (6,7%) 6 não <i>albicans</i> (5,7%)	7 <i>C. albicans</i> (6,7%) 6 não <i>albicans</i> (5,7%)	

*PTG (Prova do Tubo germinativo) é positivo apenas para *C. albicans*; Meio Cromogênico distingue espécies de leveduras do gênero *Candida*.

Para uma ideia precisa do desempenho e limitações da prova do tubo germinativo (PTG) e do meio cromogênico (MC) como métodos a serem utilizados na impossibilidade do uso do MALDI-TOF, foram calculadas a sensibilidade e especificidade desses métodos (Tabela 6), considerando o MALDI-TOF padrão-ouro.

A prova do tubo germinativo apresentou maior sensibilidade em pacientes sintomáticas (84%) e maior especificidade em pacientes assintomáticas (97%). O Meio Cromogênico (MC) apresentou melhor especificidade que sensibilidade para ambas os grupos de pacientes, sintomáticas e assintomáticas, embora sua sensibilidade tenha também apresentado excelente desempenho comparado ao padrão-ouro. De forma geral, o MC apresentou maior e melhor sensibilidade e especificidade compara ao padrão-ouro que o PTG.

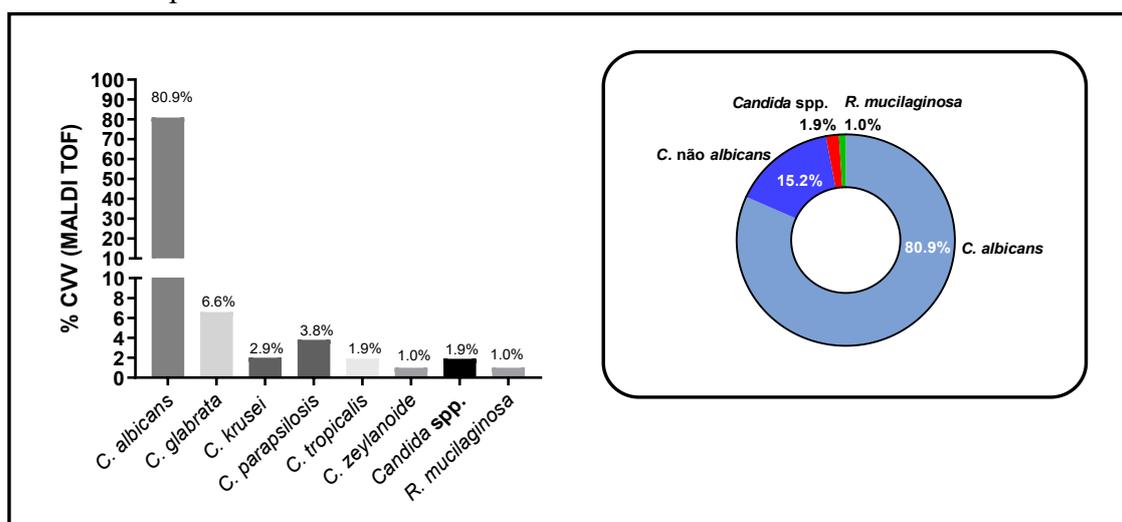
Tabela 6 - Sensibilidade e especificidade dos testes empregados, TTG e MC, em comparação com o método padrão-ouro MALDI-TOF.

	Testes empregados					
	PTG			MC		
	Sintomáticas	Assintomáticas	Média	Sintomáticas	Assintomáticas	Média
Sensibilidade	84%	72%	78%	97%	93%	95%
Especificidade	82%	97%	90%	98%	99%	99%

PTG (Prova do tubo germinativo), MC (Meio Cromogênico)

A análise das amostras por MALDI-TOF permitiu, então, a identificação das espécies de oito leveduras diferentes, com predomínio da *C. albicans* (80,9%) seguida pela *C. glabrata* (6,6%), *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. tropicalis* e *C. zeylanoides* (figura 3). Uma espécie de *Candida* não foi identificada, sendo descrita neste estudo como *Candida* spp. e foi identificada uma levedura de outro gênero, *Rhodotorula mucilaginosa*. Foi, portanto, identificada uma prevalência de espécies não *albicans* de 15,2% das amostras positivas (Figura 13).

Figura 13 – Percentual de espécies de *Candida* spp. e *Rhodotorula mucilaginosa* identificadas por MALDI-TOF



5.5- Avaliação da recorrência

Em relação à frequência dos episódios as pacientes foram questionadas sobre quantos episódios com um ou mais sintomas definidos como CVV haviam ocorrido nos últimos 12 meses. Com base na definição de recorrência pela maior parte dos autores, como sendo a ocorrência de 4 ou mais episódios no período de um ano, entre as pacientes sintomáticas, 50,9% relataram sintomas em mais de 4 episódios nos 12 meses que antecederam a consulta. Já a frequência de recorrência no grupo de pacientes sintomáticas com diagnóstico laboratorial negativo foi de 58% e entre as pacientes sintomáticas com

diagnóstico laboratorial positivo (grupo CVV) foi de 44,5%.

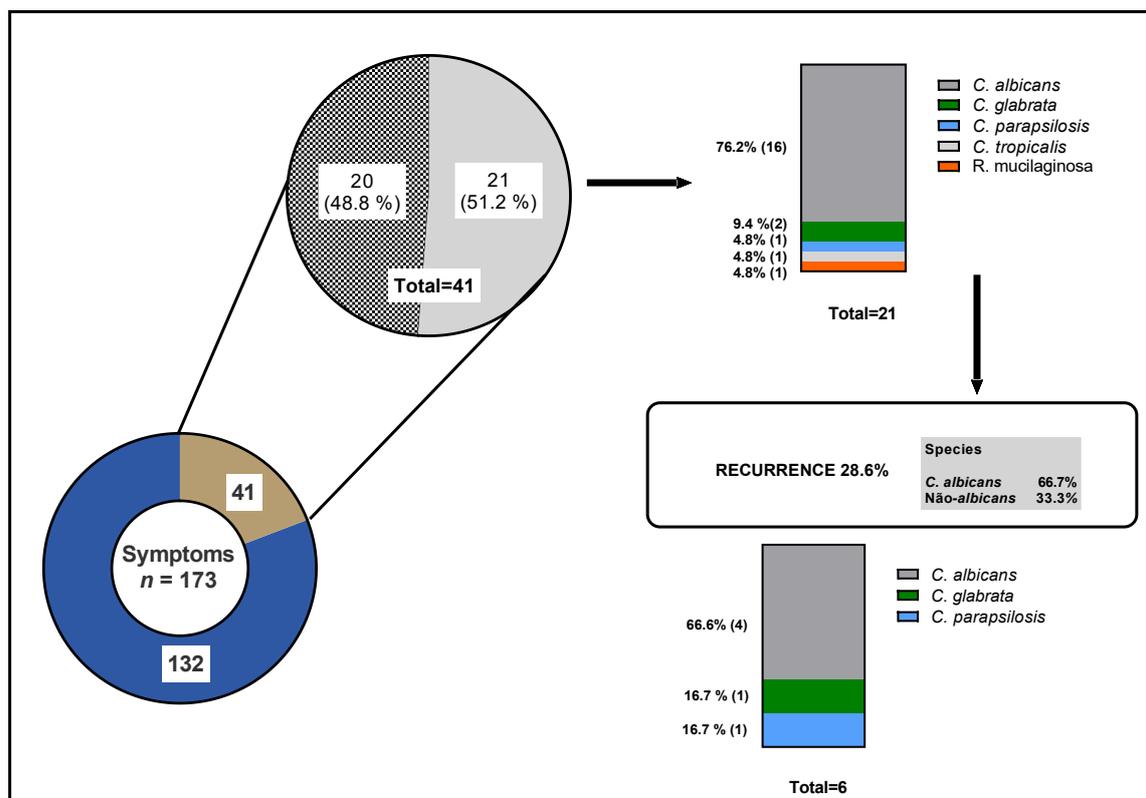
E entre as pacientes assintomáticas no momento do estudo e com diagnóstico laboratorial negativo (grupo controle), duas (2,2%) relataram ter tido 4 ou mais episódios sintomáticos nos últimos 12 meses. Entre as pacientes com colonização assintomática, ou seja, com diagnóstico laboratorial positivo na ausência de sintomas, uma (7,7%) relataram terem tido no mínimo 4 episódios de sintomas nos últimos 12 meses (Tabela 7).

Tabela 7– Recorrência relatada pelas pacientes

Categoria	Sintomática			Assintomática			Total
n	173 (62,2%)			105 (37,8%)			
	Diagnóstico Laboratorial Negativo	Diagnóstico Laboratorial Positivo	Total	Diagnóstico Laboratorial Negativo	Diagnóstico Laboratorial Positivo	Total	
n por grupos	81 (46,8%)	92 (53,2%)	173	92 (87,6%)	13 (12,4%)	105	278
Frequência Infecção anual							
≤ 1	18 (22,2%)	25 (27,2%)	43(24,8%)	87 (94,5%)	12 (92,3%)	99(94,2%)	
≤ 3	16 (19,7%)	26 (28,3%)	42 (24,3%)	3 (3,3%)	0	3 (2,9%)	
≥ 4	47 (58%)	41 (44,5%)	88 (50,9%)	2 (2,2%)	1 (7,7%)	3 (2,9%)	

Entre as 173 pacientes que se apresentaram sintomáticas à consulta durante a qual foi realizada a primeira coleta, 41 retornaram com sintomas e foi coletada uma segunda amostra para seguimento. Dessas, 21 (51,2%), tinham amostras positivas pelo MALDI-TOF na primeira coleta, sendo identificada *C. albicans* em 76,2% e outras espécies em 23,8% dessas amostras. Na segunda coleta, 6 (28,6%), dessas 21 pacientes permaneciam com diagnóstico laboratorial positivo, sendo 4 (66,7%) identificadas como *C. albicans* amostras e duas (33,3%) identificadas como não *albicans* (Figura 14).

Figura 14 – Análise esquemática da recorrência



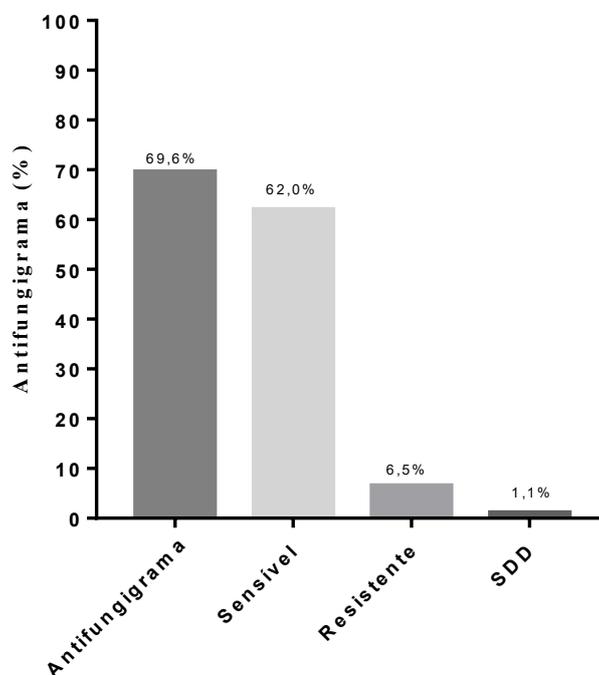
5.6. Determinação do perfil de sensibilidade ao antifúngico fluconazol

Das 278 amostras colhidas, 105 foram positivas pelo MALDITOF, dessas, foi realizado antifungigrama automatizado em 69,6% (73) e MIC em 18,1% (19), faltando realizar análises de antifúngico em 12,3% (13 amostras). Como o perfil de sensibilidade a um único antifúngico que seja, como neste caso o fluconazol, é dispendioso para pesquisa, cumpre ressaltar que neste trabalho não foi possível realizar as análises de todas as amostras positivas identificadas pela automação, razão pela qual estes resultados foram excluídos da publicação científica.

Para avaliação do antifungigrama automatizado, foi considerado para interpretação dos resultados de Concentração Inibitória Mínima (MIC) de fluconazol como sendo: sensível $MIC \leq 2 \mu\text{g/mL}$, resistente $MIC \geq 8 \mu\text{g/mL}$, sensível dose dependente (SDD) 2,1 a 7,9 $\mu\text{g/mL}$ para Sensível (SOBEL; SOBEL, 2018). Nos resultados obtidos 82% das espécies de *Candida* spp. testadas, foram sensíveis ao fluconazol, enquanto 6,5% foram consideradas resistentes e 1,1% das espécies testadas

foram classificadas como de Sensibilidade Dose Dependente (SDD) ou indeterminadas (Figura 15).

Figura 15 – Percentual de sensibilidade ao Fluconazol



Concentração Inibitória Mínima (MIC): Sensível $MIC \leq 2$, Resistente $MIC \geq 8$, Sensível Dose Dependente (SDD) 2,1 a 7,9

Das 73 amostras com avaliação de fluconazol por antifungograma automatizado, poucas apresentaram perfil de resistência, mas vale ressaltar que a espécie de *C. glabrata* nas 3 amostras identificadas apresentou alta resistência o que se traduzido em termos percentuais, representa 60% de resistência nesta espécie (Tabela 8).

Tabela 8 – Perfil de sensibilidade ao Fluconazol por antifungograma automatizado e por espécie de *Candida* identificada

	Sensível	SDD	Resistente	Total
<i>Candida albicans</i>	58	2	2	62
<i>Candida glabrata</i>	2	0	3	5
<i>Candida krusei</i>	0	0	1	1
<i>Candida parapsilosis</i>	3	0	0	3
<i>Candida tropicalis</i>	2	0	0	2
Total				73

Ao avaliar os resultados obtidos empregando a Concentração Inibitória Mínima, realizada de acordo com a norma M27-A2 da CLSI, em 19 amostras (18,1%) (Tabela 9) foi possível destacar que houve uma inversão na resistência, considerando que 15 das 18 *C. albicans* isoladas foram resistentes ao fluconazol.

Tabela 9 - Perfil de sensibilidade ao Fluconazol pelo Método Concentração Inibitória Mínima pela norma M27-A2 da CLSI e por espécie de *Candida* identificada

	Sensível	SDD	Resistente	Total
<i>Candida albicans</i>	3	0	15	18
<i>Candida parapsilosis</i>	1	0	0	1
Total				19

6- DISCUSSÃO

A CVV é rara antes do menacme, apresentando seu pico durante o período reprodutivo e declinando consideravelmente na pós-menopausa (BLOSTEIN *et al.*, 2017). Em relação à faixa etária, a maior parte das mulheres estavam com idades entre 26 e 40 anos nos dois grupos estudados, e a maioria declarou-se casada, não havendo viés relativo à idade ou ao estado civil das pacientes na interpretação da ocorrência de fatores de risco entre os dois grupos.

Em relação ao diagnóstico da CVV, neste estudo a identificação fenotípica foi confirmada pelo emprego da técnica de MALDI-TOF. Considerando especificidade de 90 a 98% dessa técnica na identificação das espécies de leveduras (ALIZADEH *et al.*, 2017; ARASTEHFAR *et al.*, 2019), o número de pacientes sintomáticas com exame positivo (56,4%) e o fato de que entre as pacientes com sintomas característicos de CVV 46,8% não tiveram positividade nos exames para detecção de leveduras, demonstra que somente a presença de sintomas tem baixa especificidade para diagnóstico da CVV, além disso, o VPP foi baixo, com máximo de 67,8%, o que reforça a necessidade da realização do diagnóstico laboratorial.

Quanto à colonização assintomática, definida como exames de identificação das leveduras positivos na ausência de sintomas, embora vários autores considerem a *Candida spp.* como comensal (BERNARDIS *et al.*, 2015; NIKOU *et al.*, 2019; ODDS *et al.*, 1988), os dados de prevalência na literatura levando em consideração o diagnóstico laboratorial, são escassos.

Estudo realizado na Austrália, utilizando cultivo em meio cromogênico, encontrou prevalência de colonização por *Candida spp.* de 21% (PIROTTA; GARLAND, 2006), enquanto no presente estudo, a colonização assintomática, apresentou prevalência de 12,4%, sendo portanto menor que a esperada, levando-se em consideração tanto a prevalência relatada no estudo australiano quanto o fato de que a *Candida spp.* tem sido descrita como comensal.

Os sintomas pesquisados, foram os descritos em estudos sobre o tema como característicos das vulvovaginites, sendo três deles (corrimento, prurido e ardência) os mais frequentemente citados como parte do quadro clínico da CVV, o que coincide com os achados dessa pesquisa, que demonstraram que em mais de 50% das pacientes essa tríade está presente. Todavia, devido à baixa especificidade dos sintomas, o diagnóstico com base apenas na presença destes, é muito impreciso (ANDERSON; KLINK;

COHRSSSEN, 2004; SOBEL, 2016), podendo, no caso do autodiagnóstico relatado pela paciente, estar errado em até 90% das vezes (FERRIS; DEKLE; LITAKER, 1996; SOBEL, 2007).

Os achados desse estudo confirmam essa baixa especificidade dos sintomas para o diagnóstico da VVC, uma vez que, quando correlacionada ao diagnóstico laboratorial, a análise da presença de cada sintoma isoladamente, apresentou baixo Valor Preditivo Positivo (VPP), e mesmo quando considerada a presença da tríade de sintomas mais frequentemente descritos, o VPP não foi maior que 67,8%. Desta forma, pode-se inferir que vulvovaginites de outras etiologias, têm sintomas semelhantes, por vezes até idênticos aos presentes nas candidíases, apenas sendo possível a diferenciação das entidades clínicas por métodos laboratoriais.

Entre as vulvovaginites nas quais também predominam sintomas de ardência, prurido e corrimento, têm sido descritas as vaginites aeróbias e anaeróbias, vaginites descamativas, e vaginite citolítica (DONDEERS *et al.*, 2005; DONDEERS; SOBEL, 2017; HU *et al.*, 2015; NEAL *et al.*, 2020; PAAVONEN; BRUNHAM, 2018; VIEIRA-BAPTISTA; BORNSTEIN, 2019; YANG *et al.*, 2017), além de quadros alérgicos e da Síndrome Geniturinária da Menopausa, que cursa com atrofia vaginal importante podendo haver ardência, queimação e com menor frequência prurido (ANDERSON; KLINK; COHRSSSEN, 2004; PORTMAN; GASS, 2014).

Quanto aos fatores de risco relacionados à CVV, fizeram parte do levantamento epidemiológico do presente estudo, o número de parceiros nos últimos 12 meses e o tempo com o parceiro atual, porém, como a maioria das pacientes dos dois grupos tiveram entre um e dois parceiros, e estavam com o mesmo parceiro há mais de um ano, não foi realizada análise comparativa para essas duas variáveis. Contudo, na literatura há menção sobre o número de parceiros, e à existência de parceiro novo (menos de 6 meses) como fator de risco para CVV e CVVR (SPINILLO *et al.*, 1995, 1997), além disso é fato conhecido que o número de parceiros é fator de risco para Infecções Sexualmente Transmissíveis (ISTs), como a tricomoníase, cujos sintomas podem mimetizar quadro clínico de CVV como descrito anteriormente.

Também foram avaliados os fatores de risco frequentemente descritos na literatura, tais como uso de contraceptivos orais, preservativo, uso de ducha vaginal ou protetores diários de roupa íntima (CHATZIVASILEIOU; VYZANTIADIS, 2019; GONÇALVES *et al.*, 2016; SOBEL, 2016), e os citados com menor frequência, como a

ocorrência de alergias respiratórias e cutâneas (NEVES *et al.*, 2005; TALAEI *et al.*, 2017).

Além destes fatores de risco já descritos na literatura, a pesquisa abrangeu dois novos fatores ainda pouco explorados, são eles: a frequência de ingestão de leite e derivados, e as alterações do hábito intestinal. Esses fatores foram pesquisados com base no entendimento atual de que a disbiose vaginal, definida como o desequilíbrio da microbiota vaginal, pode estar implicada diretamente na patogênese da infecção. A microbiota vaginal (MBV) tem um papel importante na prevenção da colonização por organismos patogênicos e atua na manutenção da saúde reprodutiva e ginecológica da mulher (MARTIN *et al.*, 2012). Além disso, é fato conhecido a existência de correlação entre as microbiotas intestinal e vaginal, inclusive sendo a porção terminal do intestino fonte de colonização da vagina por migração tanto dos *Lactobacillus* spp. quanto de leveduras (EL AILA *et al.*, 2011; MILES, 1977; PETRICEVIC *et al.*, 2012; SOBEL, 2016).

Em relação à ingestão de leite e derivados, levantamento fundamentado nas informações obtidas por breve inquérito alimentar sobre o consumo habitual, demonstrou correlação significativa ($p < 0,0001$) entre o hábito de ingestão de uma ou mais porções de leite e derivados por dia, e a ocorrência de CVV, em comparação com as pacientes assintomáticas e não colonizadas (controle).

É fato descrito na literatura, que há um pico de expressão de lactase nas vilosidades do intestino delgado ao nascimento, e que a expressão dessa enzima vai diminuindo desde a adolescência e idade adulta, consequentemente diminuindo a capacidade de absorção da lactose, que uma vez não metabolizada, em contato com a microbiota intestinal sofre fermentação produzindo H_2 , CO_2 , metano (CH_4) e ácidos graxos de cadeia curta, que podem alterar o funcionamento intestinal (MISSELWITZ *et al.*, 2019).

Considerando a faixa etária mais prevalente na pesquisa, é uma hipótese plausível que a deficiência na absorção da lactose possa resultar, proporcionalmente a quantidade consumida, em um desequilíbrio da microbiota intestinal, favorecendo o crescimento de leveduras, com conseqüente interferência na microbiota vaginal, dado à já conhecida correlação entre a microbiota dos dois sítios anatômicos.

Ainda como complementação da investigação da hipótese de desequilíbrio no microambiente intestinal como fator de risco para CVV, as pacientes foram questionadas

sobre seu hábito intestinal, e categorizadas como portadoras de diarreia crônica ou constipação intestinal com base nos critérios clínicos propostos pelo consenso Roma IV (DROSSMAN, 2016; LACY *et al.*, 2016).

Entre as sintomáticas com exames laboratoriais positivos (grupo VVC), houve frequência significativamente maior de alterações do trânsito intestinal do que no grupo controle (p 0,0002). Esse achado reforça a hipótese da existência de correlação entre as microbiotas intestinal e vaginal, onde, a disbiose intestinal pode levar ao crescimento de leveduras com consequente colonização vaginal.

Tem sido frequentemente descrita a alteração de microbiota intestinal em pacientes com alterações do trânsito intestinal, estudos demonstram consistentemente que nos indivíduos portadores de constipação intestinal há uma diminuição da população de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* quando comparados com grupo controle (CHASSARD *et al.*, 2012; KHALIF *et al.*, 2005; KIM *et al.*, 2014; PARTHASARATHY *et al.*, 2016).

Em relação aos fatores de risco mais frequentemente descritos, o uso de contraceptivos hormonais combinados tem sido reiteradas vezes citado como fator de risco para a ocorrência de CVV (SOBEL, 2007, 2016), uma hipótese que explicaria a fisiopatologia dessa correlação é a do aumento dos níveis de glicogênio, produzido pelas células do epitélio escamoso vaginal em resposta aos níveis elevados de estrogênio. O glicogênio é um importante nutriente e fonte de carbono, fundamental para o crescimento, germinação e adesão de *Candida* (DENNERSTEIN; ELLIS, 2001; SOBEL, 2007; ŠPAČEK *et al.*, 2007). Os dados obtidos no presente estudo são concordantes com os descritos na literatura, haja visto que entre as pacientes com CVV, o uso de contraceptivos orais combinados foi significativamente maior, em comparação com o grupo controle.

Já em relação ao uso de preservativo, diferentemente de estudo no qual foi demonstrado que seria fator protetor contra a ocorrência de CVV (ZENG *et al.*, 2018), nesta pesquisa não houve diferença significativa entre os dois grupos, sendo esse achado também descrito por outro investigador (AMOURI *et al.*, 2011) que também não encontrou associação entre uso de preservativo e colonização por *Candida*.

Os hábitos pessoais, tais como o uso de ducha vaginal e absorventes de uso diário, embora com resultados discrepantes entre os estudos, também têm sido correlacionados com a CVV. No caso da ducha vaginal, as hipóteses principais que justificariam o aumento da frequência das vulvovaginites, seriam o impacto na microbiota vaginal com diminuição dos *Lactobacillus*, a alteração da barreira imunológica e da integridade do epitélio (ASLAN; BECHELAGHEM, 2018; VAN DER VEER *et al.*, 2019). Contudo, no

presente estudo, o uso de ducha vaginal não teve diferença significativa entre os dois grupos, talvez pelo fato da baixa prevalência desse hábito em geral na população estudada, independente do diagnóstico de CVV.

Quanto ao uso do protetor diário de roupa íntima, embora alguns autores o considerem como risco para CVV (PATEL *et al.*, 2004; RENEMAN B *et al.*, 2004) provavelmente devido ao aumento da temperatura e umidade locais favorecendo o crescimento das leveduras, duas revisões publicadas sobre o tema, não confirmaram essa associação (FARAGE *et al.*, 2007; PONTES *et al.*, 2014). Diferentemente das conclusões dessas revisões, entre as mulheres participantes desta pesquisa, o uso de protetores diários de roupa íntima foi significativamente maior no grupo diagnosticado com CVV (p 0,00030). Por outro lado, cumpre ressaltar que a análise foi transversal, sendo possível também interpretar esse dado considerando o uso do protetor diário como uma consequência da secreção vaginal mais abundante entre as mulheres diagnosticadas com CVV.

Além dos hábitos pessoais, a ocorrência de outras condições clínicas como diabetes, doenças que levam à imunossupressão ou a presença de alergias, também são investigadas como fatores de risco para vulvovaginites.

Em relação às alergias respiratórias e a correlação com CVV, na literatura encontram-se publicações que relatam a coexistência dessas duas condições, embora em nenhuma publicação, a hipótese ou os mecanismos desse achado sejam explicados com clareza (GUO *et al.*, 2012; MORAES, 1998; NEVES *et al.*, 2005), e no presente estudo, as pacientes do grupo CVV relataram ser portadoras de alergias respiratórias com frequência significativamente maior que as pacientes assintomáticas com exames negativos (p 0,0042).

Para elaborar uma hipótese simples dessa susceptibilidade à luz do conhecimento de imunologia básica, sabe-se que a resposta imunitária em indivíduos com alergia respiratória é mediada via Th17 que aumenta a produção de IL-10, uma citocina anti-inflamatória que desvia a resposta imunitária (RI) para um polo Th2 (RABIN; LEVINSON, 2008). Alguns componentes de parede celular de fungos ricos em glicanas modulam negativamente a RI desviando-a para um polo Th2, que favorece a persistência do fungo e reduz os efeitos microbicidas sobre este (NÓBREGA *et al.*, 2010). Considerando então que o indivíduo que possui alergia respiratória tem mais IL-10, e que a RI mediada por essa citocina é inefetiva na eliminação de fungos como *Candida* spp., podemos elucidar que esse indivíduo atópico estaria mais susceptível à infecção fúngica,

o que corroboraria com a concomitância de CVV nestes pacientes.

Além da identificação de fatores de risco, é muito importante para a abordagem da CVV um diagnóstico mais preciso, que não só confirme a presença de *Candida*, como também consiga determinar a sua espécie.

Em relação aos métodos diagnósticos utilizados neste estudo, cabe salientar a concordância entre a espectrometria de massas, na modalidade do MALDI-TOF e o meio cromogênico na determinação das espécies, o que corrobora com a descrição do primeiro como uma ferramenta rápida e confiável para identificação precisa de leveduras, pois os espectros gerados na identificação são como assinaturas únicas de cada micro-organismo, sendo considerada então por apresentar mais de 90% de especificidade, uma excelente metodologia para ser empregada na identificação de espécies fúngicas (ALIZADEH *et al.*, 2017; CROXATTO; PROD'HOM; GREUB, 2012; MARKLEIN *et al.*, 2009).

Considerando o MALDI-TOF como padrão-ouro, foram calculadas no presente estudo a sensibilidade e especificidade tanto da PTG quanto do MC em pacientes sintomáticas e assintomáticas. O MC teve sensibilidade e especificidade médias de 95 e 99% respectivamente, quando comparado ao MALDI-TOF. Haja vista que esse último requer equipamento caro, nem sempre acessível para diagnóstico, a avaliação de metodologias clássicas, de menor custo, como GTT e CM, possibilita a realização de diagnósticos laboratoriais em locais que não dispõem da metodologia MALDI-TOF para uso.

Para muitos autores, *C. albicans* é considerada como comensal tanto da microbiota vaginal, como do trato gastrointestinal (BERNARDIS *et al.*, 2015; NIKOU *et al.*, 2019; ODDS *et al.*, 1988), sendo o surgimento de sintomas nessas mulheres colonizadas atribuído à ocorrência de um desequilíbrio nessa relação simbiótica que resulta no supercrescimento de *Candida* concomitante à alteração nos mecanismos de defesa do hospedeiro, que é denominada disbiose (DONDERS *et al.*, 2018; SOBEL, 2016).

No tocante às espécies causadoras da CVV, vários estudos demonstram que a maioria (80 a 90%) dos casos de CVV tem *Candida albicans* isolada como agente etiológico (AHMAD; KHAN, 2009; FAN; LIU; LI, 2008; GYGAX *et al.*, 2008; HETTICARACHCHI; ASHBEE; WILSON, 2010; LIU *et al.*, 2014; SOBEL, 2007; SOBEL *et al.*, 1998; SPINILLO *et al.*, 1997). Outros autores têm relatado como agentes etiológicos de CVV emergentes nas duas últimas décadas, espécies não *albicans* (NA), outrora tidas como apenas comensais, tais como *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e

C. tropicalis (BRANDOLT *et al.*, 2017; GONÇALVES *et al.*, 2016; NAKAMURA-VASCONCELOS *et al.*, 2017). Neste estudo, a prevalência de espécies de *Candida albicans* (80,9%) e não *albicans* (18,1%), foi semelhante à descrita na literatura, destacando-se o fato de que esses dados foram obtidos entre as pacientes sintomáticas, podendo-se inferir que as espécies não *albicans* seriam causa dos sintomas da CVV, e não apenas comensais.

Chamou também a atenção, o isolamento de um outro gênero de levedura em paciente com quadro clínico característico de CVV, a *Rhodotorula mucilaginosa*. Estudo realizado no Brasil com coleta de amostras da pele da região genital de pacientes assintomáticas encontrou prevalência de positividade para *R. mucilaginosa* em 13,5% (BENTUBO *et al.*, 2015). As espécies dessa levedura são tradicionalmente consideradas saprófitas não-virulentas e micro-organismos contaminantes comuns, contudo, nas últimas duas décadas, essas leveduras surgiram como patógenos oportunistas (NUNES *et al.*, 2013; WIRTH; GOLDANI, 2012).

Outro estudo realizado na Argentina, identificou essa levedura em 10% das amostras obtidas por *swabs* vaginais de gestantes, destas 3,8% sintomáticas (MUCCI *et al.*, 2016). Embora em nosso estudo a prevalência desta espécie não tenha sido semelhante à descrita na literatura, seu achado corrobora com a existência de CVV causada por essa espécie.

Outro aspecto levantado nesse estudo foi a recorrência, tanto por análise epidemiológica de dados obtidos por questionário aplicado a todas as pacientes incluídas no estudo e submetidas a primeira coleta, como prospectivamente por reavaliação laboratorial em segunda coleta de uma parte dessas pacientes.

Em uma primeira análise, dados sobre a frequência dos sintomas foram obtidos com base em relatos das pacientes, pelos quais a prevalência de recorrência (considerada como mais que 4 episódios nos últimos 12 meses) foi de 50,9% entre as 173 pacientes sintomáticas. Outros estudos também avaliaram a prevalência de CVVR com base em dados obtidos pelas respostas a questionários epidemiológicos, como estudo incluindo análise de dados de vários países, que encontrou prevalência de recorrência da CVV de 9% antes dos 50 anos, com pico entre os 19 e 35 anos (BLOSTEIN *et al.*, 2017).

Outro investigador, encontrou prevalência de recorrência de 34%, (considerada como relato de mais de 4 episódios por ano) entre mulheres que responderam questionário específico, predominando na faixa etária de 26 a 40 anos (YANO *et al.*, 2019).

Nota-se que os achados do presente estudo apontam para prevalência maior do que a descrita pela literatura, o que pode ser devido à característica da população estudada, que em geral, procura o atendimento médico por não ter tido resolução dos sintomas com tratamentos caseiros, ou pelo uso de fármacos adquiridos facilmente sem prescrição médica, ou seja, deve haver muitas mulheres sintomáticas que não chegam ao serviço de saúde.

Dados de frequência de recorrência baseados em estudos prospectivos, com inclusão de análise laboratorial de amostras das mesmas pacientes coletadas em momentos diferentes, são escassos na literatura. A maior parte dos estudos avalia a prevalência de recorrência com base em dados obtidos a partir de questionários.

Entre as pacientes analisadas nessa pesquisa, o exame de amostras obtidas em momentos diferentes da mesma paciente que se manteve sintomática, revelou uma taxa de recorrência de 28,6% considerando a ocorrência de dois resultados positivos, com uma prevalência de espécies não *albicans* de 33,3%. Embora esse dado não possa ser comparado com os descritos pelos estudos já citados anteriormente, e ressalvada a quantidade limitada de pacientes, é bastante relevante, considerando que devido à baixa sensibilidade dos sintomas relatados para o diagnóstico, a real prevalência da recorrência obtida por análise prospectiva de exames laboratoriais com alta especificidade, permanece desconhecida.

Atualmente, as cepas são consideradas sensíveis apenas na vigência de um MIC ≤ 2 $\mu\text{g/mL}$, enquanto referências anteriormente utilizavam um valor de MIC ≤ 8 $\mu\text{g/mL}$ (SOBEL; SOBEL, 2018), que continua a ser liberado em resultados laboratoriais de rotina em testes de sensibilidade a antimicrobianos como MIC sensível, reduzindo as chances de efetividade do tratamento ao paciente.

A frequência de mulheres com CVVR resistente ao fluconazol vem aumentando, isso pode ser explicado em parte pela maior prevalência de espécies não *albicans* nos casos recorrentes, conforme demonstra estudo publicado em 2018, no qual foram isoladas de pacientes sintomáticas 41% de espécies não *albicans* e foi observada resistência ao fluconazol em 17% do total das cepas isoladas, incluindo as *C. albicans* (BITEW; ABEBAW, 2018).

Resultados semelhantes, corroboram a hipótese de maior prevalência de resistência a fluconazol entre as espécies não *albicans*, foram obtidos em estudo que ao analisar 169 isolados clínicos, foram identificadas 58% de sensibilidade ao fluconazol

entre as *Candidas* não *albicans*, e 81,7% nas *C. albicans*, chamando a atenção também o alto percentual de resistência ao fluconazol, próximo a 20% (TANG *et al.*, 2019) .

No presente estudo, embora tenham sido analisadas apenas 19 amostras empregando o MIC (18,1% do total de amostras positivas), houve uma inversão no perfil de resistência, observada em 94,7% de *C. albicans*, o que pode refletir a realidade observada na clínica, quando as pacientes fazem antifungograma automatizado e as espécies de *C. albicans*, apresentam em sua grande maioria sensibilidade a este antifúngico amplamente empregado para o tratamento da CVV, mas não respondem a terapia com o antifúngico.

Embora estes dados não reflitam ou possibilitem uma comparação entre os métodos antifungograma automatizado e MIC, a posterior realização do método de MIC para as demais amostras coletadas, poderá elucidar com maior clareza esse achado laboratorial, podendo corroborar com a prática clínica.

7. CONCLUSÃO

Em conclusão, este estudo, ao estabelecer diagnóstico laboratorial preciso por método presuntivo, confirmado pelo MALDI-TOF concomitantemente à avaliação clínica, demonstrou que a presença de sintomas tem baixo Valor Preditivo Positivo para o diagnóstico da CVV. Além disso, através do inquérito epidemiológico, foram confirmados fatores de risco já descritos na literatura e elencados novos, relacionados à disbiose intestinal e por consequência também à disbiose vaginal que podem estar associados à infecção

A utilização do MALDI-TOF possibilitou a identificação precisa (sensibilidade >90%) das espécies de leveduras. O emprego dessa técnica, que foi concordante com os métodos de identificação fenotípica pelo meio cromogênico, possibilitou conhecer a prevalência das espécies, demonstrando-se que a *Candida albicans* foi a espécie mais prevalente, embora diferentes espécies não *albicans*, muitas vezes consideradas apenas como comensais pela literatura, tenham sido identificadas como agentes etiológicos da CVV. Cumpre ressaltar que tal achado é de suma relevância levando-se em consideração o tratamento e a recorrência.

Além da identificação das espécies, houve também a possibilidade, ainda que em um pequeno número, de avaliação laboratorial da recorrência da candidíase de forma prospectiva de pacientes sintomáticas em seguimento terapêutico. Tal análise, difere de grande parte dos estudos que avalia a prevalência de recorrência com base em dados obtidos a partir de questionários, contribuindo assim para um campo de pesquisa que pode melhor investigar a CVVR.

Outro aspecto importante avaliado, embora não tenha sido possível o processamento de todas as amostras, foi a determinação do perfil de sensibilidade frente ao antifúngico de escolha mais empregado no mundo para o tratamento da infecção. Posteriormente serão processadas o restante das amostras, o que com certeza, trará importante contribuição.

Diante do exposto, este trabalho traz uma importante contribuição para o estudo da CVV, com uma visão mais abrangente da doença e fomentando o desenvolvimento de novas estratégias de pesquisas que forneçam soluções para o manejo clínico da candidíase.

8. REFERÊNCIAS

ACHKAR, Jacqueline M.; FRIES, Bettina C. Candida infections of the genitourinary tract. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 23, n. 2, p. 253–273, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/CMR.00076-09>

AHMAD, Suhail *et al.* Performance comparison of phenotypic and molecular methods for detection and differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. **BMC Infectious Diseases**, [s. l.], v. 12, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2334-12-230>

AHMAD; Khan. Prevalence of *Candida* species and potential risk factors for vulvovaginal candidiasis in Aligarh, India. **European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology**, [s. l.], v. 144, n. 1, p. 68–71, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2008.12.020>

ALBENBERG, Lindsey G.; WU, Gary D. Diet and the Intestinal Microbiome: Associations, Functions, and Implications for Health and Disease. **Gastroenterology**, [s. l.], v. 146, n. 6, p. 1564–1572, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.01.058>

ALIZADEH, Majid *et al.* Identification of *Candida* species isolated from vulvovaginitis in Mashhad, Iran by Use of MALDI-TOF MS. **Current Medical Mycology**, [s. l.], v. 3, n. 4, p. 21–25, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.29252/cmm.3.4.21>

ÁLVARES, Cassiana Aparecida; SVIDZINSKI, Terezinha Inez Estivalet; CONSOLARO, Márcia Edilaine Lopes. Candidíase vulvovaginal: Fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, [s. l.], v. 43, n. 5, p. 319–327, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s1676-24442007000500004>

AMANN, R I; LUDWIG, W; SCHLEIFER, K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological reviews**, [s. l.], v. 59, n. 1, p. 143–169, 1995. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7535888>

AMOURI, I. *et al.* Epidemiological survey of vulvovaginal candidosis in Sfax, Tunisia. **Mycoses**, [s. l.], v. 54, n. 5, p. 499–505, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2010.01965.x>

ANDERSON, Matthew R.; KLINK, Kathleen; COHRSEN, Andreas. Evaluation of Vaginal Complaints. **Journal of the American Medical Association**, [s. l.], v. 291, n. 11, p. 1368–1379, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1001/jama.291.11.1368>

ANDRIOLI, João Luciano *et al.* Frequência de leveduras em fluido vaginal de mulheres com e sem suspeita clínica de candidíase vulvovaginal. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia**, [s. l.], v. 31, n. 6, p. 300–304, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-72032009000600006>

ARASTEHFAR, Amir *et al.* Molecular Identification, Genotypic Diversity, Antifungal

Susceptibility, and Clinical Outcomes of Infections Caused by Clinically Underrated Yeasts, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis*: An Iranian Multicenter Study (2014–2019). **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 9, n. July, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00264>

ASLAN, Erdogan; BECHELAGHEM, Nadia. To ‘douche’ or not to ‘douche’: hygiene habits may have detrimental effects on vaginal microbiota. **Journal of Obstetrics and Gynaecology**, [s. l.], v. 38, n. 5, p. 678–681, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/01443615.2017.1395398>

AVNI, Tomer; LEIBOVICI, Leonard; PAUL, Mical. PCR Diagnosis of Invasive Candidiasis: Systematic Review and Meta-Analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 49, n. 2, p. 665–670, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JCM.01602-10>

BARAD, S. *et al.* Preparation and characterization of ZnO nanoparticles coated by chitosan-linoleic acid; fungal growth and biofilm assay. **Bratislava Medical Journal**, [s. l.], v. 118, n. 03, p. 169–174, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.4149/BLL_2017_034

BENTUBO, Henri Donnarumma Levy *et al.* Yeasts of the genital region of patients attending the dermatology service at Hospital São Paulo, Brazil. **Revista Iberoamericana de Micologia**, [s. l.], v. 32, n. 4, p. 229–234, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.riam.2014.11.004>

BERNARDIS, Flavia De *et al.* *Candida* vaginitis: virulence, host response and vaccine prospects. **Medical Mycology**, [s. l.], v. 56, n. suppl_1, p. S26–S31, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/mmy/myx139>

BERNARDIS, Flavia De *et al.* Studies of immune responses in *Candida* vaginitis. **Pathogens**, [s. l.], v. 4, n. 4, p. 697–707, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pathogens4040697>

BITEW, Adane; ABEBAW, Yeshiwork. Vulvovaginal candidiasis: Species distribution of *Candida* and their antifungal susceptibility pattern. **BMC Women’s Health**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 1–10, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12905-018-0607-z>

BLOSTEIN, Freida *et al.* Recurrent vulvovaginal candidiasis. **Annals of Epidemiology**, [s. l.], v. 27, n. 9, p. 575–582.e3, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2017.08.010>

BRANDOLT, Tchana Martinez *et al.* Prevalence of *Candida* spp. in cervical-vaginal samples and the in vitro susceptibility of isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 48, n. 1, p. 145–150, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.09.006>

BROTMAN, Rebecca M. *et al.* Interplay between the temporal dynamics of the vaginal microbiota and human papillomavirus detection. **Journal of Infectious Diseases**, [s. l.],

v. 210, n. 11, p. 1723–1733, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu330>

BURSTEIN, Gale R.; WORKOWSKI, Kimberly A. **Sexually transmitted diseases treatment guidelines**. [S. l.: s. n.], 2003. ISSN 10408703.v. 15 Disponível em: <https://doi.org/10.1097/00008480-200308000-00006>

BURTON, Jeremy P.; REID, Gregor. Evaluation of the bacterial vaginal flora of 20 postmenopausal women by direct (Nugent score) and molecular (polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis) techniques. **Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 186, n. 12, p. 1770–1780, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1086/345761>

CAMILLETTI, A. L. *et al.* First Steps towards the Pharmaceutical Development of Ovules Containing Lactobacillus Strains: Viability and Antimicrobial Activity as Basic First Parameters in Vaginal Formulations. **AAPS PharmSciTech**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 886–895, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1208/s12249-017-0895-x>

CAMPOY, Sonia; ADRIO, José L. Antifungals. **Biochemical Pharmacology**, [s. l.], v. 133, p. 86–96, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.11.019>

CASADEVALL, Arturo; PIROFSKI, Liise-anne. A Therapeutic Vaccine for Recurrent Vulvovaginal Candidiasis. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 66, n. 12, p. 1937–1939, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/cid/ciy188>

CASSONE, Antonio. Development of vaccines for *Candida albicans*: Fighting a skilled transformer. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 11, n. 12, p. 884–891, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrmicro3156>

CASSONE, Antonio. Fungal vaccines: real progress from real challenges. **The Lancet Infectious Diseases**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 114–124, 2008. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(08\)70016-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(08)70016-1)

CASSONE, Antonio; CASADEVALL, Arturo. Recent progress in vaccines against fungal diseases. **Current Opinion in Microbiology**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. 427–433, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2012.04.004>

CASTRO, Ana *et al.* Papel de los probióticos en Obstetricia y Ginecología. **Nutricion Hospitalaria**, [s. l.], v. 31, p. 26–29, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.sup1.8704>

CHASSARD, C. *et al.* Functional dysbiosis within the gut microbiota of patients with constipated-irritable bowel syndrome. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, [s. l.], v. 35, n. 7, p. 828–838, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2012.05007.x>

CHATZIVASILEIOU, Panagiota; VYZANTIADIS, Timoleon-Achilleas. Vaginal yeast colonisation: From a potential harmless condition to clinical implications and management approaches—A literature review. **Mycoses**, [s. l.], v. 62, n. 8, p. 638–650, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/myc.12920>

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. [S. l.: s. n.], 2008. v. 22

CROXATTO, Antony; PROD'HOM, Guy; GREUB, Gilbert. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. **FEMS Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 36, n. 2, p. 380–407, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x>

DAS, Bhaskar *et al.* Understanding the Antifungal Mechanism of Ag@ZnO Core-shell Nanocomposites against *Candida krusei*. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, n. May, p. 1–12, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep36403>

DE SETA, Francesco *et al.* Antifungal mechanisms supporting boric acid therapy of *Candida vaginitis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s. l.], v. 63, n. 2, p. 325–336, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jac/dkn486>

DEMIREZEN, S.; DIRLIK, O. Ö; BEKSAÇ, M. S. The association of *Candida* infection with intrauterine contraceptive device. **Central European Journal of Public Health**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 32–34, 2005.

DENNERSTEIN, Graeme J.; ELLIS, David H. Oestrogen, glycogen and vaginal candidiasis. **Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology**, [s. l.], v. 41, n. 3, p. 326–328, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1479-828X.2001.tb01238.x>

DENNING, David W. *et al.* Global burden of recurrent vulvovaginal candidiasis: a systematic review. **The Lancet Infectious Diseases**, [s. l.], v. 18, n. 11, p. e339–e347, 2018. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30103-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30103-8)

DONDERS, Gilbert G.G. *et al.* Aerobic vaginitis: Abnormal vaginal flora entity that is distinct from bacterial vaginosis. **International Congress Series**, [s. l.], v. 1279, n. January, p. 118–129, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ics.2005.02.064>

DONDERS, Gilbert G.G. *et al.* Definition of a type of abnormal vaginal flora that is distinct from bacterial vaginosis: aerobic vaginitis. **BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, [s. l.], v. 109, n. 1, p. 34–43, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2002.00432.x>

DONDERS, Gilbert G.G. *et al.* Is non-response to fluconazole maintenance therapy for recurrent *Candida* vaginitis related to sensitization to atopic reactions? **American Journal of Reproductive Immunology**, [s. l.], v. 79, n. 4, p. 1–7, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/aji.12811>

DONDERS, Gilbert G.G.; SOBEL, Jack D. *Candida* vulvovaginitis: A store with a butterfly and a show window. **Mycoses**, [s. l.], v. 60, n. 2, p. 70–72, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/myc.12572>

DROSSMAN, Douglas A. Functional gastrointestinal disorders: History, pathophysiology, clinical features, and Rome IV. **Gastroenterology**, [s. l.], v. 150, n. 6,

p. 1262-1279.e2, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.02.032>

ECKERT, Linda O. Acute Vulvovaginitis. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 355, n. 12, p. 1244–1252, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1056/nejmcp053720>

EDWARDS, John E *et al.* A Fungal Immunotherapeutic Vaccine (NDV-3A) for Treatment of Recurrent Vulvovaginal Candidiasis—A Phase 2 Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 66, n. 12, p. 1928–1936, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/cid/ciy185>

EDWARDS, John E. Fungal cell wall vaccines: An update. **Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 61, n. PART7, p. 895–903, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.041665-0>

EL AILA, Nabil Abdullah *et al.* Strong correspondence in bacterial loads between the vagina and rectum of pregnant women. **Research in Microbiology**, [s. l.], v. 162, n. 5, p. 506–513, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2011.04.004>

FAN, Shang Rong; LIU, Xiao Ping; LI, Jian Wu. Clinical characteristics of vulvovaginal candidiasis and antifungal susceptibilities of *Candida* species isolates among patients in southern China from 2003 to 2006. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, [s. l.], v. 34, n. 4, p. 561–566, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1447-0756.2008.00817.x>

FARAGE, Miranda *et al.* Do panty liners promote vulvovaginal candidiasis or urinary tract infections?. A review of the scientific evidence. **European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology**, [s. l.], v. 132, n. 1, p. 8–19, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2006.11.015>

FERRER, J. Vaginal candidosis: Epidemiological and etiological factors. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, [s. l.], v. 71, n. SUPPL. 1, p. 21–27, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0020-7292\(00\)00350-7](https://doi.org/10.1016/s0020-7292(00)00350-7)

FERRIS, D G; DEKLE, C; LITAKER, M S. Women's use of over-the-counter antifungal medications for gynecologic symptoms. **The Journal of family practice**, [s. l.], v. 42, n. 6, p. 595–600, 1996. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8656170>

GAJER, Pawel *et al.* Temporal dynamics of the human vaginal microbiota. **Science Translational Medicine**, [s. l.], v. 4, n. 132, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003605>

GARDNER, Herman L. Desquamative inflammatory vaginitis: A newly defined entity. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, [s. l.], v. 102, n. 8, p. 1102–1105, 1968. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(68\)90399-2](https://doi.org/10.1016/0002-9378(68)90399-2)

GARRY, TC. Chapter 73 Basic Biology of Fungi. *In*: BARON S (org.). [S. l.: s. n.], 1996. p. 1–12. *E-book*.

GHANNOUM; RICE. Antifungal Agents: Mode of Action, Mechanisms of Resistance, and Correlation of These Mechanisms with Bacterial Resistance. **Clinical Microbiology**

Reviews, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 501–517, 1999.

GONÇALVES, Bruna *et al.* Vulvovaginal candidiasis: Epidemiology, microbiology and risk factors. **Critical Reviews in Microbiology**, [s. l.], v. 42, n. 6, p. 905–927, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3109/1040841X.2015.1091805>

GOULART, Vânia A M; RESENDE, Rodrigo R. MALDI-TOF: uma ferramenta revolucionária para as análises clínicas e pesquisa do câncer. **Nanocell News**, [s. l.], v. 1, n. 3, p. 1–7, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.15729/nanocellnews.2013.11.21.001>

GUNTHER, Luciene Setsuko Akimoto *et al.* Prevalência de candida albicans e não albicans isoladas de secreção vaginal: Avaliação comparativa entre colonização, candidíase vaginal e candidíase vaginal recorrente em mulheres diabéticas e não diabéticas. **Sao Paulo Medical Journal**, [s. l.], v. 132, n. 2, p. 116–120, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1516-3180.2014.1322640>

GUO, Renyong *et al.* Increased Diversity of Fungal Flora in the Vagina of Patients with Recurrent Vaginal Candidiasis and Allergic Rhinitis. **Microbial Ecology**, [s. l.], v. 64, n. 4, p. 918–927, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0084-0>

GYGAX, Scott E. *et al.* Antifungal Resistance of Candida glabrata Vaginal Isolates and Development of a Quantitative Reverse Transcription-PCR-Based Azole Susceptibility Assay. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 52, n. 9, p. 3424–3426, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AAC.00462-08>

HALL, Rebecca A. Dressed to impress: Impact of environmental adaptation on the Candidaalbicans cell wall. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 97, n. 1, p. 7–17, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/mmi.13020>

HAPPEL, Anna-Ursula *et al.* Probiotics for vaginal health in South Africa: what is on retailers' shelves? **BMC Women's Health**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 7, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12905-017-0362-6>

HATA, Masato *et al.* In vitro and in vivo antifungal activities of aminopiperidine derivatives, novel ergosterol synthesis inhibitors. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, [s. l.], v. 33, n. 3, p. 473–476, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1248/bpb.33.473>

HECZKO, Piotr B. *et al.* Supplementation of standard antibiotic therapy with oral probiotics for bacterial vaginosis and aerobic vaginitis: A randomised, double-blind, placebocontrolled trial. **BMC Women's Health**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 1–12, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12905-015-0246-6>

HETTICARACHCHI, Nalin; ASHBEE, H. Ruth; WILSON, Janet D. Prevalence and management of non-albicans vaginal candidiasis. **Sexually Transmitted Infections**, [s. l.], v. 86, n. 2, p. 99–100, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/sti.2009.040386>

HU, Zhengqiang *et al.* Identification of Cytolytic Vaginosis Versus Vulvovaginal Candidiasis. **Journal of Lower Genital Tract Disease**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 152–155,

2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/LGT.0000000000000076>

HURLEY, R; DE LOUVOIS, J. Candida vaginitis. **Postgraduate Medical Journal**, [s. l.], v. 55, n. 647, p. 645–647, 1979. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/pgmj.55.647.645>

IANNITTI, Rossana G.; CARVALHO, Agostinho; ROMANI, Luigina. From memory to antifungal vaccine design. **Trends in Immunology**, [s. l.], v. 33, n. 9, p. 467–474, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.it.2012.04.008>

IVAZZO, Christos *et al.* Boric acid for recurrent vulvovaginal candidiasis: The clinical evidence. **Journal of Women's Health**, [s. l.], v. 20, n. 8, p. 1245–1255, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/jwh.2010.2708>

ILKIT, MaIt; GUZEL, Ahmet Baris. The epidemiology, pathogenesis, and diagnosis of vulvovaginal candidosis: A mycological perspective. **Critical Reviews in Microbiology**, [s. l.], v. 37, n. 3, p. 250–261, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.3109/1040841X.2011.576332>

JANG, Kyoung Soon; KIM, Young Hwan. Rapid and robust MALDI-TOF MS techniques for microbial identification: a brief overview of their diverse applications. **Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 56, n. 4, p. 209–216, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12275-018-7457-0>

JØRGENSEN, Mette Rose *et al.* Probiotic lactobacillus reuteri has antifungal effects on oral Candida species in vitro. **Journal of Oral Microbiology**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1–8, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/20002297.2016.1274582>

KANG, Chang Ho *et al.* In Vitro Probiotic Properties of Lactobacillus salivarius MG242 Isolated from Human Vagina. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 343–349, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9323-5>

KENNEDY, Melissa A.; SOBEL, Jack D. Vulvovaginal Candidiasis caused by non-albicans Candida species: New insights. **Current Infectious Disease Reports**, [s. l.], v. 12, n. 6, p. 465–470, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11908-010-0137-9>

KHALIF, I. L. *et al.* Alterations in the colonic flora and intestinal permeability and evidence of immune activation in chronic constipation. **Digestive and Liver Disease**, [s. l.], v. 37, n. 11, p. 838–849, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.dld.2005.06.008>

KIM, Si Hyun *et al.* Misidentification of Candida guilliermondii as C. famata among Strains Isolated from Blood Cultures by the VITEK 2 System. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2014, p. 1–6, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2014/250408>

KIM; Park. Probiotics in the Prevention and Treatment of Postmenopausal Vaginal Infections: Review Article. **Journal of Menopausal Medicine**, [s. l.], v. 23, n. 3, p. 139,

2017. Disponível em: <https://doi.org/10.6118/jmm.2017.23.3.139>

KING, R. D.; LEE, J. C.; MORRIS, A. L. Adherence of *Candida albicans* and other *Candida* species to mucosal epithelial cells. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 27, n. 2, p. 667–674, 1980. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/IAI.27.2.667-674.1980>

KOBAN, Ina *et al.* Treatment of *Candida albicans* biofilms with low-temperature plasma induced by dielectric barrier discharge and atmospheric pressure plasma jet. **New Journal of Physics**, [s. l.], v. 12, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1088/1367-2630/12/7/073039>

KRAUSS, Jürgen *et al.* Synthesis and biological evaluation of novel N-alkyl tetra- and decahydroisoquinolines: Novel antifungals that target ergosterol biosynthesis. **Archiv der Pharmazie**, [s. l.], v. 347, n. 4, p. 283–290, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ardp.201300338>

LACY, Brian E. *et al.* Bowel disorders. **Gastroenterology**, [s. l.], v. 150, n. 6, p. 1393–1407.e5, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.02.031>

LEASE, Erika; ALEXANDER, Barbara. Fungal Diagnostics in Pneumonia. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, [s. l.], v. 32, n. 06, p. 663–672, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1055/s-0031-1295714>

LIU *et al.* Impact of pH on the antifungal susceptibility of vaginal *Candida albicans*. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, [s. l.], v. 114, n. 3, p. 278–280, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijgo.2011.03.016>

LIU, X. P. *et al.* Species distribution and susceptibility of *Candida* isolates from patient with vulvovaginal candidiasis in Southern China from 2003 to 2012. **Journal de Mycologie Medicale**, [s. l.], v. 24, n. 2, p. 106–111, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2014.01.060>

LÓPEZ-RIBOT, José L. *et al.* Antibody response to *Candida albicans* cell wall antigens. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, [s. l.], v. 41, n. 3, p. 187–196, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.femsim.2004.03.012>

MAHMOUD, M.A. *et al.* Molecular characterization of the pathogenic plant fungus *Rhizoctonia solani* (Ceratobasidiaceae) isolated from Egypt based on protein and PCR-RAPD profiles. **Genetics and Molecular Research**, [s. l.], v. 11, n. 4, p. 3585–3600, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.4238/2012.October.4.6>

MALIK, Shweta *et al.* High mannose-specific lectin Msl mediates key interactions of the vaginal *Lactobacillus plantarum* isolate CMPG5300. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, n. July, p. 1–16, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep37339>

MARKLEIN, G. *et al.* Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 47, n. 9, p. 2912–2917, 2009. Disponível em:

<https://doi.org/10.1128/JCM.00389-09>

MARTIN, David H. *et al.* The microbiota of the human genitourinary tract: trying to see the forest through the trees. **Transactions of the American Clinical and Climatological Association**, [s. l.], v. 123, p. 242–256, 2012.

MASCARENHAS, Rita Elizabeth Moreira *et al.* Prevalence and Risk Factors for Bacterial Vaginosis and Other Vulvovaginitis in a Population of Sexually Active Adolescents from Salvador, Bahia, Brazil. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, [s. l.], v. 2012, p. 1–6, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2012/378640>

MATARE, Tapiwa *et al.* Experimental Germ Tube Induction in *Candida albicans*: An Evaluation of the Effect of Sodium Bicarbonate on Morphogenesis and Comparison with Pooled Human Serum. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2017, p. 1–5, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2017/1976273>

MATSUBARA, Victor H. *et al.* Probiotics as Antifungals in Mucosal Candidiasis. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 62, n. 9, p. 1143–1153, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/cid/ciw038>

MAUBON, Danièle *et al.* Resistance of *Candida* spp. to antifungal drugs in the ICU: where are we now? **Intensive Care Medicine**, [s. l.], v. 40, n. 9, p. 1241–1255, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00134-014-3404-7>

MENDLING, Werner. Guideline: Vulvovaginal candidosis (AWMF 015/072), S2k (excluding chronic mucocutaneous candidosis). **Mycoses**, [s. l.], v. 58, n. S1, p. 1–15, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/myc.12292>

MILES, Mary Ryan. Recurrent Vaginal Candidiasis. **JAMA**, [s. l.], v. 238, n. 17, p. 1836, 1977. Disponível em: <https://doi.org/10.1001/jama.1977.03280180040023>

MISSEL, Witz, Benjamin *et al.* Update on lactose malabsorption and intolerance: Pathogenesis, diagnosis and clinical management. **Gut**, [s. l.], v. 68, n. 11, p. 2080–2091, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-318404>

MITRA, Anita *et al.* The vaginal microbiota, human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia: What do we know and where are we going next? **Microbiome**, [s. l.], v. 4, p. 1–15, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40168-016-0203-0>

MORAES, Paula S.A. Recurrent vaginal candidiasis and allergic rhinitis: A common association. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, [s. l.], v. 81, n. 2, p. 165–169, 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)62804-9](https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)62804-9)

MORAGUES, Maria Dolores *et al.* *Candida* antigens and immune responses: implications for a vaccine. **Expert Review of Vaccines**, [s. l.], v. 13, n. 8, p. 1001–1012, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1586/14760584.2014.932253>

MORELLI, L. *et al.* Utilization of the Intestinal Tract as a Delivery System for Urogenital

Probiotics. **Journal of Clinical Gastroenterology**, [s. l.], v. 38, n. Supplement 2, p. S107–S110, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/01.mcg.0000128938.32835.98>

MOSZAL, Malgorzata; SZULINSKA, Monika; BGDANSKI, Pawel. You Are What You Eat — The Relationship between. **Nutrients**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 1–30, 2020.

MUCCI, María J. *et al.* A prospective observational study of vulvovaginitis in pregnant women in Argentina, with special reference to candidiasis. **Mycoses**, [s. l.], v. 59, n. 7, p. 429–435, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/myc.12490>

NAKAMURA-VASCONCELOS, Sandra Sayuri *et al.* Emergence of *Candida glabrata* in vulvovaginal candidiasis should be attributed to selective pressure or virulence ability? **Archives of Gynecology and Obstetrics**, [s. l.], v. 296, n. 3, p. 519–526, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00404-017-4465-y>

NEAL, Chemen M. *et al.* Noncandidal vaginitis: a comprehensive approach to diagnosis and management. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, [s. l.], v. 222, n. 2, p. 114–122, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2019.09.001>

NEPPELENBROEK, KH *et al.* Identification of *Candida* species in the clinical laboratory: a review of conventional, commercial, and molecular techniques. **Oral Diseases**, [s. l.], v. 20, n. 4, p. 329–344, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/odi.12123>

NEVES, N. A. *et al.* Association between atopy and recurrent vaginal candidiasis. **Clinical and Experimental Immunology**, [s. l.], v. 142, n. 1, p. 167–171, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2005.02891.x>

NGUYEN, M. Hong *et al.* Performance of *Candida* Real-time Polymerase Chain Reaction, -D-Glucan Assay, and Blood Cultures in the Diagnosis of Invasive Candidiasis. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 54, n. 9, p. 1240–1248, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/cid/cis200>

NIKOU, Spyridoula Angeliki *et al.* *Candida albicans* interactions with mucosal surfaces during health and disease. **Pathogens**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 1–23, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pathogens8020053>

NÓBREGA, Yanna Karla de Medeiros *et al.* The Cell Wall Fraction from *Fonsecaea pedrosoi* Stimulates Production of Different Profiles of Cytokines and Nitric Oxide by Murine Peritoneal Cells In Vitro. **Mycopathologia**, [s. l.], v. 170, n. 2, p. 89–98, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11046-010-9303-8>

NUNES, Jorge Meneses *et al.* Molecular identification, antifungal susceptibility profile, and biofilm formation of clinical and environmental *Rhodotorula* species isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 57, n. 1, p. 382–389, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AAC.01647-12>

ODDS, F.C. *et al.* *Candida* concentrations in the vagina and their association with signs and symptoms of vaginal candidosis. **Medical Mycology**, [s. l.], v. 26, n. 5, p. 277–283,

1988. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/02681218880000391>

ODDS, F. C.; BERNAERTS, R. CHROMagar Candida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important Candida species. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 32, n. 8, p. 1923–1929, 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JCM.32.8.1923-1929.1994>

OLIVEIRA, Paula Matos *et al.* Candida species isolated from the vaginal mucosa of HIV-infected women in Salvador, Bahia, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 239–244, 2011. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1413-8670\(11\)70182-9](https://doi.org/10.1016/S1413-8670(11)70182-9)

OTAŠEVIĆ, S. *et al.* Non-culture based assays for the detection of fungal pathogens. **Journal de Mycologie Médicale**, [s. l.], v. 28, n. 2, p. 236–248, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2018.03.001>

PAAVONEN, Jorma; BRUNHAM, Robert C. Bacterial Vaginosis and Desquamative Inflammatory Vaginitis. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 379, n. 23, p. 2246–2254, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1056/nejmra1808418>

PAROLIN, Carola *et al.* Isolation of Vaginal Lactobacilli and Characterization of Anti-Candida Activity. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. e0131220, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131220>

PARTHASARATHY, Gopanandan *et al.* Relationship Between Microbiota of the Colonic Mucosa vs Feces and Symptoms, Colonic Transit, and Methane Production in Female Patients With Chronic Constipation. **Gastroenterology**, [s. l.], v. 150, n. 2, p. 367-379.e1, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.10.005>

PATEL, Divya A. *et al.* Risk factors for recurrent vulvovaginal candidiasis in women receiving maintenance antifungal therapy: Results of a prospective cohort study. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, [s. l.], v. 190, n. 3, p. 644–653, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2003.11.027>

PENDHARKAR, Sonal *et al.* Vaginal colonisation by probiotic lactobacilli and clinical outcome in women conventionally treated for bacterial vaginosis and yeast infection. **BMC Infectious Diseases**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 1–12, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12879-015-0971-3>

PEREIRA, Lívia Custódio *et al.* Vulvovaginal candidiasis and current perspectives: new risk factors and laboratory diagnosis by using MALDI TOF for identifying species in primary infection and recurrence. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, [s. l.], 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10096-021-04199-1>

PERLIN, David S. Current perspectives on echinocandin class drugs. **Future Microbiology**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 441–457, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.2217/fmb.11.19>

PETRICEVIC, Ljubomir *et al.* Characterisation of the oral, vaginal and rectal

Lactobacillus flora in healthy pregnant and postmenopausal women. **European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology**, [s. l.], v. 160, n. 1, p. 93–99, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2011.10.002>

PETROVA, Mariya I. *et al.* Lactobacillus species as biomarkers and agents that can promote various aspects of vaginal health. **Frontiers in Physiology**, [s. l.], v. 6, n. MAR, p. 1–18, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00081>

PIROTTA, Marie V.; GARLAND, Suzanne M. Genital candida species detected in samples from women in Melbourne, Australia, before and after treatment with antibiotics. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 44, n. 9, p. 3213–3217, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JCM.00218-06>

PONTES, Ana C. *et al.* A systematic review of the effect of daily panty liner use on the vulvovaginal environment. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, [s. l.], v. 127, n. 1, p. 1–5, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijgo.2014.06.017>

PORTMAN, David J.; GASS, Margery L.S. Genitourinary Syndrome of Menopause: New Terminology for Vulvovaginal Atrophy from the International Society for the Study of Women's Sexual Health and The North American Menopause Society. **The Journal of Sexual Medicine**, [s. l.], v. 11, n. 12, p. 2865–2872, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jsm.12686>

POULAIN, Daniel. Candida albicans , plasticity and pathogenesis. **Critical Reviews in Microbiology**, [s. l.], v. 41, n. 2, p. 208–217, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.813904>

RABIN, R. L.; LEVINSON, A. I. The nexus between atopic disease and autoimmunity: A review of the epidemiological and mechanistic literature. **Clinical and Experimental Immunology**, [s. l.], v. 153, n. 1, p. 19–30, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2008.03679.x>

RATHOD, Sujit D.; BUFFLER, Patricia A. Highly-cited estimates of the cumulative incidence and recurrence of vulvovaginal candidiasis are inadequately documented. **BMC Women's Health**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 1–4, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1472-6874-14-43>

RAVEL, Jacques *et al.* Vaginal microbiome of reproductive-age women. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 108, n. SUPPL. 1, p. 4680–4687, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1002611107>

REID, Gregor. Has knowledge of the vaginal microbiome altered approaches to health and disease? [version 1; referees: 4 approved]. **F1000Research**, [s. l.], v. 7, n. 0, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.12688/f1000research.13706.1>

RENEMAN B *et al.* LETTERS TO THE EDITOR. **Acta Dermato-Venereologica**, [s. l.], v. 84, n. 5, p. 397–416, 2004. Disponível em:

<https://doi.org/10.1080/00015550410029260>

RIBEIRO, Sabrina M. *et al.* Antimicrobial and antibiofilm activities of *Casearia sylvestris* extracts from distinct Brazilian biomes against *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. **BMC complementary and alternative medicine**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 308, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2717-z>

RODRÍGUEZ-CERDEIRA, Carmen *et al.* Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Bio films and vulvovaginal candidiasis. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 174, n. November 2018, p. 110–125, 2019.

ROSTOK, M. *et al.* Potential vaginal probiotics: safety, tolerability and preliminary effectiveness. **Beneficial Microbes**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 385–393, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3920/BM2016.0123>

RUSSO, Rosario *et al.* Randomised clinical trial in women with Recurrent Vulvovaginal Candidiasis: Efficacy of probiotics and lactoferrin as maintenance treatment. **Mycoses**, [s. l.], p. 0–1, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/myc.12883>

SANGUINETTI, Maurizio; POSTERARO, Brunella; LASS-FLÖRL, Cornelia. Antifungal drug resistance among *Candida* species: Mechanisms and clinical impact. **Mycoses**, [s. l.], v. 58, n. S2, p. 2–13, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/myc.12330>

SCHERER, S.; STEVENS, D. A. Application of DNA typing methods to epidemiology and taxonomy of *Candida* species. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 675–679, 1987. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JCM.25.4.675-679.1987>

SOBEL, J. D. Current Concepts: Vaginitis. **The New England journal of medicine**, [s. l.], v. 337, n. 26, p. 1896–1903, 1997.

SOBEL, J. D. Pathogenesis and Epidemiology of Vulvovaginal Candidiasis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [s. l.], v. 544, n. 1, p. 547–557, 1988. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1988.tb40450.x>

SOBEL, J. D. Recurrent vulvovaginal candidiasis. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, [s. l.], v. 214, n. 1, p. 15–21, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2015.06.067>

SOBEL, J. D. *et al.* Vulvovaginal candidiasis: Epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, [s. l.], v. 178, n. 2, p. 203–211, 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0002-9378\(98\)80001-X](https://doi.org/10.1016/S0002-9378(98)80001-X)

SOBEL, J. D. Vulvovaginal candidosis. **Lancet**, [s. l.], v. 369, n. 9577, p. 1961–1971, 2007. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60917-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60917-9)

SOBEL, J.D.; SOBEL, R. Current treatment options for vulvovaginal candidiasis caused by azole-resistant *Candida* species. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 19,

n. 9, p. 971–977, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14656566.2018.1476490>

ŠPAČEK, Jiří *et al.* Clinical aspects and luteal phase assessment in patients with recurrent vulvovaginal candidiasis. **European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology**, [s. l.], v. 131, n. 2, p. 198–202, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2006.03.009>

SPINILLO, Arsenio *et al.* ScienceDirect.com - American Journal of Obstetrics and Gynecology - Prevalence of and risk factors for fungal vaginitis caused by non-albicans species. **Sciencedirect.Com**, [s. l.], 1995. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002937897800269%5Cnpapers3://publication/uuid/BBEDFF80-6DAD-4FB0-99B9-B516991324B9>

SPINILLO, Arsenio *et al.* The relationship of bacterial vaginosis, candida and trichomonas infection to symptomatic vaginitis in postmenopausal women attending a vaginitis clinic. **Maturitas**, [s. l.], v. 27, n. 3, p. 253–260, 1997. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0378-5122\(97\)00038-8](https://doi.org/10.1016/S0378-5122(97)00038-8)

SUDBERY, P. Growth of *Candida albicans* hyphae. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 9, n. 10, p. 737–748, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2636>

SUDBERY, P; GOW, N; BERMAN, J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. **Trends in Microbiology**, [s. l.], v. 12, n. 7, p. 317–324, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.05.008>

SUDHAN, Shashi S *et al.* Identification of *Candida* Species in the Clinical Laboratory: A Review of Conventional, Commercial and Molecular Techniques. **International Journal of Medical Research Professionals**, [s. l.], v. 2, n. 6, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.21276/ijmrp.2016.2.6.001>

TALAEI, Zahra *et al.* Recurrent vulvovaginal candidiasis: Could it be related to cell-mediated immunity defect in response to *Candida* antigen? **International Journal of Fertility and Sterility**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 134–141, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.22074/ijfs.2017.4883>

TANAKA, Koichi. The origin of macromolecule ionization by laser irradiation (Nobel lecture). **Angewandte Chemie - International Edition**, [s. l.], v. 42, n. 33, p. 3860–3870, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/anie.200300585>

TANG, Yuanting *et al.* The changes of antifungal susceptibilities caused by the phenotypic switching of *Candida* species in 229 patients with vulvovaginal candidiasis. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, [s. l.], v. 33, n. 1, p. 1–6, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcla.22644>

TELLAPRAGADA, Chaitanya *et al.* Antifungal Susceptibility Patterns, In Vitro Production of Virulence Factors, and Evaluation of Diagnostic Modalities for the Speciation of Pathogenic *Candida* from Blood Stream Infections and Vulvovaginal Candidiasis. **Journal of Pathogens**, [s. l.], v. 2014, p. 1–8, 2014. Disponível em:

<https://doi.org/10.1155/2014/142864>

UNEMO, Magnus *et al.* Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections, including human immunodeficiency virus. **World Health Organization**, [s. l.], p. 244, 2013.

VAN DER VEER, C. *et al.* Effects of an over-the-counter lactic-acid containing intravaginal douching product on the vaginal microbiota. **BMC Microbiology**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 1–13, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1545-0>

VERSTREPEN, Kevin J.; KLIS, Frans M. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 60, n. 1, p. 5–15, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05072.x>

VIDOTTO, Valerio *et al.* Adherence of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to buccal and vaginal cells. **Revista Iberoamericana de Micologia**, [s. l.], v. 20, n. 2, p. 52–54, 2003.

VIEIRA-BAPTISTA, Pedro; BORNSTEIN, Jacob. Candidiasis, Bacterial Vaginosis, Trichomoniasis and Other Vaginal Conditions Affecting the Vulva. *In*: VULVAR DISEASE. Cham: Springer International Publishing, 2019. p. 167–205. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-319-61621-6_24

WEISS, G. Adrienne; HENNET, Thierry. Mechanisms and consequences of intestinal dysbiosis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [s. l.], v. 74, n. 16, p. 2959–2977, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2509-x>

WHIBLEY, Natasha; GAFFEN, Sarah L. Beyond *Candida albicans*: Mechanisms of immunity to non-*albicans* *Candida* species. **Cytokine**, [s. l.], v. 76, n. 1, p. 42–52, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.07.025>

WIESER, Andreas *et al.* MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics—identification of microorganisms and beyond (mini review). **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 93, n. 3, p. 965–974, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3783-4>

WIJGERT, Janneke H. H. M. *et al.* The Vaginal Microbiota: What Have We Learned after a Decade of Molecular Characterization? **PLoS ONE**, [s. l.], v. 9, n. 8, p. e105998, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105998>

WILLINGER, B. *et al.* Performance of candida ID, a new chromogenic medium for presumptive identification of *Candida* species, in comparison to CHROMagar *Candida*. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 39, n. 10, p. 3793–3795, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JCM.39.10.3793-3795.2001>

WILLINGER, B.; HAASE, G. State-of-the-Art Procedures and Quality Management in Diagnostic Medical Mycology. **Current Fungal Infection Reports**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 260–272, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12281-013-0145-y>

WINSTANLEY, Trevor; COURVALIN, Patrice. Expert Systems in Clinical

Microbiology. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 24, n. 3, p. 515–556, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/CMR.00061-10>

WIRTH, Fernanda; GOLDANI, Luciano Z. Epidemiology of rhodotorula: An emerging pathogen. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, [s. l.], v. 2012, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2012/465717>

YANG, Shuhua *et al.* Clinical Significance and Characteristic Clinical Differences of Cytolytic Vaginosis in Recurrent Vulvovaginitis. **Gynecologic and Obstetric Investigation**, [s. l.], v. 82, n. 2, p. 137–143, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000446945>

YANO, Junko *et al.* Current patient perspectives of vulvovaginal candidiasis: Incidence, symptoms, management and post-treatment outcomes. **BMC Women's Health**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 1–9, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12905-019-0748-8>

ZENG, Xianling *et al.* Risk Factors of Vulvovaginal Candidiasis among Women of Reproductive Age in Xi'an: A Cross-Sectional Study. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2018, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2018/9703754>

ZHAO, Ying *et al.* Yeast identification by sequencing, biochemical kits, MALDI-TOF MS and rep-PCR DNA fingerprinting. **Medical Mycology**, [s. l.], v. 56, n. 7, p. 816–827, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/mmy/myx118>

ZIDA, A. *et al.* Substances naturelles actives sur *Candida albicans*, sources de nouveaux médicaments antifongiques : revue de la littérature. **Journal de Mycologie Médicale**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 1–19, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2016.10.002>

9- APÊNDICE

APENDICE 1- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA
Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília

Pesquisa: Identificação molecular das espécies decândida presentes em secreção vaginal de mulheres com vulvovaginite e identificação dos fatores de risco associados à infecção recorrente.

Pesquisadora: Livia Custódio ~~Pereira~~, Orientador: Prof. Dra Yanna Karla de Medeiros Nóbrega
Celular: (61) ~~xxxxxx~~ Fixo (61) ~~xxxxxxx~~ e-mail: ~~xxxxxxxxxxxxxxxxxx~~

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido:

Dados de identificação do sujeito da pesquisa:

Nome: Data de nascimento:/...../.....

Endereço:

Telefones de contato: ()

Fui convidada a participar de uma pesquisa que tem o objetivo de determinar se há presença de fungos na secreção vaginal e qual a espécie de fungo presente. Fui informada que podem haver fungos na vagina de mulheres sem nenhum sintoma, mas que em muitos casos as infecções fúngicas da vagina podem causar grande incômodo, mesmo não representando doença grave. Sendo assim, o conhecimento das espécies causadoras dessas infecções bem como o conhecimento dos fatores de risco é importante para prescrição de tratamento adequado nos casos de recorrência. A coleta do material para o exame será realizada por meio da introdução de um swab (cotonete da haste longa) na vagina, durante o exame ginecológico, não acarretando, portanto nenhum desconforto além do gerado pelo exame ginecológico convencional, ao qual preciso ser submetida em consulta independente da realização da pesquisa. O pesquisador me fará perguntas relevantes para identificar fatores relacionados à infecção. Serei informada sobre o resultado do exame e receberei assistência necessária, sem qualquer ônus, no ambulatório coordenado pela Dra Livia Custódio Pereira, nas tardes de segunda-feira do Hospital Universitário de Brasília. Serei convidada a repetir a coleta com 4,8 e 12 meses com a finalidade de observar a eliminação, surgimento ou a recorrência da infecção. Caso meu exame seja positivo para fungos e eu esteja com sintomas, receberei a prescrição do tratamento. Poderei solicitar consulta por telefone ou e-mail caso volte a ter sintomas, mesmo fora desses momentos de coleta programados. Fui ainda esclarecida que meu nome não será divulgado em nenhuma publicação ou relatório. Mesmo após a assinatura desse termo ficarei livre para abandonar a pesquisa a qualquer momento, também sem qualquer prejuízo, para a minha assistência. Dessa maneira, declaro que concordo voluntariamente em participar dessa pesquisa.

Brasília _____ de20....

Assinatura da paciente

Assinatura do médico responsável..... |

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina. Contato: 3307-2276/ 3307-2520.

APÊNDICE 2 – Questionário de Sintomas e Fatores de Risco

QUESTIONÁRIO

1- IDENTIFICAÇÃO

Nome:

idade:

Telefone:

Endereço:

Estado civil: casada ou união estável solteira ou viúva ou divorciada (sem novo companheiro em união estável)

2- Aspectos clínicos:

Peso: _____ Altura: _____ IMC: _____ Cintura: _____

SINTOMÁTICA ASSINTOMÁTICA

Quantos episódios de sintomas semelhantes nos últimos 12 meses? _____

Corrimento: sim não Prurido: sim não Ardência/queimação: sim não

Dor à penetração nas relações sexuais: sim não mal odor: sim não

Dor ao urinar sim não

Parceiro tem sintomas (em caso de paciente sintomática)? quais? : _____

Uso de creme vaginal nos últimos 30 dias: sim não Qual: _____

Uso de antifúngico via oral nos últimos 30 dias? sim não Qual: _____

Uso de antibiótico nos últimos 30 dias? sim não Qual: _____

3- Antecedentes e hábitos:

G _____ P _____ A _____ Método contraceptivo atual: _____

Quanto tempo com parceiro atual: _____ uso regular de preservativo : sim não

Quantos parceiros nos últimos 12 meses: _____ tabagista sim não Etilista? _____

Diagnóstico de diabetes : sim não insulina sim não hipoglicemiantes orais sim não

Intolerância à glicose ou pré diabetes : sim não

Usa ducha vaginal : sim não usa protetor diário de calcinha: sim não

hábito de lavar a roupa íntima no banheiro sim não

Roupa íntima de tecido sintético a maior parte do tempo (4 ou mais x/semana): sim não

Hábito de ingestão de leite e derivados: menos de 1 porção/dia 1 a 2 porções por dia 3 ou mais porções/dia

Hábito intestinal : normal (evacuações diárias fezes de consistência normal) constipado (dificuldade para evacuar, fezes endurecidas, sibalos) diarreia / evacuações frequentes com fezes amolecidas.

Portadora de alergia cutânea sim não Portadora de alergia respiratória sim não

Usa corticoide ou outro medicamento imunossupressor sim não

HIV + sim não . Última contagem de CD4 _____/_____/_____ resultado: _____

10. ANEXO

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA -
UNB



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo prospectivo com análise sequencial da colonização vaginal por candida em mulheres com ou sem vulvovaginite, visando identificação das espécies e o grau de sensibilidade a antifúngicos de uso rotineiro em clínica, por meio de cultura e método molecular

Pesquisador: Lívia Custódio Pereira

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 55615816.8.0000.5558

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília - UNB

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.572.449

Apresentação do Projeto:

Po meio de um estudo observacional longitudinal prospectivo pretende-se identificar as espécies de cândida que colonizam pacientes com diagnóstico clínico de vulvovaginite, e pacientes assintomáticas como grupo controle, buscando avaliar o perfil epidemiológico das pacientes com vulvovaginites por candida, e a prevalência de colonização em pacientes assintomáticas.

Objetivo da Pesquisa:

Caracterizar as espécies de Candida isoladas em pacientes com e sem vulvovaginites sintomáticas e determinar perfil epidemiológico dos casos recorrentes durante um ano de observação. E ainda, confirmar, por métodos moleculares, a identificação fenotípica das diferentes espécies de Candida isoladas de vulvovaginites; e Identificar fatores de risco associados às vulvovaginites fúngicas recorrentes..

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A metodologia a ser utilizada nesse projeto não oferece riscos às pacientes por se tratar de modo de coleta de material usual. Por se tratar de patologia bastante frequente a pesquisa poderá contribuir para um diagnóstico preciso possibilitando um tratamento adequado e principalmente a profilaxia das recidivas.

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3107-1918 **E-mail:** fmd@unb.br

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA -
UNB



Continuação do Parecer: 1.572.449

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto é relevante por tentar caracterizar espécies de Candida isoladas em mulheres com quadro clínico de vulvovaginite e avaliar colonização de mulheres assintomáticas, e ao tratar as sintomáticas pode-se determinar a incidência da recorrência da infecção durante o período de 12 meses

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O projeto encontra-se bem instruído com TCLE adequado, cronograma e critérios de inclusão e exclusão bem definidos. Os riscos também foram elencados.

Recomendações:

Considerando que o projeto encontra-se bem delineado e de acordo com a resolução CNS 466/12 o parecer é pela aprovação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Parecer pela aprovação do projeto, salvo melhor juízo do colegiado.

Considerações Finais a critério do CEP:

O projeto foi avaliado na Reunião Ordinária do CEP. O relator apresentou seu parecer, fez comentários e sugeriu a aprovação do projeto. Submetido a votação o Colegiado aprovou o projeto.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_654036.pdf	28/04/2016 20:09:48		Aceito
Outros	Carta_encaminhamento_280416.pdf	28/04/2016 20:09:29	Livia Custódio Pereira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_FM_280416.pdf	28/04/2016 20:09:10	Livia Custódio Pereira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_03_2016.docx	15/03/2016 11:56:11	Livia Custódio Pereira	Aceito
Outros	Lattes_Livia.pdf	15/03/2016 11:46:08	Livia Custódio Pereira	Aceito
Outros	Lattes_Pratesi.pdf	15/03/2016 11:44:56	Livia Custódio Pereira	Aceito
Outros	Termo_co_participante.pdf	15/03/2016	Livia Custódio	Aceito

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3107-1918 **E-mail:** fmd@unb.br

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA -
UNB



Continuação do Parecer: 1.572.449

Outros	Termo_co_participante.pdf	11:41:10	Pereira	Aceito
Outros	Termo_de_concordancia.pdf	15/03/2016 11:40:42	Livia Custódio Pereira	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_responsabilidade.pdf	15/03/2016 11:40:13	Livia Custódio Pereira	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_assinada.pdf	15/03/2016 11:38:04	Livia Custódio Pereira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BRASILIA, 02 de Junho de 2016

Assinado por:
Florêncio Figueiredo Cavalcanti Neto
(Coordenador)

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3107-1918 **E-mail:** fmd@unb.br