



Universidade Nova de Lisboa

Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**ETIOLOGIA DAS INFECÇÕES FÚNGICAS
VAGINAIS NA REGIÃO DE LUBANGO-HUÍLA E A
RESISTÊNCIA AOS FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS**

Esmeralda Clarisse Beth Sacato João

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS,
ESPECIALIDADE DE BIOLOGIA MOLECULAR**

OUTUBRO, 2013



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**ETIOLOGIA DAS INFECÇÕES FÚNGICAS
VAGINAIS NA REGIÃO DE LUBANGO-HUÍLA E A
RESISTÊNCIA AOS FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS**

Autora: Esmeralda Clarisse Beth Sacato João

Orientadora: Investigadora Doutora Maria da Luz Marques Martins

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas, especialidade de Biologia Molecular.

OUTUBRO, 2013

Apoio financeiro do Hospital Regional Dr. António Agostinho Neto da Huíla

Parte dos resultados discutidos nesta dissertação foram apresentados na seguinte comunicação:

João, E.C.B.S. (2013) Etiologia das infecções fúngicas vaginais da região de Lubango, Huila, e a sua resistência aos fármacos antifúngicos. 2º Congresso Nacional de Medicina Tropical, Lisboa, Portugal, 20 a 23 de Abril de 2013 [Comunicação em Poster]

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho com profunda emoção e imensa alegria às minhas queridas filhas **Joisse Yolanda Sacato João, Joseana Cristina Sacato João, Jassyane Beth Sacato João** pessoas inesquecíveis e incomparáveis pela paciência que tiveram em suportar a ausência da mãe, falta de amor, afecto e carinho durante o tempo da formação.



EPÍGRAFE:

*Era uma vez um Beija-Flor que fugia de um incêndio juntamente com todos os animais de uma floresta. Só que o Beija-Flor fazia uma coisa diferente: apanhava gotas de água de um lago e atirava-as para o fogo. Um outro animal, intrigado, perguntou: - “Beija-Flor, achas que vais apagar o incêndio com estas gotas?” – “Com certeza que não”, respondeu o Beija-Flor, “mas estou a fazer a minha parte”.
(Fábula do Beija-Flor)*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** pela sabedoria que me concedeu. Como as Escrituras Sagradas em Tiago capítulo 1: 5 Se algum de vós tem falta de sabedoria, peça-a a Deus, que a todos dá liberadamente.

À Professora Doutora **Maria da Luz Marques Martins**, orientadora deste trabalho, que admiro desde a minha entrada no Instituto, a quem agradeço por todo o apoio e interesse demonstrado na elaboração deste trabalho. Foi fundamental o seu entusiasmo desde o início, a disponibilidade, a paciência, o incentivo, a colaboração e a amizade sempre manifestadas, bem como nunca duvidar nas minhas capacidades para sua execução. Devo ainda o facto de pela primeira vez “sentir” que, a Micologia Médica e uma Biomédica poderão ser úteis à sociedade.

À Direcção do hospital Central Dr. António Agostinho Neto, pela oportunidade e confiança que depositaram em mim para frequentar este curso. Especialmente o **Dr. Henrique Chipenda, Dr. Martinho Angelina** e os colegas da Direcção Pedagógica.

À direcção da maternidade Irene Neto e as pacientes por me permitirem realizar este trabalho no estabelecimento em questão.

À direcção e aos técnicos da clínica Clinus especialmente o Dr. **António Hilario**.

À Direcção do laboratório de Microbiologia do Hospital Universitário de Santiago de Compostela, especialmente o Professor **Jose Llovo** pela dedicação no desenvolvimento da parte prática deste trabalho. Não esquecendo os funcionários deste laboratório pelo carinho e a vontade de ensinar sempre coisas novas a quem quer aprender.

Ana Paula Maduro pela dedicação, disponibilidade e cedência dos materiais utilizados no desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, especialmente os professores **Celso Cunha, João Piedade, Ricardo Parreira, Aida Esteves, Odete, Maria Luísa e Manuela Calado**.

Elsa Graciana E. Ndyanelao companheira de todas as horas e momentos cruciais desta caminhada obrigada pela amizade.

Zita D. L. da Silva filha e amiga que Deus colocou na minha vida, muito obrigada pelo carinho especial, paciência, disponibilidade e a compreensão nos momentos difíceis desta jornada.

Andreia Albuquerque, irmã obrigada pela amizade e pelo carinho.

Aos meus **amigos e colegas** do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, pela atenção e incentivo e a ajuda prestada.

A minha família:

Juliana Beth João Sacato (*in memoriam*), minha mãe, que incentivou-me sempre a ir para a escola desde muito cedo, grande carinho da minha vida;

Jonátas S. Sacato meu pai do coração, o maior exemplo de humanidade.

Maria José Silva a mãe que Deus me deu, obrigada pelo carinho, força em vencer as vicissitudes da vida.

Laurinda Nogueira tem sido uma mãe para as minhas filhas por suportar e cuidá-las durante a minha ausência muito obrigada.

Aos meus queridos irmãos **Edith, Elizabeth, Etna, Eusébio e Hélder**, pelo apoio, carinho e incentivo.

À irmã **Nani** e o **Pastor Paulo** e os outros irmãos em Cristo os meus reconhecimentos.

A todos os que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a concretização deste trabalho, e que não estão aqui referidos, **muito obrigado**.

RESUMO

A candidíase vulvovaginal é uma das infecções oportunistas mais comuns do tracto genital feminino. *Candida albicans* é o agente etiológico mais frequentemente isolado desta infecção, embora seja observado um aumento significativo da prevalência de infecções provocadas por outras espécies do género *Candida*. Mais recentemente a espécie *Candida africana* tem sido detectada em amostras biológicas desta origem a qual, vulgarmente, é identificada como sendo *C. albicans*. Esta pesquisa teve como objectivo principal a detecção e identificação rápida e específica de diferentes espécies de leveduras de interesse médico do género *Candida* presentes em amostras clínicas de exsudados vaginais e no estudo dos padrões de resistência aos fármacos antifúngicos. Foram estudadas 159 amostras de exsudados vaginais provenientes de doentes que acorreram às consultas de Ginecologia e Obstetrícia da Maternidade Irene Neto, Lubango, Huíla, Angola e somente 98 isolados clínicos foram estudados. O diagnóstico convencional de todos os isolados, permitiu a identificação de *C. albicans* pelo teste da Blastese. Os isolados clínicos que não filamentaram foram identificados por testes morfológicos, bioquímicos e moleculares. O meio Agar de Eosina e Azul Metileno utilizando a técnica de Dalmau permitiu a identificação a partir das estruturas micromorfológicas das leveduras. A identificação molecular por PCR Multiplex e por RFLP da região ITS do rDNA permitiu a identificação dos isolados de *C. albicans* que não filamentaram. Para a diferenciação de *C. africana* em relação aos isolados clínicos *C. albicans*, foi utilizado um método molecular baseado em PCR. Nesta pesquisa, a partir dos exsudados vaginais recolhidos de pacientes observadas nas consultas da Maternidade Irene Neto, Lubango, Huíla em Angola foram identificadas as espécies *C. albicans*, *C. africana*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, *C. lipolytica*, *C. pelliculosa*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Trichosporon asahii*. Foi estudada a sensibilidade *in vitro* de todos os isolados clínicos aos antifúngicos fluconazol, voriconazol, caspofungina e posaconazol pelo método de Kirby-Bauer de acordo com a norma M44-A do CLSI. A aplicação de métodos moleculares no diagnóstico de candidíase vulvovaginal revelou ser mais sensível e específica, e apresentou resultados mais rigorosos que a convencional, para além de permitir a detecção da nova espécie *C. africana*. A aplicação da metodologia de difusão a partir de disco a todos os isolados clínicos africanos demonstrou a existência de uma elevada susceptibilidade aos antifúngicos estudados.

Palavras-chaves: Candidíase Vulvovaginal, Identificação molecular, Antifúngicos

ABSTRACT

Vulvovaginal candidiasis is one of the most common opportunistic infections of the female genital tract. *Candida albicans* is the etiologic agent predominantly isolated, although a significant increase in the prevalence of infections caused by other species of *Candida* is observed. More recently, the species *C. africana* has been detected in biological samples from this origin which, commonly, is identified as *C. albicans* by conventional methods. The main goal of this research was the specific detection of different yeast species of the genus *Candida* isolated from vaginal samples from Gynecology and Obstetrics patients of Maternity Irene Neto, Lubango, Huíla, Angola and the study of resistance patterns to antifungal drugs. Were studied 159 samples of vaginal swabs and were isolated 98 clinical isolates for the study. Conventional diagnosis of all isolates included *C. albicans* identification by Blastesis test. Non filamentous isolates were identified by micro morphology in agar medium with eosin and methylene blue, and biochemical and molecular methodologies. Molecular identification by multiplex PCR and RFLP analysis of the rDNA ITS region allowed the identification of the isolates of most common *Candida* species. For differentiation between *C. africana* and *C. albicans* it was used a molecular method based on PCR. In this research, from the vaginal swabs collected from patients of Maternity Irene Neto, Lubango, Huila in Angola were identified the species *C. albicans*, *C. africana*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, *C. lipolytica*, *C. pelliculosa*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Trichosporon asahii*. The in vitro studies for the sensitivity study of all clinical isolates to fluconazole, voriconazole, posaconazole, and caspofungin were done by the Kirby-Bauer method according to CLSI standard M44-A. The use of molecular methods for the diagnosis of vulvovaginal candidiasis has proved to be more specific, sensitive, and provided higher accuracy than the conventional techniques. The application of disk diffusion methodology in African clinical isolates showed the existence of a high susceptibility to the antifungal agents tested.

Keywords: Vulvovaginal Candidiasis, Molecular Identification, Antifungal Agents

ÍNDICE DOS MATÉRIAS

DEDICATÓRIA	i
AGRADECIMENTOS	ii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
1 INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 IMPORTÂNCIA DOS FUNGOS NA SAÚDE HUMANA	1
1.1.1 Aspectos Gerais	1
1.1.2 Características gerais dos fungos	2
1.1.3 As infecções fúngicas humanas	3
1.2 AS INFECÇÕES POR <i>Candida</i> spp.	5
1.2.1 História e considerações gerais das leveduras do género <i>Candida</i>	5
1.2.2 Classificação taxonómica do género <i>Candida</i>	6
1.2.3 Os tipos de infecção por <i>Candida</i> sp.	6
1.2.4 Morfologia das leveduras do género <i>Candida</i>	7
1.3 A CANDIDÍASE VULVOVAGINAL	8
1.3.1 Factores predisponentes da candidíase vulvovaginal	9
1.3.2 A etiologia da candidíase vulvovaginal (CVV)	11
1.3.3 Patogénese da candidíase vulvovaginal	12
1.3.4 Manifestações clínicas da candidíase vulvovaginal	14
1.4 O DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS INFECÇÕES POR <i>Candida</i> sp.	15
1.4.1 Observação morfológica de <i>Candida</i> sp.	16
1.4.2 Identificação bioquímica de <i>Candida</i> sp.	17

1.4.3	Identificação mediante critérios imunológicos	19
1.4.4	Identificação molecular de <i>Candida</i> sp.	19
1.5	O TRATAMENTO DAS INFECÇÕES FÚNGICAS	21
1.5.1	Mecanismos de resistência aos agentes antifúngicos	23
1.5.2	Determinação da susceptibilidade <i>in vitro</i> aos antifúngicos	25
1.6	O HOSPITAL MATERNIDADE IRENE NETO, HUÍLA, ANGOLA	27
1.7	OBJECTIVOS DO TRABALHO E PLANO DA DISSERTAÇÃO	28
2	MATERIAIS E MÉTODOS	30
2.1	ORIGEM DAS ESTIRPES ESTUDADAS	30
2.1.1	Local e caracterização do estudo	30
2.1.2	Aspectos Éticos	30
2.1.3	População estudada	30
2.2	COLHEITA DAS AMOSTRAS E ISOLAMENTO DAS LEVEDURAS	31
2.2.1	Recolha e transporte das amostras	31
2.2.2	Processamento laboratorial das amostras e obtenção dos isolados	32
2.2.3	Manutenção e conservação dos isolados clínicos	32
2.3	MÉTODOS CONVENCIONAIS DE IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS ISOLADAS	33
2.3.1	Observação directa das amostras clínicas	33
2.3.2	Isolamento em cultura e caracterização morfológica das leveduras	34
2.3.3	Prova do tubo germinativo ou Teste da Blastese	34
2.3.4	Identificação bioquímica das leveduras	35
2.4	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS LEVEDURAS ISOLADAS	38
2.4.1	Identificação de espécies do género <i>Candida</i> por PCR multiplex	38

2.4.2	Identificação de espécies mais comuns do género <i>Candida</i> por RFLP da região ITS do rDNA	41
2.4.3	Detecção da espécie <i>Candida africana</i>	46
2.5	ESTUDO DA SENSIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS PELO MÉTODO DE KIRBY-BAUER	48
2.5.1	Preparação do Inóculo da levedura	48
2.5.2	Inoculação das placas	48
2.5.3	Aplicação dos discos de antifúngico	49
2.5.4	Interpretação dos resultados	49
2.5.5	Controle de qualidade	50
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
3.1	ORIGEM DAS ESTIRPES	52
3.2	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL CONVENCIONAL DA CANDIDÍASE VULVOVAGINAL	59
3.2.1	Exame directo das amostras de exsudado vaginal	59
3.2.2	Isolamento de <i>Candida</i> sp.	62
3.2.3	Teste da Blastese para identificação de <i>C. albicans</i>	62
3.2.4	Identificação em Agar de Eosina e Azul-de-metileno (EMB)	65
3.2.5	Identificação bioquímica – Galerias ID 32C®	72
3.3	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS LEVEDURAS DO GÉNERO <i>Candida</i>	74
3.3.1	Identificação das espécies de <i>Candida</i> mais prevalentes por PCR Multiplex	74
3.3.2	Identificação das espécies de <i>Candida</i> mais prevalentes por PCR-RFLP da região ITS do rDNA	77
3.3.3	Prevalência das espécies isoladas	79
3.3.4	Ocorrência de <i>Candida africana</i>	82

3.4	COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS NA IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS CLÍNICOS	85
3.5	TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS	86
3.5.1	Susceptibilidade ao fluconazol	88
3.5.2	Susceptibilidade ao voriconazol	89
3.5.3	Susceptibilidade à posaconazol	91
3.5.4	Susceptibilidade à caspofungina	92
3.5.5	Comparação dos perfis de susceptibilidade aos antifúngicos	94
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	96
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
6	ANEXOS	106

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1	Células de <i>Candida</i> sp. em gemulação	7
Figura 1.2	Mecanismo de acção dos antifúngicos na célula humana	23
Figura 1.3	Princípio do teste de susceptibilidade pela metodologia de difusão em disco	25
Figura 1.4	Localização geográfica da província de Huíla	27
Figura 2.1	Meios de transporte de amostras biológicas (<i>Sterile Transport Medium Swabs</i>)	31
Figura 2.2	Preparação do exame directo	33
Figura 2.3	Galeria de identificação ID 32C®	36
Figura 2.4	Esquema representativo da organização dos genes ribossómicos e dos <i>primers</i> universais e específicos utilizados na reacção da multiplex-PCR	38
Figura 2.5	Esquema representativo das bandas esperadas depois da amplificação por PCR multiplex	40
Figura 2.6	Representação esquemática do modo de inoculação das placas para a realização dos testes de susceptibilidade por difusão a partir de disco	49
Figura 3.1	Relação entre os factores de risco e positividade das culturas para candidíase vulvovaginal	53
Figura 3.2	Percentagens das pacientes em relação à terapêutica no momento da colheita	55
Figura 3.3	Percentagens dos sinais e sintomas de candidíase vulvovaginal mais predominantes apresentados pelas pacientes observadas	57
Figura 3.4	Percentagem dos casos de candidíase recorrente	58
Figura 3.5	Observação microscópica directa de exsudados vaginais. A- células leveduriformes em gemulação, B- pseudohifas de <i>Candida</i> sp.	60
Figura 3.6	Percentagem das diferentes morfologias de <i>Candida</i> sp.	60
Figura 3.7	Percentagem de isolados de <i>C. albicans</i> identificados pelo teste da Blastese	63

Figura 3.8	Observação microscópica de um Teste da Blastese positivo com células de <i>C. albicans</i> formando tubos germinativos	63
Figura 3.9	Aspecto microscópico de uma cultura de <i>C. parapsilosis</i> crescida em meio de EMB com Tween 80, após 72 horas de incubação (x400)	66
Figura 3.10	Aspecto microscópico de uma cultura de <i>C. glabrata</i> crescida em meio de EMB com Tween 80, após 72 horas de incubação (x400)	66
Figura 3.11	Aspecto microscópico de uma cultura de <i>C. tropicalis</i> crescida em meio de EMB com Tween 80, após 72 horas de incubação (x400)	67
Figura 3.12	Aspecto microscópico de uma cultura de <i>C. krusei</i> crescida em meio de EMB com Tween 80, após 72 horas de incubação (x400)	68
Figura 3.13	Aspecto microscópico de uma cultura de <i>C. catenulata</i> crescida em meio de EMB com Tween 80, após 72 horas de incubação (x400)	69
Figura 3.14	Aspecto microscópico de uma cultura de <i>C. lipolytica</i> crescida em meio de EMB com Tween 80, após 72 horas de incubação (x400)	69
Figura 3.15	Aspecto microscópico de uma cultura de <i>C. pelliculosa</i> crescida em meio de EMB com Tween 80, após 72 horas de incubação (x400)	70
Figura 3.16	Aspecto microscópico de uma cultura de <i>S. cerevisiae</i> crescida em meio de EMB com Tween 80, após 72 horas de incubação (x400)	70
Figura 3.17	Aspecto microscópico de uma cultura de <i>Trichosporon asahii</i> crescida em meio de EMB com Tween 80, após 72 horas de incubação (x400)	71
Figura 3.18	Galeria API ID 32C [®] com o resultado obtido com o isolado clínico nº 127, <i>C. pelliculosa</i> .	72
Figura 3.19	Percentagens da qualidade das identificações obtidas com o teste ID 32C [®]	73
Figura 3.20	Percentagens das identificações realizadas por PCR multiplex	75

Figura 3.21	Gel de electroforese para identificação de <i>Candida</i> sp. por PCR multiplex a partir de culturas puras de levedura. <i>C. albicans</i>	77
Figura 3.22	Percentagens dos resultados obtidos com o método de PCR-RFLP com os isolados clínicos não identificados pelo Teste da Blastese e por PCR multiplex	78
Figura 3.23	Percentagens das diferentes espécies de <i>Candida</i> isoladas de exsudados vaginais de pacientes do Hospital Maternidade Irene Neto, Huíla, Angola	80
Figura 3.24	Percentagens obtidas com a diferenciação de <i>C. africana</i> e <i>C. albicans</i> após amplificação do gene <i>HWP1</i>	83
Figura 3.25	Padrão de bandas dos perfis electroforéticos obtidos por PCR resultantes da amplificação do gene <i>HWP1</i> . <i>C. albicans</i> isolados 3 e 9. <i>C. africana</i> isolados 131 e 141. M, marcador de pesos moleculares Gene Ruler DNA 100 pb [®]	83
Figura 3.26	Exemplo dos resultados do teste de sensibilidade pelo método de Kirby-Bauer. A, isolado sensível. B, isolado resistente	87

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1	Importância dos fungos em sectores da actividade humana	1
Tabela 1.2	Factores predisponentes do hospedeiro	10
Tabela 1.3	Factores de virulência das leveduras do género <i>Candida</i>	12
Tabela 1.4	Características da candidíase vulvovaginal	13
Tabela 1.5	Espécies de <i>Candida</i> mais frequentemente responsáveis por infecções de CVV	14
Tabela 2.1	Interpretação da qualidade das identificações pelo sistema ID 32 C®	37
Tabela 2.2	Concentração de cada <i>primer</i> utilizado na reacção de PCR multiplex	39
Tabela 2.3	Mistura reaccional usada nas reacções de PCR multiplex para a identificação de isolados clínicos do género <i>Candida</i>	39
Tabela 2.4	<i>Primers</i> específicos para cada espécie e dimensão dos fragmentos esperados após o PCR multiplex	40
Tabela 2.5	Sequência oligonucleotídica dos <i>primers</i> ITS1 e ITS4	42
Tabela 2.6	Mistura reaccional da reacção de PCR para a amplificação da região ITS dos isolados clínicos de <i>Candida</i> sp.	42
Tabela 2.7	Programa de PCR utilizado na amplificação da região ITS do rDNA dos isolados clínicos de leveduras do género <i>Candida</i>	43
Tabela 2.8	Composição de um gel de agarose de 50 ml para visualização dos produtos de amplificação da região ITS dos isolados clínicos de leveduras do género <i>Candida</i>	43
Tabela 2.9	Dimensão dos fragmentos esperados após amplificação da região ITS do rDNA com os <i>primers</i> ITS1 e ITS4 e restrição com a enzima <i>MspI</i> .	44
Tabela 2.10	Sequência e região de corte identificada pela enzima de restrição <i>MspI</i>	44
Tabela 2.11	Mistura reaccional utilizada em cada reacção de restrição com a enzima <i>MspI</i> para a identificação de isolados clínicos do género <i>Candida</i>	45
Tabela 2.12	Composição do gel de agarose para visualização dos produtos de restrição com a enzima <i>MspI</i> para a identificação de isolados clínicos do género <i>Candida</i>	45

Tabela 2.13	Sequência oligonucleotídica dos <i>primers</i> CR-f e CR-r para diferenciação da espécie <i>C. africana</i> de <i>C. albicans</i> por PCR	46
Tabela 2.14	Mistura reaccional usada nas reacções de PCR para amplificação do gene <i>HWP1</i> dos isolados clínicos de leveduras da espécie <i>C. albicans</i>	47
Tabela 2.15	Diâmetros dos halos de inibição para a classificação da susceptibilidade aos antifúngicos de acordo com o CLSI	50
Tabela 2.16	Intervalo dos diâmetros dos halos de inibição recomendados para as estirpes de referência utilizadas no controlo de qualidade <i>C. albicans</i> ATCC 90028 e <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	56
Tabela 3.1	Percentagem dos perfis de susceptibilidade obtidos para o antifúngico fluconazol	88
Tabela 3.2	Percentagem dos perfis de susceptibilidade obtidos para o antifúngico voriconazol	90
Tabela 3.3	Percentagem dos perfis de susceptibilidade obtidos para o antifúngico posaconazol	92
Tabela 3.4	Percentagem dos perfis de susceptibilidade obtidos para o antifúngico caspofungina	93
Tabela 1A4	Observação em exame directo das amostras clínicas de exsudados vaginais de pacientes do Hospital Maternidade Irene Neto, Huíla, Angola e isolamento das leveduras em cultura	110
Tabela 2A5	Morfologia macroscópica e microscópica dos isolados clínicos provenientes dos exsudados vaginais de pacientes observadas no Hospital Maternidade Irene Neto, Huíla, Angola	118
Tabela 3A6	Identificação laboratorial dos isolados clínicos por métodos convencionais (Teste da Blastese e API ID 32C®) e métodos moleculares (PCR multiplex e RFLP da região ITS do rDNA)	124
Tabela 4A7	Resultados obtidos com o teste de susceptibilidade aos antifúngicos pelo método de Kirby-Bauer (CLSI, norma M44-A) com todos os isolados clínicos incluídos neste trabalho	128

ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Collection
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMI	Concentração Mínima Inibitória
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleótido-trifosfato
EMB	Eosina e azul-de-metileno
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetracético
EUCAST	The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer Regions</i>
KOH	Hidróxido de Potássio
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
NaCl	Cloreto de Sódio
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
Pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDA	Potato Dextrose Agar
PFGE	Electroforese em campo pulsado
R	Resistente
RNA	Ácido Ribonucleico
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphisms</i>
S	Sensível
SDD	Sensível Dependente da Dose
SIDA	Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
sp.	Espécie
TBE	Tampão Tris, Ácido Bórico e EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
UV	Luz Ultravioleta
VIH	Vírus da Imunodeficiência Humana

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 IMPORTÂNCIA DOS FUNGOS NA SAÚDE HUMANA

Os fungos representam um grupo muito diversificado de organismos, cujo principal propósito na natureza é o de degradar a matéria orgânica. Durante muito tempo, os fungos foram considerados como vegetais e, somente a partir de 1969, passaram a ser classificados num reino à parte, o Reino Fungi. Apresentam um conjunto de características próprias que permitem diferenciá-los das plantas: não sintetizam clorofila, não têm celulose na sua parede celular (excepto alguns fungos aquáticos) e não armazenam amido como substância de reserva (Oliveira, 2012).

1.1.1 Aspectos Gerais

Os fungos são ubíquos na natureza e suscitam problemas de importância diversa em variados sectores da actividade humana. Por este motivo, o estudo dos fungos, e nomeadamente das leveduras, desdobrou-se em múltiplas especialidades com reflexos em vários ramos de actividade, nomeadamente na indústria alimentar, na medicina humana e veterinária e na produção agrícola (Tabela 1.1).

Tabela 1.1: Importância dos fungos em sectores da actividade humana (Fukuda, 2009).

Ramos / Sector	Vantagens	Desvantagens
Indústria alimentar	Lacticínios, bebidas alcoólicas iogurtes, pão, devido em grande parte às propriedades fermentativas das leveduras	Destruição dos alimentos por bolores
Medicina humana e veterinária	No sector da indústria quimio-farmacêutica, produção de vários produtos, como p. ex. os antibióticos para utilização na prática médica e veterinária	Aumento da frequência de infecções causadas por fungos saprófitas oportunistas. As espécies do género <i>Candida</i> , que fazem parte da flora microbiana comensal de indivíduos saudáveis, passam a oportunistas se a imunidade ficar comprometida, invadindo os tecidos e causando doença.
Agricultura	Controle biológico de pragas principalmente de insectos e nemátodos	Contaminação das forragens e cereais armazenados em silos, celeiros e depósitos por fungos produtores de toxinas.

1.1.2 Características gerais dos fungos

Os fungos são seres vivos eucariotas, podendo ser unicelulares ou multicelulares. Reproduzem-se, sexuada ou assexuadamente, através da formação de esporos. Os esporos assexuados dão origem às formas anamórficas enquanto os esporos sexuados produzem formas teleomórficas. A reprodução assexuada nos fungos é a mais comum e a que tem interesse clínico (Murray *et al.* 2009). As leveduras reproduzem-se, na sua maioria, assexuadamente por gemulação embora raras espécies o façam por fissão binária (Murray *et al.* 2009; Gomes *et al.* 2011).

Alguns fungos, como muitas espécies do género *Candida*, apresentam dimorfismo, ou seja, em certas condições ambientais exibem formas de crescimento unicelular e em outras, desenvolvem filamentos. Esta mudança de forma depende de factores como a concentração de CO₂, de nutrientes, o pH do substrato em que crescem e a virulência da estirpe (Gomes *et al.* 2011; Oliveira, 2012).

Os fungos são eucariotas, muitas vezes polinucleados, embora as leveduras sejam geralmente uninucleadas. O citoplasma contém mitocôndrias, vacúolos, vesículas, microtúbulos, ribossomas, retículo endoplasmático rugoso e cristais de glicogénio (Martins, 2010). A membrana celular contém ergosterol e a parede celular é uma estrutura rígida, essencial para a sobrevivência dos fungos (Fukuda, 2009). A presença de polímeros de quitina na parede celular e a capacidade das células depositarem glicogénio como produto de reserva, reflecte a proximidade filogenética com as células animais (Surber *et al.* 2011; Santos *et al.* 2012).

A composição química da parede celular é constituída principalmente por polissacarídeos, ligados ou não a proteínas ou lípidos, polifosfatos e iões inorgânicos formando uma matriz de fixação. Os compostos mais frequentes da parede celular são, para além da quitina, proteínas, glucanos e galactomananos (Fukuda, 2009).

Sob o ponto de vista metabólico os fungos são quimio-heterotróficos, pois têm de absorver componentes orgânicos como fonte de energia. Na grande maioria são aeróbios embora alguns sejam anaeróbios e anaeróbios facultativos.

Os fungos podem existir como saprófitas (organismos que vivem sobre o material orgânico em decomposição), simbiontes (organismos que vivem juntos e para os quais a associação traz vantagens mútuas), comensais (organismos que vivem em íntima relação na qual um beneficia com a relação, e o outro não obtém benefícios mas

também não é prejudicado) ou parasitas (organismos que vivem à superfície ou no interior dos tecidos de um hospedeiro do qual obtêm benefícios sem oferecer qualquer contribuição em retorno, ou mesmo prejudicando-o). É neste último contexto que as leveduras, como responsáveis por infecções, apresentam interesse médico (Murray *et al.* 2009).

1.1.3 As infecções fúngicas humanas

De acordo com o parasitismo tecidual as infecções fúngicas podem ser classificadas em três grandes categorias: micoses superficiais e cutâneas, micoses subcutâneas e micoses sistêmicas ou profundas.

As micoses superficiais são infecções limitadas às camadas superficiais da pele e das membranas mucosas. Não são invasivas e têm apenas importância estética. A infecção mais comum é a pitiríase versicolor que é causada pelo fungo dimórfico *Malassezia furfur* (Murray *et al.* 2009). As micoses cutâneas são infecções sintomáticas, que envolvem as camadas mais profundas da epiderme e os seus apêndices, tais como a pele, pêlos e unhas. As mais comuns são as infecções cutâneas e das mucosas, causadas por *Candida* sp., e as dermatofitoses, causadas por fungos dermatófitos dos gêneros *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton* (Madhavan *et al.* 2011; Oliveira, 2012).

As micoses subcutâneas envolvem as camadas mais profundas da pele, incluindo tecidos conjuntivos e músculos. Os fungos atingem os tecidos mais profundos através de inoculação traumática, levando à formação de abscessos, úlceras que não cicatrizam e fistulas que drenam material seropurulento. Após a invasão, os fungos permanecem localizados nestas regiões do organismo e raramente se disseminam para os órgãos internos. As principais micoses subcutâneas são os micetomas, a esporotricose e a cromoblastomicose (Murray *et al.* 2009).

As micoses sistêmicas ocorrem em certas regiões limitadas do globo e, em geral, são causadas por fungos autóctones dessas zonas. Em geral iniciam-se após a inalação dos esporos de fungo e, entre as mais frequentes, temos a histoplasmose, a blastomicose, a esporotricose, a coccidioidomicose e a paracoccidioidomicose (Brooks *et al.* 2010; Giolo & Svidzinski, 2010)

Além das categorias acima referidas, existem ainda as micoses oportunistas que podem ser superficiais ou sistêmicas e são um grande flagelo para os pacientes

imunocomprometidos. Fungos saprófitas do meio ambiente ou fungos comensais do nosso organismo podem tornar-se oportunistas e causar doença, em qualquer momento, se houver imunocomprometimento. Os fungos patogênicos oportunistas mais comuns são as leveduras do género *Candida* e *Cryptococcus* e os fungos filamentosos do género *Aspergillus* e *Pneumocystis jiroveci* (Murray *et al.* 2009).

O uso excessivo de antibióticos, agentes imunossupressores, citotoxinas, esteroides e irradiações podem também facilitar a proliferação destes fungos. Os pacientes que não possuam uma flora equilibrada e uma eficaz resistência imunitária podem desenvolver micoses oportunistas mais facilmente, sendo *C. albicans* o agente etiológico mais comum. A candidíase vulvovaginal é comum nos pacientes com SIDA, indivíduos mal nutridos e pacientes imunodeprimidos (Giolo & Svidzinski, 2010; Madhavan *et al.* 2011).

As micoses estão incluídas entre as doenças infecciosas mais ubíquas que afligem a humanidade. As infecções fúngicas afligem todos os estratos sociais e todos os grupos etários. Estas micoses constituem um sério problema de saúde pública nas regiões subdesenvolvidas e um assunto preocupante nos países desenvolvidos (Giolo & Svidzinski, 2010). Apesar de serem frequentemente subestimadas constituem um grande desafio a todos os que trabalham na sua prevenção e controle (Martins, 2010). Este desafio está relacionado não só com o crescente aumento do número de doentes imunocomprometidos, a expansão dos mecanismos de resistência dos microrganismos aos antifúngicos, o uso prolongado de antibióticos de largo espectro (Achkar & Friest, 2010) como também com a rapidez da obtenção de um diagnóstico precoce e específico da maioria das micoses. Portanto, no tratamento e controlo destas infecções, é fundamental o início precoce de uma terapêutica antifúngica que seja eficaz (Giolo & Svidzinski, 2010). Paralelamente, os clínicos devem estar ainda sensibilizados para o mimetismo de sinais e sintomas em relação a outras infecções microbianas, como as causadas por bactérias que, produzindo sinais e sintomas semelhantes, conduzem a terapêuticas desajustadas.

Para agravar este problema, nestas últimas décadas tem sido testemunhado um recrudescimento das infecções nosocomiais e infecções oportunistas em doentes imunodeprimidos, devido não só o aumento do número de doenças crónicas, como também a práticas terapêuticas modernas (Martins, 2010).

Os agentes etiológicos destes dois tipos de micoses emergentes são muitas vezes novas espécies de fungos filamentosos ou de leveduras que até agora eram considerados não patogênicos, para os quais os procedimentos laboratoriais para o seu diagnóstico são desconhecidos da maioria dos laboratórios de diagnóstico microbiológico (Martins, 2010).

O conjunto de antifúngicos comercialmente disponíveis é ainda mais restrito que os antibacterianos e, por isso, a sua indicação deve ser criteriosa, no sentido de evitar o surgimento de microrganismos resistentes, o que muitas vezes acaba por dificultar a recuperação do paciente, aumentando os custos de hospitalização. Actualmente verificase, por todo o mundo, um aumento do número de leveduras resistentes aos antifúngicos mais utilizados, tornando cada vez mais importante a utilização de métodos laboratoriais que permitem a avaliação da sensibilidade/resistência *in vitro* dos isolados a fim de auxiliar o médico na escolha da melhor terapêutica (Giolo & Svidzinski, 2010).

1.2 AS INFECÇÕES POR *Candida* spp.

1.2.1 História e considerações gerais das leveduras do género *Candida*

Os fungos patogênicos, especialmente algumas espécies de *Candida*, têm emergido como importantes agentes oportunistas, causando infecções denominadas de candidoses ou candidíases (Nascimento, 2009). Estas são das infecções fúngicas humanas mais frequentes e apresentam um espectro clínico muito variado (Quan, 2010). Historicamente, a candidíase oral foi a primeira forma clínica descrita de patologias causadas por *Candida* sp. Hipócrates em “Epidemics”, em 337 a.C. relatou lesões orais em pacientes debilitados provavelmente provocadas por estas leveduras (Costa & Candido, 2007; Amadio, 2010;) De acordo com Sidrim & Rocha (2004) foi Langenbeck que pela primeira vez em 1839 descreveu as leveduras do género *Candida* como sendo agentes patogênicos. Foi observado e isolado da cavidade oral de um paciente com aftas, o microrganismo que actualmente é considerado um dos causadores de candidíase, a mais importante levedura patogénica do homem, a espécie *Candida albicans* (Giolo & Svidzinski 2010; Madhavan *et al.* 2011; Oliveira, 2012). Inicialmente, em 1853, foi denominada *Oidium albicans* por Charles Robin, sendo redenominada por Zopf em 1890 para *Monilia albicans*. Somente em 1923, Berkhout

agrupou esta espécie do género *Candida* e apelidou a espécie de *Candida albicans* (Paróla, 2010; Oliveira, 2012).

Existem várias espécies de *Candida* patogénicas para o ser humano. Apesar de *C. albicans* ser considerada o agente etiológico mais frequente da candidíase, tem-se observado um aumento significativo da prevalência de infecções provocadas por outras espécies deste género (Kennedy & Sobel 2010). Em meados de 1963, eram consideradas de interesse clínico cinco espécies deste género: *C. albicans*, *C. stellatoidea* (hoje considerada *C. albicans*), *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii* (Barbedo & Sgarbi, 2010). Actualmente são conhecidas cerca de 200 espécies de leveduras do género *Candida*, sendo de interesse médico: *Candida albicans*, o complexo *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. guilliermondii*, *C. dubliniensis*, *C. lipolytica*, *C. lusitaniae*, *C. kefyr*, *C. famata*, *C. inconspicua*, *C. lambica*, entre outras espécies mais ocasionais (Kennedy & Sobel, 2010; Barbedo & Sgarbi, 2010).

1.2.2 Classificação taxonómica do género *Candida*

A classificação clássica dos fungos baseia-se na sua morfologia e no modo de produção de esporos. Entretanto, os aspectos ultraestruturais, bioquímicos, e as características moleculares têm sido aplicados de forma crescente, resultando frequentemente em alterações na designação taxonómica original. Na micologia clássica as leveduras, bem como os outros fungos, são classificados com base na fase sexuada do seu ciclo de vida (Murray *et al.* 2009; Giolo & Svidzinski, 2010). O tipo específico de esporulação resultante da reprodução sexuada produzida por um fungo em particular determina a sua classificação (Treagan, 2011). Presentemente, e segundo Barbedo & Sgarbi (2010) as leveduras do género *Candida* são classificadas taxonomicamente da seguinte forma: Reino *Fungi*, Filo *Ascomycota*, Subfilo *Ascomycotina*, Classe *Ascomycetes*, Ordem *Saccharomycetales*, Família *Candidaceae*, Género *Candida*.

1.2.3 Os tipos de infecção por *Candida* sp.

As leveduras do género *Candida* podem causar infecções simples, agudas ou crónicas, superficiais ou profundas e de espectro clínico bem variável (Barbedo &

Sgarbi, 2010; Fournier *et al.* 2011). As formas clínicas podem ser divididas em mucocutâneas, cutâneas, sistêmicas e alérgicas.

Na candidíase mucocutânea, os tecidos mais atingidos são os dos órgãos genitais e o tracto digestivo. Na candidíase cutânea, os locais mais frequentes de infecção são as virilhas, axilas e dobras da pele em geral, espaços interdigitais das mãos e dos pés e unhas. Quanto à candidíase sistêmica, a infecção pode atingir diversos órgãos, causando, por exemplo, candidíase pulmonar, candidemia, endocardite, nefrite entre outras. Na candidíase alérgica, o paciente pode desenvolver uma hipersensibilidade semelhante a uma alergia (Achkar & Fries 2010; Barbedo & Sgarbi, 2010) que se caracteriza por diversos quadros onde se observam lesões cutâneas do tipo vesiculosas ou bolhosas a lesões eczematosas (Oliveira, 2012).

1.2.4 Morfologia das leveduras do género *Candida*

As diferentes espécies de *Candida*, e principalmente *C. albicans*, podem apresentar diferentes aspectos, entre eles, a capacidade de apresentar distintas morfologias tanto *in vivo*, como *in vitro*. *C. albicans* é uma levedura diplóide com história de dimorfismo fúngico. Normalmente os fungos dimórficos encontram-se na natureza na fase miceliana e provocam infecção no ser humano na fase leveduriforme, porém *C. albicans* comporta-se de modo contrário (Barbedo & Sgarbi, 2010).

A fase leveduriforme é unicelular. Nesta fase a levedura pode produzir gémulas (Figura 1.1), mas também pode formar pseudohifas e verdadeiras hifas. A mudança na morfologia da forma leveduriforme para forma filamentosa pode ser induzida por diferentes condições ambientais, como variação de temperatura, nutrientes e de pH (Barbedo & Sgarbi, 2010).

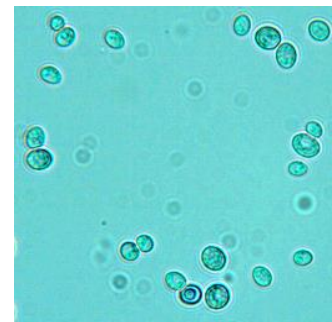


Figura 1.1: Células de *Candida* sp. em gemulação.

As leveduras *Candida* spp., excepto *C. glabrata*, produzem blastoconídios que se alongam e se mantêm ligados, originando uma estrutura de uma forma linear, sem separação chamada pseudohifa (Treagan, 2011).

No caso específico de *C. albicans*, esta espécie pode formar verdadeiros filamentos em que a hifa que se projecta primeiro, antes da formação de septos, é chamada de tubo

germinativo. A partir da célula leveduriforme, na formação da verdadeira hifa não há a constrição entre a célula-mãe e filamento. O termo hifa refere-se a filamentos tubulares, multicelulares, longos e ramificados, que se podem dividir em células por meio de septos que são tabiques de parede celular, denominando-se hifas septadas (Martins, 2010). Quando se mantêm unidas formam uma estrutura filamentosa complexa denominada micélio (Fukuda *et al.* 2009).

Os clamidósporos (ou clamidoconídios) são estruturas de resistência formadas por *C. albicans*, quando o fungo se encontra num local onde há escassez de nutrientes necessários para o seu desenvolvimento. A formação de clamidósporos sob condições específicas é uma das maneiras eficientes de se distinguir *C. albicans*, de *C. dubliniensis* e *C. africana* (Romeo & Criseo, 2010, Gumral *et al.* 2011). Quando *C. albicans* está presente no seu ambiente natural e o crescimento microbiano está intimamente associado com as superfícies biológicas presentes nesse ambiente pode ocorrer a formação de um biofilme. O biofilme é uma comunidade tridimensional de microrganismos embebidos numa matriz de polímeros e ligado a uma superfície. No entanto é fundamental a existência de algumas variáveis que facilitam a formação do biofilme como a disponibilidade de nutrientes, a concentração de glucose em nutrientes que circundam o biofilme e a natureza da superfície de contacto. Uma das características mais preocupantes associadas ao biofilme é o seu elevado nível de resistência aos antifúngicos (Treagan, 2011).

1.3 A CANDIDÍASE VULVOVAGINAL

Os fungos, incluindo as leveduras do género *Candida*, podem ser encontradas em variados ecossistemas, como solo, alimentos, água, ambientes húmidos e quentes fazendo, inclusivamente, parte da microbiota de homens e animais incluindo das mucosas dos órgãos genitais, aparelho digestivo e aparelho respiratório do homem (Giolo & Svidzinski, 2010). São também isoladas a partir de fezes de diversos animais, mas poucas vezes a partir do solo. Do tegumento cutâneo, isolam-se mais frequentemente outras espécies *Candida* não-*albicans*. A partir de amostras vaginais são isoladas com mais frequência as espécies *C. albicans* e *C. glabrata* (Oliveira, 2012).

As infecções fúngicas vulvovaginais foram descritas pela primeira vez por Wilkinson em 1949, ao estabelecer uma relação entre a existência de fungos comensais na vagina

com a aparição de vaginites. A partir desta data, o conhecimento sobre candidíase vulvovaginal (CVV) foi aumentando progressivamente. *C. albicans*, levedura comensal ao ser humano, torna-se patogénica caso ocorra debilidade orgânica ou imunitária do hospedeiro ou o comprometimento de barreiras anatómicas secundárias, como após queimaduras ou procedimentos médicos invasivos (Barbedo & Sgarbi, 2010), que são considerados mecanismos responsáveis para o estabelecimento de infecção oportunista (Giolo & Svidzinski, 2010).

As doenças causadas por fungos, e nomeadamente por *Candida* sp., passaram a receber maior atenção nas duas décadas finais do século passado com o advento da SIDA, doenças hematológicas, com os avanços na terapêutica de doenças de base, maior utilização de antibióticos, aperfeiçoamento das técnicas de transplantes e com o aumento da esperança média de vida de pacientes padecendo variadas e graves enfermidades (Barbedo & Sgarbi, 2010).

Na prática diária das consultas de ginecologia e obstetrícia são feitos frequentemente diagnósticos clínicos de CVV pelos profissionais de saúde. Esta infecção tem uma incidência aproximada de 25%, e ocupa o segundo lugar entre as vaginites, precedida apenas pela vaginose bacteriana. Estima-se que cerca de 75% das mulheres adultas e em fase reprodutiva, apresentem pelo menos um episódio de vulvovaginite fúngica na sua vida (Rad *et al.* 2010; Achkar & Friest, 2010; Gomes *et al.* 2011) *C. albicans* apresenta uma prevalência de 70 a 90% das mulheres, sendo que 40% a 50% destas vivenciam mais do que um surto ao longo da vida (Sobel, 2010). Observam-se episódios de infecções recorrentes em cerca de 5% das pacientes (Rad *et al.* 2010; Feuerschuetze *et al.* 2010). Alguns estudos indicam que 20% a 30% das mulheres normalmente saudáveis e completamente assintomáticas, apresentem culturas vaginais positivas para *C. albicans* (Achkar & Friest, 2010; Gomes *et al.* 2011).

1.3.1 Factores predisponentes da candidíase vulvovaginal

Estas leveduras são comensais e patogénicas oportunistas, fazendo parte da microbiota vaginal de mulheres saudáveis. Os animais e os seres humanos só entram em contacto com estes microrganismos após o nascimento, começando de imediato a colonização (Oliveira *et al.* 2011; Stainki, 2012). Estes microrganismos também poderão ser introduzidos no organismo através da respiração, do meio ambiente ou da

alimentação. Em geral tornam-se comensais, não provocando doenças no hospedeiro em condições normais, fazendo parte da microbiota normal ou flora normal. Entre as muitas variáveis que determinam a distribuição e a composição da microbiota normal destacam-se os nutrientes, factores físicos e químicos, as defesas do organismo do hospedeiro e factores mecânicos. A distribuição das leveduras nas diferentes localizações no organismo varia de acordo com os tipos de nutrientes que necessitam como fonte de energia. Entre os factores físicos e químicos que influenciam o crescimento das leveduras e, conseqüentemente, a composição e o crescimento da flora normal estão o pH, a concentração de oxigénio, de dióxido de carbono e de salinidade (Stainki, 2012). Além disso, o corpo humano possui uma variedade de defesas contra os microrganismos que eliminam ou inibem o seu crescimento, impedem a adesão às superfícies e neutralizam suas toxinas. Além do mais existe ainda a microbiota transiente constituída por microrganismos que podem estar presentes no organismo durante vários dias, semanas ou mesmo meses, e que depois desaparecem (Stainki, 2012).

Os factores predisponentes do hospedeiro associados a candidíase estão esquematizados na Tabela 1.2.

Tabela 1. 2: Factores predisponentes do hospedeiro (Giolo & Svidzinski, 2010; Treagan, 2011).

Idade	A maior incidência de candidíase ocorre em indivíduos com mais de 65 anos, pós-menopausa ou deficiência nutricional ou imunológica (Farage & Maibach, 2011; Williams & Lewis, 2011).
Gravidez	A elevada concentração de estrogénio permite o aumento da concentração de glicogénio no ambiente vaginal actuando como fonte de carbono para o crescimento de <i>Candida</i> spp. Aumenta também a acidez do epitélio vaginal estimulando formação de filamentos e adesão <i>Candida</i> spp. (Sobel, 2010).
Uso de dispositivos de longa permanência	Os cateteres venosos, sondas vesicais ou nasogástricas funcionam como superfícies para a formação de biofilmes e também actuam como reservatórios de células permitindo a contínua reinfecção (Nobile <i>et al.</i> 2006).
Fármacos antifúngicos	O uso profilático de alguns antifúngicos em pacientes de elevado risco favorece o desenvolvimento de infecções fúngicas invasivas.

(Continuação da tabela 1.2)

Hospitalização prolongada	Estes pacientes têm colonização das membranas mucosas por <i>Candida</i> spp. e, dependendo da gravidade dos processos de base e do grau de intervenção iatrogénica, os níveis podem ser muito elevados (Neufeld, 2009). Pode ainda aumentar a incidência de estirpes <i>Candida</i> não- <i>albicans</i> responsáveis por infecções nosocomiais (Achkar & Friest, 2010).
Imunossupressores e corticosteróides	Utilizados na terapêutica antineoplásica podem afectar a função dos neutrófilos, monócitos e macrófagos circulantes e comprometer a imunidade mediada pelas células T, resultando num aumento de risco de micoses oportunistas profundas (Neufeld, 2009; Oliveira, 2012).
Antibióticos de largo espectro	Levam à redução da população bacteriana nas membranas mucosas, incluindo a vaginal, facilitando o crescimento excessivo e a proliferação de <i>Candida</i> spp. (Giolo & Svidzinski, 2010; Williams & Lewis, 2011).
Ruptura de barreiras anatómicas, cutâneas e mucosas	As cirurgias intra-abdominais, queimaduras, entre outras, levam a alterações na integridade da mucosa gastrointestinal permitindo a entrada de <i>Candida</i> spp. no organismo e consequente infecção (Neufeld, 2009).
Diabetes	O aumento dos níveis de glucose no sangue leva a acidémia e maior susceptibilidade à infecção por <i>Candida</i> spp. (Burmester & Pezzutto, 2005).

Além dos factores do hospedeiro listados acima, a candidíase pode igualmente ser estimulada por factores de virulência das leveduras.

1.3.2 A etiologia da candidíase vulvovaginal (CVV)

As vaginites infecciosas mais comuns são: a vaginite bacteriana, a candidíase vulvovaginal e a tricomoníase (Hainer, *et al.* 2011) De acordo com Robin Berkhout (1923) os agentes da candidíase, antes denominada *monilíase*, englobam as várias espécies do género *Candida*, sobressaindo em prevalência *C. albicans*. Normalmente a origem da infecção é endógena, ou seja, associada ao hospedeiro, no entanto também pode ter origem em exógena (factores externos) (Oliveira, 2012).

Durante os últimos anos, para além de *C. albicans*, a ocorrência de outras espécies do género *Candida* tem aumentado cada vez mais em pacientes com factores predisponentes. Entre as espécies de *Candida* não-*albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* têm sido isoladas com frequência a partir de casos de candidíase vulvovaginal (Treagan, 2011) para além de outras espécies (Tabela 1.3).

Mais recentemente, a espécie *Candida africana* foi referida como agente patogénico oportunista e foi descrita como uma levedura associada a candidíase vulvovaginal. Estas leveduras foram descritas pela primeira vez em 1995, como sendo isolados de *C. albicans* incapazes de produzir clamidósporos. Mais tarde foi proposto como sendo uma nova espécie do género *Candida*, com base em características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas claramente diferentes dos isolados típicos de *C. albicans*. No entanto, neste momento, a situação taxonómica de *C. africana* e a sua relação filogenética com outras espécies de *Candida* ainda é controversa e requer mais estudos de caracterização (Romeo & Criseo, 2010; Fischer, 2010; Gumral *et al.* 2011).

Tabela 1.3: Espécies de *Candida* mais frequentemente responsáveis por infecções de CVV.

<i>Candida albicans</i>	É a espécie mais frequentemente isolada de infecções vulvovaginais e a espécie com maior conhecimento patogénico. Habitualmente faz parte da microbiota vaginal. Em geral é sensível aos fármacos antifúngicos, embora nestes últimos anos haja um aumento das resistências principalmente aos fármacos azólicos (Barbedo & Sgarbi, 2010).
<i>Candida parapsilosis</i>	Considerada uma importante espécie patogénica hospitalar oportunista é frequentemente isolada de hemoculturas. Pode causar desde candidíase superficial a infeções invasivas. Possui capacidade de produzir biofilmes e multiplica-se em soluções contendo glicose (Amadio, 2010; Treagan, 2011).
<i>Candida tropicalis</i>	É uma levedura oportunista importante em indivíduos com flora intestinal suprimida pelo uso de antibióticos e está associada a infeções fúngicas em imunocomprometidos (Amadio, 2010; Treagan, 2011). Pode causar candidémia.
<i>Candida krusei</i>	Espécie particularmente isolada em pacientes neutropénicos portadores de doenças hematológicas. Possui resistência intrínseca ao fluconazol (Amadio, 2010; Treagan, 2011).
<i>Candida guilliermondii</i>	Actualmente é reconhecida como agente patogénico emergente, embora não seja frequentemente causa de infeção invasiva (Amadio, 2010).
<i>Candida africana</i>	É uma espécie de <i>Candida</i> recentemente descrita associada à candidíase vaginal. Fenotipicamente relacionada com <i>C. albicans</i> , pode ser diferenciada desta por técnicas moleculares (Amouri <i>et al.</i> 2010).

1.3.3 Patogénese da candidíase vulvovaginal

Como já foi referido, a candidíase vulvovaginal é uma infeção de origem endógena, ou exógena visto que o paciente pode ser portador do agente causador da doença. Para

que a levedura ultrapasse a condição de comensal, é necessário que o organismo esteja sob a influência de factores já anteriormente citados, sofrendo certas alterações variáveis de acordo com o local onde se desenvolve a infecção. A presença de estrogénio na mucosa vaginal leva à conversão do glicogénio em glicose e consequente formação do ácido láctico na vagina que assegura um pH de 4 a 4,5, óptimo para o desenvolvimento dos bacilos de Doderlein (Oliveira, 2012).

Quando o estímulo do estrogénio diminui ou cessa, alteram-se as condições fisiológicas sobre o pH, diminuindo a concentração de bacilos de Doderlein, permitindo o desenvolvimento das espécies de *Candida*. A patogénese da candidíase vulvovaginal é facilitada por diferentes factores de virulência (Barbedo & Sgarbi, 2010), tais como os apresentados na Tabela 1.4.

Tabela 1.4: Factores de virulência das leveduras do género *Candida*.

Adesinas	São glicoproteínas localizadas na superfície da parede celular. Permitem interferir nas interacções entre células do género <i>Candida</i> (Santos, 2010). A aderência às células do hospedeiro pelas adesinas está geneticamente determinada, como por exemplo, através da família dos genes <i>ALS</i> (<i>agglutinin-like sequence</i>) e <i>HWP₁</i> (<i>Hyphal Wall Protein</i>) em <i>C. albicans</i> , que codificam diferentes glicoproteínas de superfície celular implicadas no processo de adesão (Sobel 2010; Giolo & Svidzinski, 2010; Treagan, 2011).
Morfogénese (dimorfismo fúngico)	As pseudohifas desempenham um papel importante na patogenicidade de <i>Candida</i> spp. quando os fungos colonizam a superfície epitelial ou epidérmica por facilitarem a adesão às células hospedeiras (Oliveira, 2012).
Sobrevivência no interior de fagócitos	As leveduras do género <i>Candida</i> para que sobrevivam ou escapem da fagocitose dos macrófagos é necessário a expressão dos genes <i>SAP</i> (secreção de aspartil-protease). Por exemplo, células leveduriformes “brancas” possuem estilo de vida fermentativo, enquanto células leveduriformes “opacas” têm metabolismo oxidativo (Barbedo & Sgarbi, 2010).
Modulação do sistema imunitário	As mananas e as manoproteínas são capazes de regular (activar e desactivar) a acção das defesas do hospedeiro.
Deficiência de ferro	Observada na candidíase hematogénica, em que <i>C. albicans</i> é capaz de adquirir o ferro a partir da transferrina (Murray <i>et al.</i> 2009).
Adaptação ao ambiente oxidativo	Determinada pelo genoma de <i>C. albicans</i> , em que há genes temporariamente induzidos ou reprimidos em função do óxido nítrico.
Variação de temperatura e do pH	Componentes cruciais para a adaptação a diferentes localizações do hospedeiro.

(Continuação da tabela 1.4)

Enzimas hidrolíticas e proteolíticas	As principais enzimas produzidas são as proteinases degradativas, que hidrolisam ligações peptídicas e as fosfolipases que hidrolisam os fosfoglicerídeos, importantes para a invasão de tecidos. As enzimas hidrolíticas são responsáveis pela persistência e colonização das leveduras no tracto vaginal (Gomes <i>et al.</i> 2011).
Receptores de integrina	São proteínas da membrana plasmática que têm uma variedade de funções. As espécies de <i>Candida</i> têm proteínas de integrina com antígenos e semelhanças funcionais para receptores do sistema do complemento dos humanos (Burmester & Pezzutto, 2005).

Sabe-se que nenhum factor de virulência é dominante, ou seja, a patogénese depende de uma expressão coordenada de múltiplos genes de uma forma apropriada para as condições do local de infecção bem como de factores ligados ao hospedeiro. Considerando que as condições podem variar muito nas diferentes localizações da infecção, é bem provável que determinados genes associados à virulência sejam mais importantes para tipos específicos de candidíase (Sobel, 2010; Barbedo & Sgarbi, 2010).

1.3.4 Manifestações clínicas da candidíase vulvovaginal

A candidíase vulvovaginal (CVV) é um conjunto de sintomas vaginais e vulvares que incluem (Feuerschuette *et al.* 2010; Sobel, 2010; Hainer & Gibson, 2011):

- Corrimento vaginal (mínimo e por vezes ausente);
- Desconforto e prurido vulvovaginal;
- Dispareunia (frequentemente com alteração na secreção vaginal);
- Disúria;
- Odor incomum.

As vulvovaginites fúngicas são provocadas por fungos leveduriformes, na grande maioria dos casos por espécies pertencentes ao género *Candida* (Barbedo & Sgarbi, 2010).

A candidíase vulvovaginal recorrente afecta aproximadamente 5% das mulheres e pode ser caracterizada por CVV não complicada, causada por *C. albicans*, e CVV complicada. Esta última inclui formas graves e recorrentes causadas por espécies de *C. não-albicans* (Achkar & Friest, 2010), conforme exposto na Tabela 1.5.

Tabela 1.5: Características da candidíase vulvovaginal (Feuerschuetz *et al.* 2010).

CVV não-complicada	CVV complicada
Esporádica	Recorrente (quatro ou mais episódios por ano)
Intensidade leve a moderada	Severa
Candidíase frequentemente associada a <i>C. albicans</i>	Associada a espécies <i>C. não-albicans</i>
Na ausência de gravidez ou de alteração imunológica	Comprometimento imunológico (diabetes, gravidez, imunossupressão)

1.4 O DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS INFECÇÕES POR *Candida* sp.

A ciência tem vindo a evoluir muito nas últimas décadas, principalmente em relação à consciencialização da importância do diagnóstico precoce das infecções. Nos procedimentos indicados para a colheita de amostras, a assepsia antes da colheita, o tipo de amostra biológica, um volume e transporte adequados, são factores importantes para o sucesso do isolamento e identificação do agente etiológico (Barbedo & Sgarbi, 2010).

A relação entre os sinais e sintomas (critérios clínico-epidemiológicos) e a levedura isolada em meio de cultura, é que nos permite avaliar se aquela é o agente etiológico da infecção ou apenas um microrganismo comensal. Para o isolamento das leveduras a partir de qualquer tipo de amostra, podem-se recorrer a diferentes tipos de meios de cultura. O meio mais utilizado nos laboratórios de micologia médica é o meio de Sabouraud dextrose agar (SDA). Em regra, usam-se antibióticos (cloranfenicol e/ou gentamicina) para impedir o crescimento de bactérias que podem prejudicar o isolamento de fungos quando as amostras biológicas o justificam. O cloranfenicol é o mais indicado porque resiste à autoclavagem (ANVISA, 2004).

De acordo com os aspectos observados ao exame microscópico da amostra, podem-se orientar os procedimentos laboratoriais para isolamento do agente. Para a correcta identificação do fungo será necessário observar o aspecto macroscópico das colónias, bem como a morfologia das estruturas microscópicas características de cada espécie. Por vezes, é necessário fazer subculturas em outros meios de cultura, mais ricos ou mais pobres em nutrientes, como por exemplo, meios de *corn-meal*, *potato dextrose agar*

(PDA), malte agar ou até mesmo o meio de gelose de sangue entre muitos outros, para estimular a produção de estruturas típicas e identificadoras de cada espécie (ANVISA, 2004; Brooks, 2010).

1.4.1 Observação morfológica de *Candida* sp.

O diagnóstico clínico da CVV deve ser, sempre que possível, confirmando por diagnóstico laboratorial convencional e molecular, uma vez que os sinais e sintomas apresentam baixos valores de especificidade, impedindo assim a correcta identificação do agente etiológico (Kennedy & Sobel, 2010). Para o exame microscópico da amostra podem ser utilizados diferentes métodos, dependendo do tipo da amostra e suspeita clínica, enquanto a identificação da espécie das leveduras requer a avaliação de critérios morfológicos, bioquímicos, imunológicos e genéticos.

A observação morfológica deve ser macroscópica e microscópica. A observação da morfologia macroscópica deve ter em conta os aspectos e taxas de crescimento das colónias de leveduras nos diferentes meios de cultura usados na rotina dos laboratórios de micologia. O meio de Sabouraud agar, com ou sem a adição de antibióticos, é o meio de isolamento por excelência para a identificação de leveduras. As colónias das leveduras do género *Candida* neste meio de cultura são planas, de consistência mucoide e aspecto cremoso, lisas ou rugosas, de cor branca ou creme (Treagan, 2011).

As características microscópicas mais utilizadas na identificação de leveduras são o exame microscópico directo e a prova da filamentação.

O meio de agar de eosina-azul de metileno (EMB) é um dos meios de cultura utilizados em muitos laboratórios de microbiologia em todo o mundo. Foi desenvolvido por Holt-Harris e Teague em 1916 para diferenciar microrganismos fermentadores de não fermentadores. Em 1918 Levine alterou a fórmula original do meio agar EMB eliminando a sacarose e adicionando a lactose, proporcionando ao meio excelente para diferenciar *Escherichia coli* de *Enterobacter aerogenes*.

Weld (1952) utilizou este método para identificar *C. albicans* pela propriedade da produção do tubo germinativo em diferentes amostras clínicas (Llovo *et al.* 2006) descreveram e demonstram pela primeira vez a utilidade do meio EMB acrescido ou não de Tween 80 a 1%, com objectivo de observar após 24 horas, 48 horas e 72 horas

estruturas típicas das leveduras como pseudomicélio, blastoconídios, ascósporos e artroconídios, as quais permitem a identificação das espécies.

No exame microscópico directo, as características distintas das leveduras podem ser identificadas por meio da observação da sua morfologia *in vivo*, utilizando hidróxido de potássio (KOH 10% ou 20%) permitindo uma rápida identificação e detecção de possíveis leveduras em amostras clínicas. Desse modo a observação microscópica de amostras com *Candida* revela blastoconídios e/ou pseudohifas e/ou hifas (Madhavan *et al.* 2011).

O calcofluor é um fluorocromo não específico que se liga à quitina das paredes celulares dos fungos sendo este procedimento um método rápido para a detecção de muitas leveduras (Bhavasara *et al.* 2010). Ainda o meio de sólido agar eosina e azul metileno utilizado no método de Dalmau permite diferenciar e identificar presuntivamente, através da morfologia das células, as espécies de leveduras do género *Candida* (Carneiro, 2007).

Aprova do tubo germinativo ou Teste da Blastese descrita em 1960 (Taschdjian *et al.* 1960) permite a identificação rápida e presuntiva das leveduras da espécie *C. albicans* (Carneiro, 2007; Oliveira, 2012). A presença de tubo germinativo na forma de um pequeno filamento que se forma a partir de uma célula leveduriforme sem formar constrição com a célula-mãe, permite a identificação presuntiva desta espécie (De Almeida, 1999). Contudo, existem ainda outros testes que permitem a identificação da prova do tubo germinativo como o meio de cultura sólido Oxgall-Tween-ácido cafeico (TOC) que também permite a visualização de clamidiósporos e o meio de sólido agar eosina e azul metileno utilizado no método de Dalmau (Carneiro, 2007).

1.4.2 Identificação bioquímica de *Candidasp.*

Critérios bioquímicos enzimáticos

Os meios cromogénicos estão desenhados para o isolamento e identificação de algumas espécies do género *Candida* directamente a partir da inoculação das amostras biológicas. O fundamento dos mesmos baseia-se em determinadas actividades enzimáticas por parte de determinadas espécies de leveduras mediante a hidrólise específica de um substrato cromogénico na presença de um indicador. Por conterem

substâncias cromogénicas o meio modifica a cor das colónias das diferentes espécies de leveduras do género *Candida*, respectivamente para as cores verde, azul e rosa (Ferreira, 2010). Uma das principais vantagens destes meios cromogénicos é o de permitir identificar directamente diferentes espécies a partir da cultura de isolados clínicos mistos (Treagan, 2011). Comercialmente encontram-se disponíveis, por exemplo, o meio CHROMagar COLOREX *Candida*[®], Cromogen Albicans[®], CandiSelect[®], entre outros.

Identificação baseada em perfis de assimilação

São economicamente os mais acessíveis aos laboratórios de diagnóstico microbiológico, pois não necessitam de equipamentos sofisticados e dispendiosos para a sua utilização. Esses sistemas consistem em galerias plásticas contendo pequenas cúpulas com carboidratos e outros compostos desidratados, onde é inoculada uma suspensão da levedura. Após incubação à temperatura e tempo adequados, as provas positivas podem ser traduzidas pela turvação do conteúdo das cúpulas ou pela mudança da sua coloração, sendo o resultado comparado com uma base de dados fornecida pelo fabricante (Barbedo & Sgarbi, 2010). Entre os testes colorimétricos, encontram-se por exemplo o sistema Auxacolor[®] e o sistema Uni-Yesta-Tek[®] (Barbedo & Sgarbi, 2010).

Nesta categoria de testes de assimilação de nutrientes são ainda comercializados diversos testes semi-automatizados que simplificam a sua utilização bem como a interpretação dos resultados: API 20C AUX[®] (BioMerieux, França), Galeria ID32C[®] (BioMerieux, França) e Sistema Vitek[®] (BioMerieux, França). Entre estes, as galerias ID 32C[®] são as mais completas pois incluem um número maior de testes permitindo uma melhor identificação das espécies. A leitura das galerias tanto pode ser feita manualmente utilizando um sistema informático (Barbedo & Sgarbi, 2010).

Sistema automatizados

Os sistemas automatizados de identificação de leveduras de interesse médico mais divulgados são o Rapid Yeast Identification Panel Microscan[®], Sistema Biolog YT MicroPlate[®] e o Vitek 2[®] (BioMerieux, França). Tratam-se de sistemas controlados por computador, onde painéis contendo substratos desidratados são incubados após a re-hidratação com uma suspensão da levedura, sendo os resultados automaticamente

interpretados em poucas horas (Barbedo & Sgarbi, 2010). Nestes testes pressupõe-se, como condição básica, a pureza tanto do microrganismo quanto das substâncias a serem testadas.

1.4.3 Identificação mediante critérios imunológicos

O Teste Bichro-Latex Albicans[®] (Fumouze) é um teste de aglutinação em látex que permite a identificação de leveduras de *C. albicans* directamente a partir de colónias isoladas, utilizando um anticorpo monoclonal específico que reagindo com o antigénio localizado na parede celular, permite a identificação desta espécie (Pereira, 2010). Existem outros métodos de identificação de outras espécies, como: Krusei-color[®] (Fumouze) para a identificação *C. krusei* e o Bichro-Dubli[®] (Fumouze) para a identificação *C. dubliniensis*.

1.4.4 Identificação molecular de *Candida* sp.

Tradicionalmente, a identificação e classificação de espécies de *Candida* tem sido realizada por métodos que consomem algum tempo, como técnicas baseadas no isolamento das leveduras em cultura, análise macro e micromorfológica da cultura e testes bioquímicos. O desenvolvimento e o aperfeiçoamento das técnicas de biologia molecular utilizando o DNA de agentes infecciosos superou a limitação do tempo de resposta e tem despertado o interesse dos laboratórios mas, por ainda não estarem totalmente padronizadas exigirem equipamentos específicos e dispendiosos, a sua utilização está limitada principalmente à detecção de leveduras (Giolo & Svidzinski, 2010; Rad *et al.* 2012).

Nestes últimos anos a técnica *Polymerase Chain Reaction* (PCR) tem sido largamente utilizada na detecção de microrganismos, incluindo a rápida identificação de leveduras. Muitas outras técnicas moleculares utilizadas na tipagem de microrganismos através da análise das sequências de DNA amplificadas por PCR podem ser igualmente aplicadas nas leveduras como, por exemplo, as que se baseiam na electroforese em campo pulsado (PFGE), na análise de fragmentos de genoma gerados pela amplificação aleatória de DNA (RAPD), após digestão com endonucleases de restrição, na separação dos fragmentos por electroforese em gel de agarose (RFLP) ou através do estudo de sequências de regiões específicas do genoma (Pereira, 2010).

Diferenciação de espécies de *Candida*

Entre as diferentes técnicas baseadas em PCR, a técnica de PCR multiplex pela sua simplicidade e rapidez, tem-se mostrado uma ferramenta útil na detecção de agente patogénicos directamente a partir de amostras clínicas e/ou de culturas. É uma técnica derivada da PCR clássica onde dois ou mais *loci* são simultaneamente amplificados numa mesma reacção (Neufeld, 2009; Giolo & Svidzinski, 2010).

Como muitas das técnicas moleculares para a detecção e identificação de microrganismos, esta técnica pode ter como alvo as sequências de DNA ribossómico (rDNA). O rDNA é formado por unidades de repetição dispostas em *tandem* e cada unidade de repetição é constituída por dois tipos distintos de regiões: regiões génicas e regiões espaçadoras, entre as quais a região *Internal Transcribed Spacer* (ITS). Na direcção 5'-3' o rDNA é formado pelo gene 18S, a região ITS1, o gene 5,8S, a região ITS2 e o gene 28S. As sequências das regiões ITS permitem a distinção entre microrganismos com uma elevada proximidade filogenética pois são altamente variáveis tanto em tamanho quanto em sequência nucleotídica (Neufeld, 2009). As outras regiões génicas, como são mais conservadas, podem ser utilizadas para a análise de grupos evolutivamente bastante distantes. Assim, as espécies fúngicas muito próximas e as variedades de uma mesma espécie podem ser analisadas pelas regiões ITS do rDNA. A amplificação por PCR dessas regiões tem-se mostrado eficiente na identificação de espécies e estirpes do género *Candida* (Neufeld, 2009).

O princípio da técnica de RFLP baseia-se na amplificação de uma região do DNA seguida de corte por enzima (s) de restrição. No caso específico das leveduras do género *Candida*, podem ser utilizados *primers* universais para a amplificação da região ITS incluindo a subunidade 5,8S rDNA e pequenas porções conservadas das extremidades das regiões 18S e 28S rDNA. Os fragmentos amplificados por PCR posteriormente clivados pela enzima de restrição *MspI* permitem a diferenciação das espécies clínicas mais comuns através da presença ou ausência de sequências específicas de bases nucleotídicas reconhecidas e clivadas pela enzima de restrição que variam entre diferentes espécies (Mirhendi *et al.* 2006; Shokohi *et al.* 2010). A identificação das espécies é posteriormente feita através da análise dos perfis de bandas obtidas, após a separação electroforética dos produtos de restrição (Mirhendi *et al.* 2006). A técnica de

RFLP tem a vantagem de ser fácil, rápida e fiável quando comparada com os métodos de identificação convencionais. No entanto tem o inconveniente de ser uma técnica mais onerosa.

Detecção de *Candida africana*

Como foi descrito por Romeo & Criseo (2010) a identificação da espécie recentemente descrita *Candida africana* e a discriminação de outros membros do complexo de espécies de *C. albicans*, como *C. dubliniensis*, pode ser realizada por meio da amplificação do gene *HWP1* que codifica para a proteína *HWP1* constituinte da parede celular do fungo.

1.5 O TRATAMENTO DAS INFECÇÕES FÚNGICAS

O controlo e tratamento da candidíase vulvovaginal nem sempre é fácil e eficaz, frequentemente devido à falta de diagnóstico laboratorial correcto com vista à adequação da terapêutica à espécie causadora da infecção, evoluindo em muitos casos, para infecções recorrentes (Kennedy & Sobel, 2010). Paralelamente ao aumento das infecções por leveduras do género *Candida*, tem sido igualmente observado o aumento do número de estirpes resistentes aos antifúngicos, assim como o aumento do número de espécies de *Candida* não-*albicans* responsáveis por infecções (Nascimento, 2009). A prioridade no tratamento de infecções por *Candida* spp. depende de diferentes factores predisponentes identificáveis tais como a localização anatómica da infecção, factores de risco do hospedeiro para infecção e a existência de doenças subjacentes como a leucemia ou a SIDA, por exemplo. Nestes casos, a escolha da terapêutica a utilizar apresenta-se como sendo um passo crítico importante para o controle da infecção (Treagan, 2011; Williams & Lewis, 2011).

Os antifúngicos dividem-se em três grandes categorias: os polienos, os azóis, as equinocandinas.

A estrutura básica dos polienos consiste num anel lactâmico, uma cadeia lipofílica rígida contendo 3 a 7 duplas ligações e uma porção hidrofílica flexível contendo vários

grupos hidroxilos (Figura 1.2). Incluem dois antifúngicos sistêmicos muito utilizados, a anfotericina B e a nistatina.

A anfotericina B exerce a sua acção antifúngica através de dois mecanismos diferentes. O primeiro envolve a ligação da anfotericina B ao ergosterol, o principal esterol da membrana do fungo. Esta ligação produz canais iónicos, que destroem a integridade osmótica da membrana celular fúngica e levam à perda de constituintes intracelulares e à morte celular. No entanto, a anfotericina B também se liga ao colesterol, que é o principal esterol da membrana dos mamíferos, embora menos avidamente que ao ergosterol. Esta ligação ao colesterol é responsável por grande parte da toxicidade deste antifúngico quando administrado em humanos. O outro polieno, a nistatina, é apenas utilizada como agente tópico no tratamento de infecções superficiais (Murray *et al.* 2009; Oliveira *et al.* 2011).

A classe dos azóis pode ser dividida em compostos imidazólicos (dois nitrogénios no anel azólico) e compostos triazólicos (três nitrogénios no anel azólico). Todos os azóis possuem acção sistémica e incluem o fluconazol, o itraconazol, o voriconazole o posaconazol. Tanto os imidazólicos como os triazólicos agem por inibição da enzima 14- α -demetilase do lanosterol dependente do citocromo fúngico P-450. Esta enzima encontra-se envolvida na conversão do lanosterol em ergosterol. Este mecanismo leva a uma alteração da permeabilidade da membrana da célula fúngica, ocorrendo assim uma inibição do crescimento do fungo (Figura 1.2) ou à morte celular (Williams & Lewis, 2011).

As equinocandinas são uma nova classe de antifúngicos que surgiu como alternativa aos azóis e polienos. É uma classe altamente selectiva de lipopeptídeos semi-sintéticos que inibem a síntese de β -1,3-glucanas, constituintes importantes da parede celular fúngica. Esta classe de glucanas desempenha um papel importante na manutenção da integridade osmótica da célula fúngica, na divisão e no crescimento celular (Figura 1.2). Actualmente existem três classes de equinocandinas aprovadas para utilização em tratamentos ou prevenção de várias micoses: a caspofungina, a anidulafungina e a micafungina (Romeo & Criseo, 2010).

Relativamente aos agentes antifúngicos tópicos, existe uma ampla variedade disponível para o tratamento de infecções fúngicas cutâneas superficiais e das mucosas. O mercado farmacêutico dispõe de uma multiplicidade de cremes, pomadas

antifúngicas vaginais, nas mais diferentes formulações, permitindo opções variadas por parte dos profissionais de saúde e mesmo por cidadãos comuns.

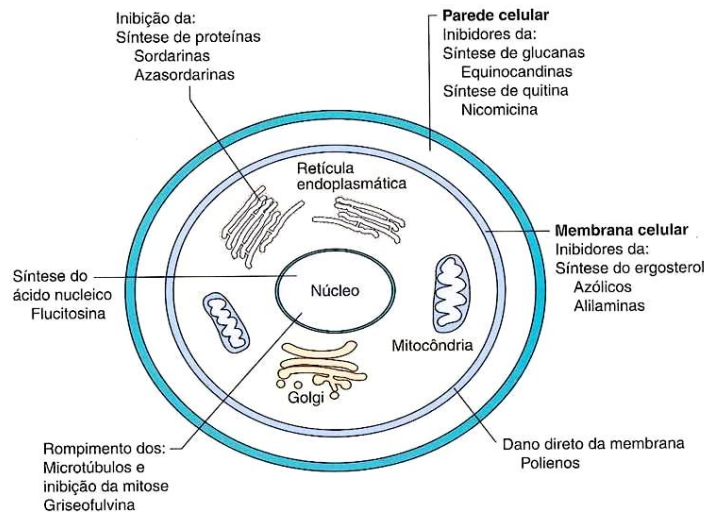


Figura1. 2: Mecanismo de acção dos antifúngicos na célula fúngica (Adaptado de Murray *et al.* 2009).

Este é um factor que aumenta a facilidade da sua aquisição e utilização e demonstra o interesse comercial na produção destes fármacos. Isto, certamente, conduz mais à automedicação e mesmo à indicação indiscriminada de uso por terceiros, que consequentemente devido à sua baixa potência podem servir de ponte para o desenvolvimento de resistências e, a partir daí, de infecções graves (Murray *et al.* 2009).

1.5.1 Mecanismos de resistência aos agentes antifúngicos

Em relação aos polienos e à anfotericina B, em particular, continua a não se verificara ocorrência de grande número de resistências, tendo sido observada e reportada apenas susceptibilidade diminuída em isolados de *C. lusitaniae*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. guilliermondii*.

A utilização sistemática dos azóis, especialmente de fluconazol, na prevenção e tratamento de infecções fúngicas aumentou o relato de resistências emergentes a esta classe de agentes antifúngicos. Entre as cinco espécies mais comuns de *Candida* (*C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei*) somente *C. krusei* é considerada intrinsecamente resistente ao fluconazol. Por outro lado, os novos triazólicos têm-se

revelado mais eficazes que o fluconazol contra a *Candida* spp. incluindo actividade contra *C. krusei*.

A resistência aos azóis pode ser causada pelos seguintes mecanismos: modificações de enzimas-alvo (qualidade e número) acesso reduzido do antifúngico ao alvo, ou a combinação entre os diferentes mecanismos (Murray *et al.* 2009).

A enzima 14 α -demetilase (codificada pelo gene *ERG11*) é um exemplo de uma enzima-alvo. Ao ocorrerem mutações no gene codificante, a enzima sofre alterações e consequentemente diminuição da afinidade aos azóis. A sobreexpressão do *ERG11* resulta na superprodução de enzima criando a necessidade de usar maiores concentrações de antifúngico dentro da célula para evitar a produção de moléculas da enzima-alvo.

Em relação às equinocandinas, em particular o mecanismo de resistência à caspofungina tem sido caracterizado em mutantes de *C. albicans*. A mutação do gene *FKS1* resulta em estirpes resistentes às equinocandinas, mas que permanecem susceptíveis aos polienos e azóis (Murray *et al.* 2009).

Prevenção da infecção

A melhor forma de controlo de infecções assenta na prevenção das mesmas. No caso específico da candidíase vulvovaginal, devem ser evitadas roupas íntimas excessivamente apertadas ou feitas de material sintético, que não permitam por um lado a evaporação do suor ou de outras secreções, por outro provoquem maceração e inflamação da vulva (Akpan *et al.* 2011). O algodão é o tecido ideal porque é macio e permite a transpiração. A permanência com roupas de banho húmidas, hábitos incorrectos de higiene íntima, como a limpeza anal inversa, provoca a contaminação da região vulvovaginal por fungos e bactérias residentes nos intestinos (Akpan *et al.* 2011; Águas & Silva, 2012). Deste modo é muito difícil evitar que mulheres comprovadamente tratadas de uma infecção voltem a apresentar novos episódios, uma vez que, a presença do fungo em baixas concentrações no epitélio vaginal é considerada normal. Consequentemente, são possíveis novos quadros agudos de infecção, dependentes mais de factores intrínsecos à mulher do que propriamente da presença do fungo na mucosa vaginal (Hernández *et al.* 1997; Roberts *et al.* 2011).

1.5.2 Determinação da susceptibilidade *in vitro* aos antifúngicos

Existem diversos protocolos para a realização de testes de susceptibilidade e avaliação da resistência fúngica. Os mais utilizados são, difusão a partir de disco, o E-test e a microdiluição em meio líquido (Mazulos *et al.* 2007) Os testes de susceptibilidade *in vitro* aos antifúngicos são utilizados para a determinação da viabilidade, actividade ou crescimento de células de leveduras na presença de um determinado fármaco antifúngico permitindo assim a escolha da melhor opção para o tratamento da infecção.

A realização dos testes de susceptibilidade aos antifúngicos não se justificava quando a apenas a anfotericina B e a 5-fluorocitosina eram as únicas opções terapêuticas para o tratamento das infecções fúngicas. À medida que a indústria farmacêutica foi introduzindo novos antifúngicos, tornou-se necessária a realização de testes de susceptibilidade com o objectivo de comparar a actividade dos mesmos e detectar possíveis resistências. Em 1985 o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) efectuou uma supervisão em diferentes laboratórios a fim de conhecer que testes de susceptibilidade eram realizados e como eram feitos e em 1992 criou comité para a padronização das provas de sensibilidade aos antifúngicos de leveduras do género *Candida* e *Cryptococcus neoformans* (Lacasa *et al.* 2007).

Métodos baseados em difusão agar

O método de difusão em agar a partir de discos impregnados de antifúngico encontra-se padronizado na norma M44-A do CLSI, é de simples execução e economicamente acessível aos laboratórios de diagnóstico microbiológico. Foi desenvolvido para o estudo da sensibilidade das leveduras ao antifúngico em função do halo de inibição

produzido pela difusão do antifúngico em meio de cultura sólido, gerando um gradiente de concentração ao redor do disco (Figura 1.3).

Deste modo a levedura cresce na superfície da placa em redor do disco, excepto onde o gradiente de concentração do antifúngico foi suficiente para inibir o crescimento da mesma.

Para o fluconazol, voriconazol, anfotericina B, itraconazol, ketoconazol e caspofungina já existem valores padronizados de *cut-off* para determinadas concentrações de antifúngico (Peróla, 2010).

O Etest[®] é um método quantitativo de difusão em agar a partir de tiras contendo um gradiente de antifúngico que permite a determinação da concentração mínima inibitória e do ponto de intercessão do final da inibição do crescimento. No entanto este teste é mais dispendioso que os discos e esse facto limita a sua aplicação à rotina laboratorial (Pfaller *et al.* 2010)

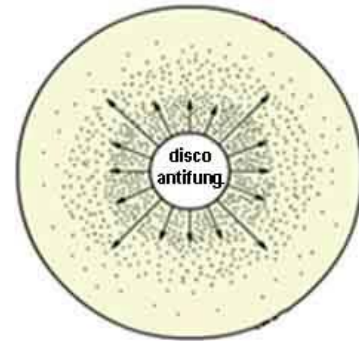


Figura 1.3: Princípio do teste de susceptibilidade pela metodologia de difusão em disco.

Método de microdiluição

O método de microdiluição em meio líquido é um teste menos utilizado em rotina dos laboratórios de diagnóstico microbiológico pois exige pessoal treinado e é muito trabalhoso. No entanto estes testes de susceptibilidade *in vitro* são muito úteis na determinação da capacidade de crescimento das leveduras na presença de concentrações crescentes de fármaco antifúngico o que permite detectar qual a concentração mínima inibitória de cada estirpe e adequar o tratamento para determinada infecção.

Os kits comerciais Sensititre Yeast One[®] e o ATB Fungus 2[®] baseiam-se no método de microdiluição mas utilizam substratos cromogénicos que facilitam a interpretação das concentrações mínimas inibitórias (Johnson, 2008; Paredes, 2009; Peróla, 2010). Entre 1999 e 2002 o grupo *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) procedeu ao desenvolvimento de um protocolo padronizado para a determinação das susceptibilidades aos antifúngicos de leveduras isoladas de infecções europeias (versões A-A3), equivalente ao preconizado pelo CLSI. Incluiu, no entanto, algumas modificações que permitiram automatizar a determinação da concentração

mínima inibitória e substituir a leitura visual por leitura espectrofotométrica, com a consequente redução do tempo para a obtenção dos resultados (Eraso *et al.* 2009).

1.6 O HOSPITAL MATERNIDADE IRENE NETO, HUÍLA, ANGOLA

O Hospital Maternidade Irene Neto encontra-se situado na cidade do Lubango, município do Lubango, província de Huíla, sul de Angola (Figura 1.4). Este município encontra-se limitado a Norte pelo município de Quilengues, a Este pelo município da Cacula, a Sul pelos municípios da Chibia e Humpata, e a Oeste pelo município da Bibala. É constituído pelas comunas de Lubango, Arimba, Hoque e Huíla (Estermann, 1956). A cidade do Lubango (*Sá da Bandeira* até 1975) é a capital da província de Huíla, tem cerca de 318 mil habitantes e encontra-se situada no planalto da Huíla a uma altitude de cerca de altitude 1774 m.

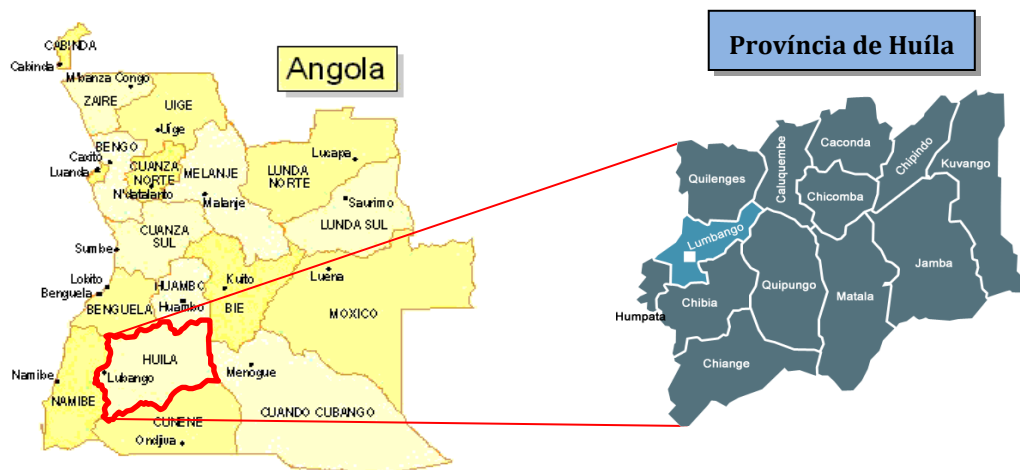


Figura 1.4: Localização geográfica da província de Huíla
Fonte: <http://www.fas-angola.org/wp-content/themes/fas/images/Huíla.gif>

O Hospital Maternidade Irene Neto caracteriza-se por ser um hospital de grande porte com convénio ao SUS (Sistema Único de Saúde), tendo como entidade responsável o Ministério da Saúde de Angola. Mensalmente são atendidas em média cerca de 9898 utentes. Faz uma média mensal de 6703 consultas, cerca de 1800 consultas no banco de urgências, 1093 partos e 302 cirurgias.

1.7 OBJECTIVOS DO TRABALHO E PLANO DA DISSERTAÇÃO

Tendo em conta a incidência de candidíase vulvovaginal descrita anteriormente, foi efectuado um trabalho de campo onde se pesquisou pela primeira vez a ocorrência de *Candida* spp. como agentes etiológicos de candidíase vulvovaginal e se identificaram as respectivas espécies. Para a prossecução deste trabalho foi necessário dispor, à partida, de um conjunto diversificado de estirpes isoladas de infecções vaginais humanas.

Este trabalho teve como objectivo principal a detecção e identificação rápida e específica de diferentes espécies de leveduras de interesse médico do género *Candida* presentes em amostras clínicas de exsudados vulvovaginais e estudar os padrões de resistência aos fármacos antifúngicos. Deste modo, foram ainda objectivos secundários:

1- Determinar a ocorrência e distribuição das diferentes espécies de *Candida* provenientes de amostras clínicas de exsudados vulvovaginais colhidos de pacientes residentes no Lubango, Huíla, Angola: *C. albicans*, a espécie patogénica oportunista mais frequentemente isolada, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii*, e outras consideradas relevantes.

2 - Aplicar métodos de detecção e identificação rápida e específica de diferentes espécies de leveduras de interesse médico do género *Candida*, aplicando métodos de biologia molecular.

3 - Determinar a susceptibilidade das estirpes isoladas aos fármacos antifúngicos mais utilizados no tratamento das infecções fúngicas humanas e avaliar a ocorrência de resistências.

4 - Comparar os resultados obtidos com as estirpes presentes em isolados recolhidos em Lubango, Huíla, sob o ponto de vista molecular e de resistência aos fármacos antifúngicos, com os obtidos em outros trabalhos realizados em Portugal com isolados portugueses.

Esta dissertação encontra-se dividida em quatro capítulos:

No primeiro capítulo é feita uma introdução geral sobre as leveduras patogénicas do género *Candida*, a sua importância na saúde humana, realçando a espécie *C. albicans* por ser a mais frequente, quais os seus factores de virulência e patogénese, os métodos convencionais disponíveis para a sua identificação e testes moleculares utilizados na

detecção das espécies mais frequentes, bem como os seus mecanismos de resistência a antifúngicos.

No segundo capítulo são descritos os métodos empregues no diagnóstico convencional e molecular para identificação de espécie. No primeiro está incluído o exame directo, a caracterização fenotípica e morfológica, o Teste da Blastese, o teste serológico e testes bioquímicos. No diagnóstico molecular são apresentados dois métodos para diferenciação de estirpes, um método baseado em PCR multiplex que permite a identificação de oito espécies de *Candida* e outro método baseado em RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*). É ainda apresentada a diferenciação das espécies *C. albicans* da *C. africana* através da amplificação do gene *HWP1*.

Por fim é ainda descrita a metodologia empregue no estudo da sensibilidade *in vitro* de estirpes de *Candida albicans* aos antifúngicos fluconazol, voriconazol, caspofungina e posaconazol, baseada na difusão em agar a partir de discos impregnados, segundo os procedimentos padronizados e publicados pelo CLSI.

No terceiro capítulo são apresentados os resultados obtidos no decorrer do estudo, assim como a sua discussão, comparando-os entre si e com os resultados obtidos por outros autores.

Por fim, no quarto capítulo são apresentadas as conclusões e considerações finais sobre os resultados obtidos neste trabalho.

Sendo considerado fundamental na determinação da gravidade e evolução clínica das infecções causadas por estas leveduras, os dados aqui obtidos poderão trazer como consequência um melhor entendimento e monitorização destas infecções no Hospital Maternidade Irene Neto na cidade do Lubango, Huíla, Angola, como também servir de modelo e referencial comparativo para este grave problema mundial, a candidíase vulvovaginal.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ORIGEM DAS ESTIRPES ESTUDADAS

2.1.1 Local e caracterização do estudo

O estudo foi realizado no Hospital Maternidade Irene Neto, município do Lubango, província de Huíla, ao sul de Angola. A recolha das amostras clínicas foi realizada ao longo de um período de dois meses.

O desenho do estudo foi realizado de acordo com os objectivos do trabalho previamente definidos. Tratou-se de um estudo descritivo e observacional, pois a epidemiologia observacional é, habitualmente, o primeiro passo no estudo de um estado de saúde/doença.

2.1.2 Aspectos Éticos

A pesquisa iniciou-se após a apreciação e aprovação pelo Conselho de Ética do instituto de Higiene e Medicina Tropical (CEIHMT) sob o registo número 12/2012 (ANEXO 1), Instituto Nacional de Aviação Civil (INAC) de Portugal, pelo Comité de Ética e Instituto de Saúde Pública do Ministério da Saúde de Angola, pela direcção da Maternidade Irene Neto do município do Lubango para colheita de amostras biológicas, e transporte das mesmas de Angola para Portugal. O presente estudo obedeceu aos princípios da beneficência, sem a identificação de existência de conflitos de interesses. Apenas os médicos ginecologistas e obstetras da Maternidade Irene Neto, foram informados dos resultados do diagnóstico laboratorial e dos resultados do estudo da susceptibilidade aos fármacos antifúngicos.

2.1.3 População estudada

A população estudada incluiu mulheres em idade fértil entre os 14 e os 61 anos. Responderam ao questionário mulheres (grávidas, não grávidas e mães de lactentes) residentes no Lubango, Huíla, admitidas na consulta de Ginecologia Obstetrícia do Hospital Maternidade Irene Neto (Huíla, Angola), com sintomas ou indicação clínica de candidíase vulvovaginal. Foram excluídas mulheres sem sintomatologia clínica de

candidíase vulvovaginal. A selecção das pacientes foi feita directamente pela própria investigadora.

Na entrevista foi utilizado um questionário para facilitar a comunicação com os sujeitos da pesquisa (ANEXO 3). A realização das entrevistas foi feita através de contacto directo, com apresentação prévia da proposta da pesquisa e aceitação de participação por parte da utente.

Foi garantido às participantes o total anonimato, sendo que os mesmos passaram a ser identificados através de um número. As participantes da pesquisa foram informadas sobre a justificação, benefícios, riscos potenciais, eventual desconforto e metodologia a ser utilizada. Ao concordar em participar do presente estudo assinaram a declaração de consentimento livre e esclarecida (ANEXO 2) e foram encaminhadas para uma sala reservada, garantindo a privacidade no atendimento.

2.2 COLHEITA DAS AMOSTRAS E ISOLAMENTO DAS LEVEDURAS

2.2.1 Recolha e transporte das amostras

As amostras biológicas foram recolhidas pela própria investigadora, por profissionais de laboratório da instituição, pelos enfermeiros da secção das DST e algumas pelas próprias doentes. Para esse efeito foram utilizados *Sterile Transport Medium Swabs*, formadas por uma zaragatoa esterilizada que, após a colheita, é introduzida num meio de transporte (Figura 2.1).

Estes meios não nutritivos proporcionam ao microrganismo protecção contra a desidratação e mantêm a viabilidade das amostras. Após a recolha, as amostras foram conservadas à temperatura de 4°C até serem transportadas dentro de um recipiente apropriado e refrigerado segundo as normas de Biossegurança, para o Laboratório de Micologia do Instituto de Higiene e Medicina Tropical em Lisboa, Portugal, para a realização dos estudos micológicos.



Figura 2.1 - Meios de transporte de amostras biológicas (*Sterile Transport Medium Swabs*).

2.2.2 Processamento laboratorial das amostras e obtenção dos isolados

A sementeira de todas as amostras recolhidas foi realizada no Laboratório de Micologia do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, em Lisboa, em meio selectivo de Sabouraud (1% peptona, 4% dextrose, 2% agar) adicionado de cloranfenicol. As culturas foram incubadas à temperatura de 30°C, possibilitando a obtenção de culturas puras. Este meio de cultura contém peptona e glucose, que favorecem o crescimento das leveduras e tem um pH entre 5 e 5,6 que dificulta o crescimento das bactérias, embora não o evite por completo. Por esta razão em algumas amostras houve a necessidade de utilizar meio de Sabouraud adicionado de cloranfenicol e gentamicina (Gelose Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol® ou SGC®, BioMerieux, França). A gentamicina inibe o crescimento da maioria das bactérias Gram positivas e Gram negativas e o cloranfenicol melhora a selectividade do meio em relação a algumas espécies de *Streptococcus* e *Proteus*, que possam eventualmente ser resistentes à gentamicina (Pereira, 2010).

Em alguns casos utilizou-se também meio de Sabouraud complementado com cicloheximida e cloranfenicol para o isolamento de espécies de *Candida* resistentes à cicloheximida. No entanto é preciso ter cuidado que este antibiótico pode inibir o crescimento de algumas espécies de *Candida*. Deste modo o meio com cicloheximida ajudou na selecção de alguns isolados resistentes, permitindo o isolamento selectivo de algumas estirpes e subsequente identificação convencional, molecular e estudo da susceptibilidade *in vitro*. Com algumas amostras foi ainda utilizado o meio líquido Yeast Extract Peptone Dextrose (YPD) para estimular o crescimento de leveduras que revelaram mais dificuldade de crescimento, sendo nesses casos utilizado apenas como alternativa no seu isolamento.

2.2.3 Manutenção e conservação dos isolados clínicos

Após o isolamento das leveduras em culturas puras, estas foram inoculadas em tubos com meio de Sabouraud simples e mantidas a 4°C para a realização dos trabalhos da tese. Deste modo os isolados podem manter-se viáveis durante alguns meses a um ano, dependendo do arejamento das culturas e da quantidade de meio de cultura. Para este efeito são preferíveis tubos com rolha de algodão para a manutenção de culturas viáveis durante mais tempo.

Para a conservação dos isolados por um período de tempo mais longo (anos) estes foram mantidos em criotubos, a -80°C . Para esse efeito, é retirado com a ansa um inoculo bem forte da cultura pura, o qual é homogeneizado em meio líquido de Sabouraud com 30% de glicerol. A homogeneização é feita emulsionando aos poucos o inóculo no meio de glicerol simples na parede interna do criotubo. Assim as culturas conservam-se viáveis durante cinco ou mais anos, preservando a degeneração ou a mutação dos isolados clínicos.

2.3 MÉTODOS CONVENCIONAIS DE IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS ISOLADAS

2.3.1 Observação directa das amostras clínicas

O diagnóstico convencional em Micologia Médica inclui sempre o exame directo das amostras biológicas e, neste caso, foi feito este exame em todos os exsudados vaginais recolhidos. Para clarificar as preparações, estas são montadas em hidróxido de potássio (KOH) a 20%. O KOH forma soluções fortemente alcalinas em água e outros solventes polares, degradando os elementos celulares, facilitando a clarificação das células fúngicas existentes nos isolados clínicos e a visualização da sua morfologia *in vivo*. Assim é possível a observação de células leveduriformes isoladas ou em gemulação, em geral de forma redonda ou oval, podendo ser alongadas, ou apresentar o desenvolvimento de pseudohifas ou verdadeiras hifas nas amostras de exsudados vaginais (Neufeld, 2009; Feuerschuetz *et al.* 2010).

O hidróxido de potássio a 20% foi preparado em ambiente estéril dentro de uma câmara de segurança biológica ou próximo do bico de Bunsen. Para a realização das preparações de exame directo coloca-se numa lâmina de microscópio uma porção da amostra biológica e, próximo desta, uma ou duas gotas de KOH 20% (Figura 2.2). Cobre-se a preparação com uma lamela e, para permitir que haja clarificação, somente se deve começar a examinar a preparação após

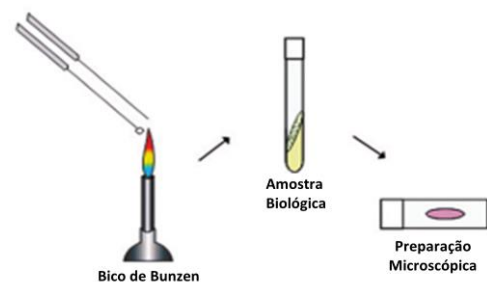


Figura 2.2: preparação do exame directo (Adaptado de Hofling & Reginaldo 2008)

trinta minutos. No entanto, é preciso ter cuidado porque no prazo de 1 a 2 horas ocorre a formação de cristais de KOH, inviabilizando a observação da preparação. Estas podem ser observadas em microscópio óptico de campo claro, inicialmente com ampliação de 100x e em seguida de 400x (Feuerschuette *et al.* 2010; Martins, 2010).

Para observar estas preparações após várias horas, estas devem ser guardadas em câmara húmida, ou seja, dentro de uma placa de vidro contendo um papel humedecido com água na base de modo a criar uma atmosfera húmida e evitar assim a desidratação do teste (Martins, 2010).

2.3.2 Isolamento em cultura e caracterização morfológica das leveduras

A identificação morfológica das leveduras inclui a observação macroscópica das colónias, seguida da sua observação microscópica. As características macroscópicas das colónias das leveduras podem variar ligeiramente com o meio de cultura, dependendo da sua constituição nutricional ou devido a diferentes períodos e temperaturas de incubação.

Todas as amostras estudadas neste trabalho foram inoculadas nas mesmas condições, em meio de Sabouraud com cloranfenicol, incubadas à temperatura de 30°C durante 48 horas. As características macroscópicas das culturas são úteis na diferenciação das leveduras em relação a fungos filamentosos e bactérias. A partir desta observação, apenas os isolados clínicos que apresentaram cultura positiva para levedura é que foram isolados em novas culturas para posterior diagnóstico e estudo.

O meio de cultura de agar de eosina e azul-de-metileno (EMB) modificado por Levine (Carneiro, 2007) pode ser utilizado para a observação das estruturas microscópicas identificadoras das diferentes espécies de *Candida*. Para tal, as leveduras crescidas em outros meios de cultura devem ser inoculadas no meio de EMB e incubadas a 29°C. A observação da micromorfologia deve ser realizada ao fim de 24, 48 ou 72 horas dependendo da taxa de crescimento do microrganismo.

2.3.3 Prova do tubo germinativo ou Teste da Blastese

A técnica é muito simples e permite fundamentalmente a identificação presuntiva da espécie *C. albicans*. A partir da cultura pura retira-se um pouco de levedura e suspende-se em contendo cerca de 200µl de soro humano, num tubo eppendorf, obtendo no final

uma suspensão homogénea (Oliveira, 2012). Em vez de soro humano pode-se usar também soro esterilizado de bovino, coelho, cavalo ou clara de ovo.

Com o auxílio da ansa, começa-se por humedecer a levedura na parede interior do tubo eppendorf próximo da superfície do líquido e, aos poucos, adicionando pequenas quantidades de soro, liquefaz-se a porção pastosa da levedura até se obter uma suspensão cada vez mais líquida e homogénea. No final a suspensão é agitada no vortex. Os tubos são incubados no termobloco à temperatura de 37°C durante um período de 2 horas e 30 minutos. É importante não ultrapassar as 3 horas porque, após esse período, outras espécies do género *Candida* também podem formar pseudofilamentos que podem ser confundidos com tubos germinativos.

Findo o tempo de incubação, deposita-se uma gota da suspensão sobre uma lâmina de microscopia, cobre-se com uma lamela e examina-se ao microscópio óptico, primeiro com ampliação de 100x e depois 400x. Microscopicamente observa-se a presença de estruturas tubulares (tubos germinativos), na forma de filamentos pequenos, curtos e finos que se formam a partir de alguns blastoconídios, sem formar constrição com a célula-mãe.

No entanto, é necessário ter algumas precauções na realização desta prova para que se obtenham resultados fidedignos. Como a capacidade de produção de tubos germinativos é inversamente proporcional à quantidade de inóculo de levedura, a suspensão do inóculo utilizada não deve ser à partida demasiado densa. A incubação não deve exceder as 3 horas para que leveduras não-*albicans* produzam pseudofilamentos (que apresentam constrição), que induzem a falsas identificações de *C. albicans*. Ainda para evitar falsos positivos não devem ser utilizadas culturas com colónias envelhecidas para não transferir verdadeiras hifas para o soro.

Os isolados clínicos com resultado negativo ou inconclusivo no Teste da Blastese, foram submetidos ao teste bioquímico API ID32C® (BioMerieux, França) e testes moleculares por PCR multiplex e RFLP.

2.3.4 Identificação bioquímica das leveduras

O método bioquímico API ID32C® foi utilizado para a identificação convencional dos isolados clínicos de *Candida* não-*albicans* incluídos nesta dissertação. Esta técnica

baseia-se na capacidade das leveduras em utilizar determinados substratos para manter a sua viabilidade celular, como por exemplo, alguns carboidratos como única fonte de carbono.

O ID32C[®] é um sistema padronizado (galerias ID 32C[®], bioMérieux) para a identificação das leveduras com 32 cúpulas em que cada cúpula contém um substrato desidratado carbonado ou azotado como única fonte de carbono ou de azoto, respectivamente (Figura 2.3).



Figura 2.3. Galeria de identificação ID 32C[®]

Preparação do inóculo

Para a preparação do inóculo foram utilizadas colónias puras isoladas crescidas em 24-48 horas. Num eppendorf com 2 ml de solução API Suspension Médium[®] (BioMérieux) colocou-se uma porção da cultura, suspendendo-a até se obter uma suspensão homogénea. A turvação da suspensão foi ajustada de modo a obter uma opacidade equivalente ao valor 2 da escala de McFarland. Com uma pipeta, transferiram-se 250 µl desta suspensão para o meio de uma ampola de API[®] Suspension Medium (bioMérieux) e, após a homogeneização da suspensão da levedura a analisar, foram distribuídos 135 µl em cada cúpula da galeria ID 32C[®]. A tampa foi colocada e a galeria incubada a 30°C, seguindo as instruções do fabricante.

Leitura das galerias

Durante a incubação a levedura irá assimilar e crescer ou não na presença dos diferentes substratos, de acordo com o metabolismo característico da sua espécie. A leitura da galeria é feita em função da presença ou ausência de turvação resultante da

presença ou ausência de crescimento da levedura. Todas as cúpulas onde se observou turvação foram consideradas positivas pois indicaram que o substrato foi assimilado pela levedura e esta cresceu (Barbedo & Sgarbi, 2010). Foram consideradas negativas as cúpulas que não apresentaram turvação. Os resultados obtidos da leitura das reações do teste foram codificados num perfil numérico que depois foi introduzido manualmente no programa informático APILAB[®] (BioMerieux), que se encontra ligado a uma base de dados *online*, levando à identificação da espécie, juntamente com as seguintes informações:

- Percentagem de identificação (% id), que avalia a proximidade relativa do perfil observado aos perfis das várias espécies da base de dados;
- Índice T (varia entre 0 e 1) e exprime a proximidade relativa da estirpe observada ao perfil mais típico da base de dados;

A interpretação sobre a qualidade da identificação tem em conta os dois parâmetros acima descritos, a qual está esquematizada na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 - Interpretação da qualidade das identificações pelo sistema ID 32 C[®].

Qualidade de identificação	% id	T
Excelente	≥ 99,9	≥ 0,75
Muito boa	≥ 99,9	≥ 0,5
Boa	≥ 90,9	≥ 0,5
Aceitável	= 80,0 a 90,0	= 0 a 0,25

A partir do perfil numérico obtido para cada isolado existem cinco possibilidades de identificação:

- Identificação da espécie - uma única espécie é selecionada.
- Identificação ao nível da espécie - são propostos 2,3 ou 4 biótipos da mesma espécie.
- Identificação ao nível do género - são propostos 2,3 ou 4 espécies do mesmo género.
- Fraca discriminação - as espécies propostas pertencerem a géneros diferentes.
- Perfil duvidoso - o perfil não consta da base de dados, o que pode acontecer se for um perfil atípico ou quando a frequência de ocorrência deste perfil é muito baixa.

2.4 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS LEVEDURAS ISOLADAS

2.4.1 Identificação de espécies do género *Candida* por PCR multiplex

Primerse reacção de amplificação

A técnica de PCR multiplex permite a identificação rápida das oito espécies mais comuns de *Candida* como agentes etiológicos de infecção, com apenas uma única reacção de PCR (Carvalho *et al.* 2007). Nesta reacção é utilizado um par de *primers* universais específicos para fungos, UNI1 e UNI2, que amplificam as regiões ITS1 e ITS2 do rRNA, incluindo a subunidade génica 5,8S e oito *primers* específicos para as diferentes espécies mais comuns. Na figura 2.4 estão representados esquematicamente os locais de hibridação dos *primers* universais e específicos para as espécies do género *Candida*.



Figura 2.4: Esquema representativo da organização dos genes ribossómicos e dos *primers* universais e específicos utilizados na reacção da multiplex-PCR. As setas representam a direcção da amplificação dos fragmentos na reacção de PCR (Carvalho *et al.* 2007).

As espécies identificadas por este método são: *C. albicans* (Calb), *C. krusei* (Ckru), *C. parapsilosis* (Cpar), *C. tropicalis* (Ctro), *C. lusitaniae* (Clus), *C. guilliermondii* (Cgui), *C. dubliniensis* (Cdub) e *C. glabrata* (Cgla).

Na Tabela 2.2 estão representadas as concentrações utilizadas na mistura dos *primers* universais e específicos de espécie (MWG Oligo Sythesis-Biotech, Alemanha) para obtenção de um volume final de 100 µl.

Tabela 2.2: Concentração de cada *primer* utilizado na reacção de PCR multiplex.

<i>Primers</i>	Volume	<i>Primers</i>	Volume
UNI1	11 µl	<i>C. glabrata</i>	4 µl
UNI2	11 µl	<i>C. parapsilosis</i>	5 µl
<i>C. albicans</i>	3 µl	<i>C. guilliermondii</i>	1 µl
<i>C. krusei</i>	3 µl	<i>C. lusitaniae</i>	4 µl
<i>C. tropicalis</i>	4 µl	<i>C. dubliniensis</i>	8 µl

Em cada reacção de PCR foi usada a mistura reaccional cujos reagentes e respectivas concentrações estão apresentados na Tabela 2.3.

Tabela 2.3: Mistura reaccional usada nas reacções de PCR multiplex para a identificação de isolados clínicos do género *Candida*.

Reagente	Concentração final	Volume (µl)
Água bidestilada	-	15,42
Tampão 10x	0,8x	1,28
MgCl ₂ 100mM	3,5mM	0,7
dNTPs (10 mM cada)	250µM cada	0,4
Mistura de <i>Primers</i> 5µM	0,8µM	1,0
Taq polimerase 5U/µl	1 U	0,2
Células de levedura (1 colónia)	Com um palito tirar <u> muitíssimo pouco </u> de uma colónia com 2 a 4 dias de crescimento	

Na reacção de PCR foi utilizada a enzima Taq DNA polimerase, BIOTAQ[®] DNA Polymerase (Bioline, Alemanha) e foi realizada num termociclador Tpersonal[®] (Biometra, Alemanha). O programa consistiu numa desnaturação inicial de 10 minutos a 94°C, 40 ciclos de amplificação de 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C e 45 segundos a 65°C, finalizando com 2 minutos a 65°C.

Os produtos amplificados foram visualizados após electroforese em gel de agarose 1,5% (p/v) em TBE 0,5x. Foi utilizado o marcador de pesos moleculares Gene Ruler 100pbm DNA Ladder Plus[®] (0,5mg DNA/ml) (FERMENTAS, Canada).

Após a reacção de amplificação por PCR com os *primers* referidos a dimensão dos fragmentos esperados está representada na Tabela 2.4 e na Figura 2.5.

Para qualquer outra espécie de fungo para o qual não exista um *primer* específico, a reacção de PCR multiplex vai dar origem a apenas uma banda de dimensão desconhecida, referente à dimensão da sua região ITS amplificada com os *primers* universais UNI1 e UNI2.

Tabela 2.4: *Primers* específicos para cada espécie e dimensão dos fragmentos esperados após amplificação o PCR multiplex (Carvalho *et al* 2007).

Espécies	Primer	Sequência (5 – 3)	Dimensão dos fragmentos esperados
Primers Universais para fungos	UNI1	GTCAAACCTGGTCATTTA	950/970
	UNI2	TTCTTTTCCTCCGCTTATTG	
<i>Candida albicans</i>	C.alb	AGCTGCCGCCAGAGGTCTAA	583/446
<i>Candida glabrata</i>	C.gla	TTGTCTGAGCTCGGAGAGAG	929/ 839
<i>Candida tropicalis</i>	C.tro	GATTTGCTTAATTGCCCCAC	583/507
<i>Candida parapsilosis</i>	C.par	GTCAACCGATTATTTAATAG	570/370
<i>Candida krusei</i>	C.kru	CTGGCCGAGCGAACTAGACT	590/169
<i>Candida lusitanae</i>	C.lus	TTCGGAGCAACGCCTAACCG	433/ 329
<i>Candida guilliermondii</i>	C.gui	TTGGCCTAGAGATAGGTTGG	668/ 512
<i>Candida dubliniensis</i>	C.dub	CTCAAACCCCTAGGGTTTGG	591/ 217

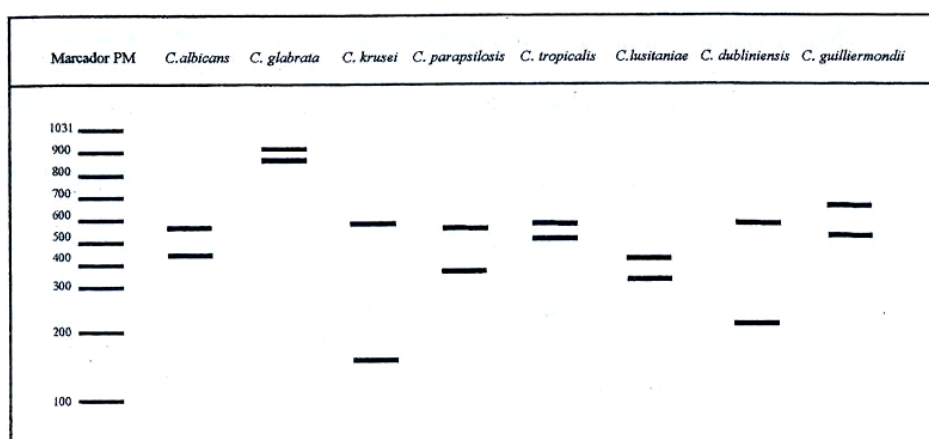


Figura 2.5 Esquema representativo das bandas esperadas depois da amplificação por PCR multiplex.

Deteção dos produtos de amplificação

Para a deteção dos produtos de amplificação realizou-se uma electroforese em gel de agarose (Gibco, BRL, Reino Unido) a 1,5% (p/v) em TBE 0,5x, corado com brometo de etídio (Sigma, USA) (0,5µg/ml) incorporado, a 50 volts, durante 60 minutos. Ao produto da reacção de PCR foi adicionada solução de tampão de arrastamento – tampão azul de bromofenol (30% (p/v) glicerol, 0,25% azul de bromofenol, 2mM EDTA). O marcador de pesos moleculares utilizado foi Gene Ruler® 100 bp DNA Ladder Plus® (0,5mg DNA/ml) (FERMENTAS, Canada) e permitiu visualizar as bandas através de um transiluminador de luz UV.

2.4.2 Identificação de espécies mais comuns do género *Candida* por RFLP da região ITS do rDNA

Nesta dissertação aplicou-se a técnica de PCR-RFLP para a identificação de isolados clínicos que não foi conclusiva através da reacção de PCR multiplex. A análise dos polimorfismos de fragmentos de restrição ou RFLP é um método relativamente rápido e simples de executar, mas requer que o DNA das leveduras seja previamente extraído.

Extracção de DNA de *Candida* spp.

A extracção do DNA de cada isolado clínico incluído neste estudo foi feita utilizando o método das microesferas. A extracção foi realizada a partir de amostras previamente inoculadas durante pelo menos 48 horas à temperatura 28 a 30°C em meio sólido Sabouraud agar com cloranfenicol. Neste método estão contemplados três tipos de lise que permitem a obtenção de DNA em grande quantidade: lise física por alternância de temperatura, lise mecânica providenciada pela agitação intensa das microesferas de vidro, e lise química provocada pelos constituintes do tampão de lise.

Num tubo eppendorf de 1,5 ml contendo um volume equivalente a 200 µl de microesferas de vidro (SIGMA, ref^a G8772) de 0,4-0,6 mm de diâmetro adicionaram-se 500 µl de Tampão de Lise (Tris 50 mM, NaCl 250 mM, EDTA 50 mM, SDS 0,3 % (p/v), pH 8. Fez-se uma suspensão celular da levedura, muito densa e esta foi fortemente agitada no vortex durante 3 minutos. Em seguida foi incubada no termobloco a 65°C durante 1 h, após o que foi novamente agitada no vortex durante 3

minutos e centrifugada durante 10 minutos a 13000 rpm. Recuperou-se o sobrenadante, que contém o DNA, para um novo tubo e guardou-se a -20°C. O DNA nestas condições mantém-se em bom estado por um período superior a um ano. Para utilizar o DNA em reacções de PCR foi feita uma diluição da extracção de DNA de 1:750 em água destilada Braun e guardaram-se alíquotas de 100 µl a -20°C. Assim diluído, o DNA mantém-se em bom estado durante alguns meses.

Amplificação da região ITS do rDNA

A amplificação da região ITS do DNA ribossómico é feita por PCR utilizando os *primers* universais ITS1 e ITS4 cuja sequência está descrita na Tabela 2.5.

Tabela 2.5: Sequência oligonucleotídica dos *primers* ITS1 e ITS4.

<i>Primer</i>	Sequência
ITS1 (<i>forward</i>)	5'-TCC GTA GAA CGT GCG G-3'
ITS4 (<i>reverse</i>)	5'-TCG TCG GCT TAT TGA TAT GC-3

A mistura reaccional para a amplificação da região ITS (regiões ITS1 e ITS2 e subunidade 5,8S) do rDNA de cada amostra está esquematizada na Tabela 2.6:

Tabela 2.6: Mistura reaccional da reacção de PCR para a amplificação da região ITS dos isolados clínicos de *Candida* sp.

Solução stock	Concentração final	Volume por tubo (µl)
Água destilada Braun	-	12
Tampão 10x	1x	2,5
MgCl ₂ 25m M	3,5 mM	2,0
dNTPs 1,25mM	250 µl cada	2,5
Mix <i>Primers</i> 5 µM	0,8 µM cada	0,8
Taq polymerase	1U	0,2
DNA 1:750	1:1750	5,0

A reacção de PCR ocorreu num termociclador Tpersonal Combi® (Biometra) com o ciclo esquematizado na Tabela 2.7.

Tabela 2.7: Programa de PCR utilizado na amplificação da região ITS do rDNA dos isolados clínicos de leveduras do género *Candida*.

Temperatura	Desnaturação inicial 95°C°	x 40 ciclos			Extensão final 72C°
		Desnaturação 94°C	Hibridação dos primers 60°C	Extensão 72°C	
Tempo	6 minutos	60 segundos	60 segundos	60segundos	6 minutos

Detecção dos produtos amplificados

Os produtos amplificados foram detectados por electroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio. A sua composição está esquematizada na Tabela 2.8 para um volume final de 50 ml.

Tabela 2.8: Composição de um gel de agarose de 50 ml para visualização dos produtos de amplificação da região ITS dos isolados clínicos de leveduras do género *Candida*.

Gel de agarose a 1%	
Agarose	0,5 g
TBE 10%	50 ml
Brometo de etídio	6 µl

O gel foi preparado num Erlenmeyer, dissolvendo a agarose em TBE 0,5x (1,0mM Tris; 0,9mM ácido bórico; 0,01 mM EDTA, pH 8) por aquecimento até a mistura ficar homogénea e não se visualizarem grânulos de agarose.

Adiciona-se o brometo de etídio à agarose já cozida e verte-se a agarose sobre o suporte com o pente previamente colocado para polimerizar. Para acelerar a polimerização pode-se colocar o suporte com o gel à temperatura de 4°C. Depois de polimerizado, o gel é colocado na tina de electroforese previamente cheia com tampão TBE 0,5x.

Adicionam-se 2 µl de corante de corrida (azul de bromofenol) a 8 µl de cada amostra e a mistura é aplicada no gel bem como o marcador de pesos moleculares (Gene Ruler DNA 100 pb - Invitrogen). A electroforese em gel de agarose decorreu à temperatura ambiente durante 30 minutos a 100V. As bandas correspondentes à região ITS foram

visualizadas num transiluminador de luz UV e as imagens captadas e digitalizadas com um sistema UVIDOC® (Alfagene) permitindo a visualização das bandas (Tabela 2.9).

Tabela 2.9: Dimensão dos fragmentos esperados após amplificação da região ITS do rDNA com os primers ITS1 e ITS4 e restrição com a enzima *MspI*.

Espécie	Região ITS (pares de bases)
<i>C. albicans</i>	297, 238
<i>C. glabrata</i>	557, 314
<i>C. parapsilosis</i>	520
<i>C. krusei</i>	261, 249
<i>C. tropicalis</i>	340, 184
<i>C. lusitaniae</i>	nd

nd-não determinado

Restrição da região ITS do rDNA

As enzimas de restrição clivam o DNA em locais definidos reconhecendo e actuando sobre sequências específicas de DNA. Destroem as ligações fosfodiester entre nucleótidos adjacentes numa cadeia polinucleotídica consecutivos ligados a essas determinadas bases. Os nucleótidos entre os quais a enzima corta, ou seja, entre os quais promove a hidrólise, encontram-se no interior dessas mesmas sequências específicas de reconhecimento. Neste trabalho foi utilizada a enzima de restrição *MspI* (Promega) cuja sequência de corte está descrita na Tabela 2.10.

Tabela 2.10: Sequência e região de corte identificada pela enzima de restrição *MspI* (seta).

Enzima	Sequência
<i>MspI</i>	C↓CG G G GC↑C

Os tubos com produtos de PCR com a região ITS amplificada foram mantidos no gelo. A seguir, para cada isolado a testar, preparou-se a mistura reaccional pipetando os reagentes e quantidades pela ordem apresentada na Tabela 2.11.

Tabela 2.11: Mistura reaccional utilizada em cada reacção de restrição com a enzima *MspI* para a identificação de isolados clínicos do género *Candida*.

Solução stock	Volume por tubo (μ l)
Água destilada (Braun®)	16,3
Tampão RE 10x	2,0
Tampão BSA acetilado, 10 μ g/ μ l	0,2
Enzima <i>MspI</i> , 10 μ g/ μ l	0,5

Adicionou-se 1 μ l do produto de amplificação de cada amostra a cada tubo de 0,2 μ l contendo a mistura reaccional, perfazendo um volume final de reacção de 20 μ l.

A mistura reaccional foi incubada a uma temperatura óptima de actuação seguindo as instruções do fabricante. No caso da enzima *MspI* a temperatura óptima de actividade é de 37°C e a reacção de restrição decorreu no espaço de 2 horas.

Detecção dos fragmentos de restrição

Os produtos de restrição foram detectados por electroforese em gel de agarose a 2% em TBE 0,5x (1,0mM Tris; 0,9 mM ácido bórico; 0,01 mM EDTA, pH 8) corado com brometo de etídio tal como se encontra exposto na Tabela 2.12.

Tabela 2.12: Composição do gel de agarose para visualização dos produtos de restrição com a enzima *MspI* para a identificação de isolados clínicos do género *Candida*.

Gel de agarose a 2%	
Agarose	1,0 g
TBE 0,5x	50 ml
Brometo de etídio	6 μ l

À agarose adicionaram-se 6 μ l brometo de etídio e, antes da sua polimerização, verteu-se a agarose sobre o suporte com o pente colocado para permitir a formação dos poços. Para acelerar a polimerização pode-se colocar o suporte no frigorífico, à temperatura de 4°C. Depois de polimerizado, o gel foi colocado na tina de electroforese com tampão TBE 0,5x.

Adicionaram-se 2 µl de tampão de carga do gel (azul de bromofenol) a 20 µl da amostra e a mistura foi aplicada nos poços do gel de agarose. Aplicou-se no primeiro poço o marcador de peso molecular (Gene Ruler DNA 100 pb[®]), dissolvido no mesmo tampão de carga. A electroforese em gel de agarose decorreu à temperatura ambiente a uma voltagem de 50V durante 100 minutos. As bandas correspondentes à restrição da região ITS pela enzima *MspI* foram visualizadas num transiluminador de luz UV e as imagens captadas e digitalizadas com um sistema UVIDOC[®], Alfagene.

O resultado final em gel de agarose apresentou uma série de bandas de diferentes dimensões, relativas às espécies *Candida* consideradas na investigação (anexo 6, Tabela 3). A coincidência de posição entre as bandas das estirpes testadas e as estirpes padrão, permitiram a identificação dos microrganismos (Mirhendi *et al.* 2006).

2.4.3 Detecção da espécie *Candida africana*

A amplificação do gene *HWP1* foi realizada para todos os isolados clínicos cuja identificação molecular da espécie foi *C. albicans* a fim de detectar a existência de isolados de *C. africana*, visto que os métodos convencionais não possibilitarem essa distinção.

Preparação do DNA para PCR

O DNA dos isolados clínicos foi extraído segundo a metodologia anteriormente descrita (ver 2.4.2). Para a reacção de PCR foi utilizada a diluição de 1:750.

Primers utilizados na reacção de PCR

A amplificação do gene *HWP1* foi feita utilizando os *primers* CR-f e CR-r cuja sequência é apresentada na Tabela 2.13 (Romeo & Criseo, 2008).

Tabela 2.13: Sequência oligonucleotídica dos primers CR-f e CR-r para diferenciação da espécie *C. africana* de *C. albicans* por PCR.

<i>Primer</i>	Sequência
CR-f (<i>forward</i>)	5'-GCT ACC ACT TCA CAA TCA TCA TC-3'
CR-r (<i>reverse</i>)	5'-GCA CCT TCA GTC GTA GAG AGC-3'

Amplificação do gene *HWP1* por PCR

De acordo com Romeo e Criseo (2008), para um volume final de 25 μ l, deve-se efectuar uma mistura racional da reacção para a amplificação do gene *HWP1* de cada isolado clínico conforme está esquematizada na Tabela 2.14.

O PCR foi realizado num termociclador Tpersonal Combi (Biometra) e o ciclo de PCR compreendeu um pré aquecimento à temperatura de 95°C durante 10 minutos, 30 ciclos de 45 segundos a 95°C, 40 segundos a 58°C, 55 segundos a 72°C, com extensão final a 72°C durante 10 minutos.

Tabela 2.14: Mistura reaccional usada nas reacções de PCR para amplificação do gene *HWP1* dos isolados clínicos de leveduras da espécie *C. albicans*.

Solução stock	Concentração final	Volume (μ l)
Água bidestilada	-	18,25 μ l
Tampão (10x)	1x	2,5 μ l
MgCl ₂ (25mM)	3,5 mM	1,5 μ l
dNTPs (10 mM)	0,2 mM	0,5 μ l
<i>Primers</i> 50pmol/ μ l (mix do par)	CR-f(<i>forward</i>) CR-r (<i>reverse</i>)	2 pmol/ μ l (0,5 de cada <i>primer</i>)
Taq polimerase 5U/ μ l	1U	0,25 μ l
DNA genómico (1:750)	-	1 μ l

Detecção dos produtos amplificados

Os produtos amplificados foram detectados utilizando procedimento semelhante ao descrito anteriormente (2.4.1 e 2.4.2) tendo sido apenas alterada a percentagem de agarose utilizada no gel para 1,3%, o volume de solução de tampão de arrastamento para 3 μ l e de produto de PCR para 10 μ l.

A electroforese decorreu a 50V durante 60 minutos, à temperatura ambiente. As bandas correspondentes aos fragmentos do gene *HWP1* foram visualizadas num transiluminador de luz UV e as imagens captadas e digitalizados com um sistema UVIDOC, Alfacene. Os produtos amplificados foram comparados com dimensões descritas em Romeo & Criseo (2008): ~1000 pb para *C. albicans*, ~700 pb para *C. africana* e 570 pb para *C. dubliniensis*.

Para as amostras que inicialmente não amplificaram, ou seja, que não apresentaram banda, houve a necessidade ajustar o volume de DNA para 2 µl na mistura reaccional para a identificação das mesmas.

2.5 ESTUDO DA SENSIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS PELO MÉTODO DE KIRBY-BAUER

O método de difusão em disco foi descrito e desenvolvido em 1966, a partir das pesquisas de Kirby e de Bauer. É um dos métodos de suscetibilidade mais simples, confiável e utilizado pelos laboratórios de microbiologia clínica. O teste de difusão em disco é realizado em placas de petri com meio de cultura Müeller-Hinton, suplementado com 2% de dextrose e 0,5 µg/ml de azul-de-metileno, conforme é recomendado pelo CLSI M44-A, pois permite uma melhor visualização e definição dos limites dos halos de inibição.

2.5.1 Preparação do Inóculo da levedura

Num eppendorf contendo 500 µl de água destilada esterilizada ou soro fisiológico esterilizado colocaram-se, com ajuda de uma ansa, algumas colónias retiradas de uma cultura com 24-48h de crescimento. O inóculo foi preparado suspendendo-as pouco a pouco até apresentarem uma turvação homogénea equivalente ao valor 0,5 da escala de McFarland, que equivale a uma suspensão com cerca de $1 \text{ a } 5 \times 10^6$ células/ml.

2.5.2 Inoculação das placas

Antes de se fazer o inóculo, o meio de cultura sólido de Müeller-Hinton agar, deve estar à temperatura ambiente com a superfície firme e seca. Em seguida, uma zaragatoa esterilizada foi imersa na suspensão da levedura e rolada sob pressão contra as paredes do eppendorf acima do nível do líquido para retirar o excesso de inóculo. Com a mesma zaragatoa humedecida foi feita a inoculação, com estrias apertadas, em toda a superfície do meio, em três direcções diferentes (Figura 2.6), com o cuidado de não fazer demasiada pressão para não rasgar o meio de cultura. As placas foram incubadas

durante cerca de 10 minutos à temperatura ambiente antes da aplicação dos discos com antifúngico, para permitir a absorção de todo o inoculo pelo meio de cultura.

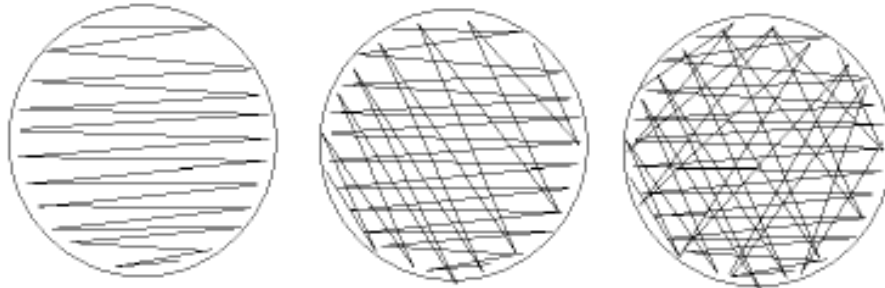


Figura 2.6: Representação esquemática do modo de inoculação das placas para a realização dos testes de susceptibilidade por difusão a partir de disco.

2.5.3 Aplicação dos discos de antifúngico

Nesta investigação foram utilizados discos comercialmente disponíveis, previamente impregnados dos antifúngicos: fluconazol (25 µg, Oxoid[®], Inglaterra), voriconazol (1 µg, Oxoid[®], Inglaterra), posaconazol (5 µg, Liofilchem[®], Itália e Rosco[®], Dinamarca), caspofungina (5 µg, Liofilchem[®], Itália e Rosco[®], Dinamarca).

Após a inoculação foram colocados os discos na superfície do meio de cultura inoculado, pressionado ligeiramente o disco para este aderir completamente à superfície do meio de Mueller-Hinton. As placas foram incubadas à temperatura de 30°C durante 48 horas, após o que os diâmetros dos halos de inibição de crescimento em redor de cada disco foram medidos.

2.5.4 Interpretação dos resultados

A medição e interpretação dos testes de sensibilidade aos antifúngicos foram feitas através do sistema BIOMIC (Expert-System Giles Scientific inc., Santa Barbara, EUA) a partir do registo do diâmetro do halo de inibição, utilizando os critérios estabelecidos pelo CLSI na norma M44-A.

Desta maneira, os isolados clínicos são classificados em sensíveis (S), resistentes (R) ou sensível dependente da dose (SDD). Os *breakpoints* para os diferentes antifúngicos estudados estão representados na Tabela 2.15. Na maioria das situações clínicas, o teste qualitativo é suficiente para orientar a escolha terapêutica, mas em algumas situações, é necessário quantificar a susceptibilidade (sensibilidade ou resistência) isto é, fazer a detecção da concentração mínima inibitória (CMI). Neste caso, será necessário recorrer a métodos quantitativos.

Se os isolados clínicos forem sensíveis (S) ao antifúngico, a infecção por uma estirpe desta categoria pode ser apropriadamente tratada com a dose de agente antimicrobiano recomendada, se forem resistentes (R) não serão inibidas pelas concentrações sistêmicas que se obtêm após a dose normal do agente antimicrobiano e se forem sensíveis dependendo da dose (SDD), a sensibilidade depende se se atingir a concentração sistêmica máxima possível de antifúngico.

Tabela 2.15: Diâmetro dos halos de inibição para a classificação da susceptibilidade aos antifúngicos de acordo com o CLSI.

Antifúngico	Concentração de fármaco no disco (µg)	S	SDD	R
Casposfungina*	5 µg	16mm	15-13mm	≤ 12mm
Posaconazol*	5µg	≥ 17mm	16-14mm	≤ 13mm
Voriconazol	1 µg	≥ 19 mm	14 – 16 mm	≤ 13 mm
Fluconazol	25µg	≥ 17 mm	15 – 18 mm	≤ 14 mm

Legenda: S=Sensível, SDD=Sensível dependente da dose, R=Resistente. *Testados discos Liofilchem e Rosco.

De acordo com a norma M44-A do CLSI, quando as CMIs se encontram no limiar entre duas categorias, a sensibilidade do isolado deverá ser classificada sempre na categoria superior.

2.5.5 Controle de qualidade

A realização de um controle de qualidade rigoroso é obrigatório quando se testa a susceptibilidade aos fármacos *in vitro* porque um grande número de variáveis pode afectar o teste de sensibilidade aos antifúngicos. Para tal utilizam-se estirpes de

referência padrão como por exemplo, as estirpes *C. albicans* ATCC 90028 e *C. parapsilosis* ATCC 22019 que foram testadas em cada série de testes efectuada. Os diâmetros dos halos de inibição para estas estirpes de referência estão representados na Tabela 2.16.

Tabela 2.16: Intervalo dos diâmetros dos halos de inibição recomendados para as estirpes de referência utilizadas no controlo de qualidade *C. albicans* ATCC 90028 e *C. parapsilosis* ATCC 22019.

Antifúngico	Concentração do disco (µg)	ATCC 90028 (Ø mm)	ATCC 22019 (Ø mm)
Fluconazol	25	28- 39	22 - 33
Voriconazol	1	31-42	28 - 37
Caspofungina	5	nd	nd
Posaconazol	5	20 - 26	22 - 28

nd-não determinado.

Para evitar interferências, que possam dificultar a leitura e interpretação dos halos após a incubação, está padronizado que o inoculo não deve ser muito denso para evitar falsos resistentes e que cada placa de petri deverá ter um número limite de discos em função do seu tamanho para que os halos não se justaponham.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ORIGEM DAS ESTIRPES

Na última década a problemática das infecções causadas por leveduras do género *Candida* tem ocupado uma posição desta que devido o advento de vários factores de risco relacionados ao hospedeiro (Barbedo & Sgarbi, 2010). Em Angola os dados sobre as infecções vulvovaginais provocadas por leveduras *Candida* sp., são escassos ou mesmo inexistentes em certas regiões. Participaram na presente pesquisa 159 pacientes que recorreram a consultas de ginecologia e obstetrícia do Hospital Maternidade Irene Neto, da província de Huíla, Angola, no período entre Agosto e Outubro de 2012 com suspeita e manifestações clínicas compatíveis de candidíase vulvovaginal.

A faixa etária das pacientes que participaram nesta pesquisa variou entre 14-61 anos de idade. Verificou-se que as manifestações clínicas de vulvovaginite e diagnóstico de candidíase vulvovaginal foram mais prevalentes em pacientes entre os 18 aos 42 anos de idade. Num estudo idêntico realizado em Nairobi, Kenya reportou também que a maior parte das pacientes que participaram do mesmo e nas quais foi diagnosticada candidíase vulvovaginal foram jovens com idade inferior aos 40 anos (Namkinga, 2012). Das 159 pacientes com suspeita clínica de candidíase vulvovaginal que foram observadas neste trabalho, 96 (60%) revelaram estar infectadas por leveduras do género *Candida*. Observou-se que esta tendência está de acordo com as observações de Sobel (2010) e Campos *et al.* (2011) onde reportam que 75% das mulheres em idade fértil têm pelo menos um episódio de candidíase vulvovaginal ao longo da vida.

Estudos prospectivos feitos em outros países africanos como Tanzânia, Nigéria e Kenya relatam que têm sido associados diversos factores de risco com a ocorrência da candidíase vulvovaginal em pacientes que recorrem a consulta de ginecologia e obstetrícia, como a gravidez, a imunodepressão, a automedicação, os materiais das roupas íntimas, entre outros (Namkinga, 2012).

Relativamente aos factores de risco, do total das pacientes estudadas neste trabalho, 30 eram gestantes e tinham suspeita clínica de candidíase vulvovaginal. Destas, 19

(63,3%) encontravam-se no segundo trimestre de gestação, usavam roupa interior sintética e foi confirmada terem candidíase vulvovaginal (Figura 3.1).

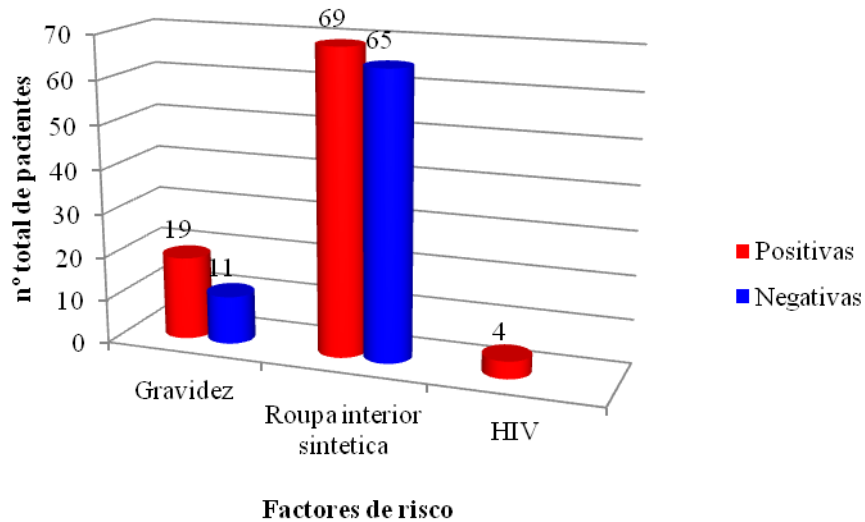


Figura 3.1: Relação entre os factores de risco e positividade das culturas para candidíase vulvovaginal.

Das restantes 11 pacientes (36,7%) obtiveram-se culturas negativas. Foi verificado o uso de roupa interior sintética apertada em 134 pacientes, das quais 69 (51%) se obteve cultura positiva a partir da secreção vaginal para *Candida* sp. e, em 65 (49%), cultura negativa. Também se verificou que em relação às quatro pacientes portadoras do vírus de imunodeficiência humana (VIH) observadas, todas tiveram cultura positiva para estefungo (100%).

As pacientes apresentaram factores predisponentes para o desenvolvimento de infecção por leveduras do género *Candida*. Em vários estudos multicêntricos relatam que em mulheres gestantes, à medida que a gravidez progride, há um aumento dos níveis hormonais havendo probabilidade de colonização vaginal por *Candida* sp. duas vezes mais do que em relação às mulheres não grávidas. A gestante apresenta um aumento nos níveis de estrogénios e, em consequência, também um aumento da quantidade de glicogénio na mucosa vaginal. Devido ao aumento do glicogénio, o pH da mucosa vaginal diminui tornando-a mais ácida, permitindo o crescimento da levedura que já estava presente (Roberts *et al.* 2011). Analisando a Figura 3.1 pode-se dizer que possivelmente houve uma associação entre a gestação e a candidíase

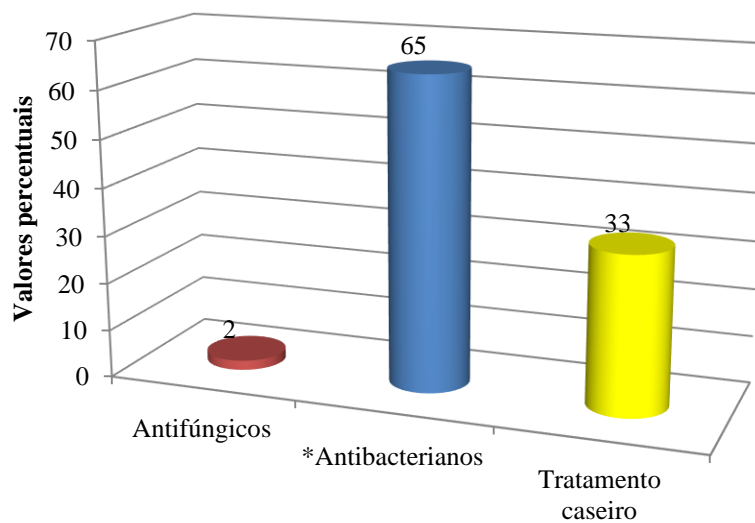
vulvovaginal visto que uma percentagem superior destas pacientes (19 casos, 63,3%) apresentou infecção por leveduras.

Das pacientes que usavam roupa interior sintética, 69 (51%) apresentaram infecção por leveduras do género *Candida*. O uso de roupa interior sintética e apertada impede a evaporação do suor ou de outras secreções da região vaginal. Principalmente na estação quente, o calor e a permanência de roupas húmidas podem ser factores que proporcionam o ambiente ideal para a activação e desenvolvimento das leveduras. A roupa interior em tecido algodão seria a ideal para permitir arejamento e evitar infecções (Gondo, 2010; Roberts *et al.* 2011; Águas & Silva, 2012).

Analisando os resultados obtidos neste trabalho, observou-se que as quatro pacientes portadoras do vírus da imunodeficiência humana que participaram nesta pesquisa, ao terem o sistema imunológico comprometido, apresentavam um importante factor predisponente para a proliferação e colonização de leveduras do género *Candida* presentes na flora vaginal. Estes dados são compatíveis com os obtidos por Treagan (2011) afirmando que a infecção por leveduras do género *Candida* depende de um número variado de factores relacionados com o hospedeiro, nomeadamente em pacientes com imunossupressão. Também de acordo com Giolo & Suidzinsk (2010), os factores de risco da candidíase vulvovaginal estão intimamente associados a deficiências imunológicas do hospedeiro, facilitando o desenvolvimento da infecção.

Os sinais e sintomas têm sido um critério de diagnóstico para algumas pacientes que se auto-diagnosticaram como tendo candidíase vulvovaginal o que as levou a efectuar uma automedicação empírica inadequada. Analisando os factores de risco relacionados com as 43 pacientes (45%) que estavam sob alguma terapêutica, verificou-se que uma paciente usava antifúngico tópico, 28 pacientes estavam sob terapêutica ambulatoria com antibióticos injectáveis e orais e 14 faziam tratamentos caseiros. Na figura 3.2 são apresentadas as percentagens das pacientes em função da utilização da terapêutica que estavam a fazer no momento da colheita dos exsudados vaginais.

Sabe-se que a microbiota natural da mucosa vaginal é composta por bactérias, protozoários e leveduras, presente em pequenas quantidades e em equilíbrio, as quais não conseguem proliferar devido à presença de anticorpos e de substâncias químicas que mantêm a região vaginal saudável, prevenindo o aparecimento de infecções.



(* penicilina, ampicilina, amoxiciclina, metronidazol)

Figura 3.2: Percentagens das pacientes em relação à terapêutica no momento da colheita.

A utilização extensiva de antibióticos de amplo espectro sem prescrição, o desequilíbrio do pH normal (4,0 a 4,5) têm sido associados ao aumento da prevalência de candidíase vulvovaginal (CVV) predispondo a hipótese da redução de bacilos de Doderlein (ou *Lactobacillus acidophilus*) na microbiota vaginal permitindo a possibilidade da levedura crescer e invadir os tecidos (Gondo, 2010; Linhares *et al.* 2010; Rathod *et al.* 2012; Nodarse, 2012). Assim sendo, verificamos que as terapêuticas, incluindo a automedicação, podem ter contribuído significativamente para alteração da flora vaginal normal destas pacientes conduzindo ao aparecimento da candidíase vulvovaginal. Realmente, em todos os exames directos dos exsudados destas pacientes se observaram estruturas fúngicas e as culturas foram positivas para *Candida* sp.

A prática da automedicação de forma empírica foi relatada por algumas pacientes incluídas nesta pesquisa, sem responsabilidade de saber se tinham hipersensibilidade às substâncias utilizadas e quais os possíveis efeitos colaterais do seu uso (reações adversas clinicamente relevantes) e utilização abusiva e, muitas vezes inadequação dos tratamentos caseiros. Em Angola, a gestão das infecções vulvovaginais causadas por leveduras do género *Candida* tem sido negligenciada e baseia-se apenas no consenso de

que a candidíase vulvovaginal não acarreta risco de vida e que o tratamento empírico não é prejudicial.

Sabemos que os diferentes tipos de infecção vaginal têm os seus sinais e sintomas característicos, e é difícil distinguir uma infecção de outras causas, sem o diagnóstico laboratorial, tanto para os clínicos quanto para as pacientes. Na realidade, o diagnóstico presuntivo, baseado na sintomatologia é impreciso e pode levar também um diagnóstico incorrecto por parte das pacientes, cidadãos comuns e profissionais de saúde em diferenciar entre a vaginite bacteriana por *Trichomonas vaginalis* e a candidíase vulvovaginal, por exemplo. Portanto os resultados desta pesquisa correlacionaram-se com os de outros estudos que referem que o diagnóstico sindrómico baseado em sinais e sintomas no exame clínico aumenta a prevalência da candidíase vulvovaginal, deixando muitas vezes para trás as verdadeiras causas dos sinais e sintomas que acabam por não ser tratados (Rathod *et al.* 2012). Daí, mais uma vez se enfatiza a importância da realização do diagnóstico laboratorial das infecções. Deste modo acreditamos que o diagnóstico correcto de uma candidíase vulvovaginal seja de extrema importância, particularmente no sentido de se evitar o tratamento equivocado e excessivo de vulvovaginite.

Os sinais e sintomas observados nas pacientes incluídas neste trabalho foram, com maior predominância prurido, corrimento esbranquiçado semelhante a “leite coalhado”, intensidade eritema vaginal e ardência. Das 159 pacientes que estiveram presentes na consulta de ginecologia e obstetrícia, em 96 (60,3%) resultaram culturas positivas confirmando candidíase vulvovaginal: 21 apresentaram queixas de prurido vaginal, nove queixaram-se de corrimento vaginal esbranquiçado, 42 queixaram-se de prurido e corrimento vaginal e 24 indicaram eritema vulvar, ardência e inflamação vulvar. Na Figura 3.3 estão demonstradas as percentagens dos sinais e sintomas mais predominantes reportados às pacientes observadas.

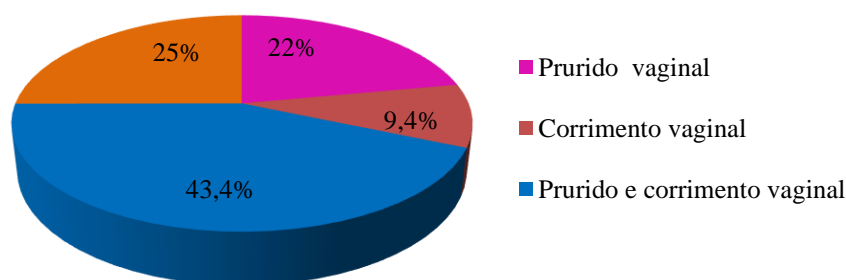


Figura 3.3: Percentagens dos sinais e sintomas de candidíase vulvovaginal mais predominantes apresentados pelas pacientes observadas.

Nesta pesquisa, a percentagem de pacientes com sinais e sintomas de candidíase vulvovaginal (prurido, corrimento e eritema) foi elevada. Apesar disso, a maior parte das mulheres, leigos e alguns profissionais de saúde assumem erradamente que todo e qualquer prurido vaginal, especialmente quando acompanhado por um corrimento vaginal, seja causado invariavelmente por leveduras.

É preciso ter cuidado, porque esta ideia ou crença nem sempre é verdadeira. O exame clínico deve ser considerado apenas sugestivo e deve ser sempre confirmado por provas laboratoriais, pois manifestações similares podem ser causadas por diferentes agentes infecciosos. Isso poderá levar a prescrever uma terapêutica desnecessária ou desadequada para o tratamento do prurido e corrimento vaginal, principalmente pela falta de conhecimento dos mecanismos básicos da fisiopatogênese desta infecção por leveduras do género *Candida*.

Os resultados obtidos neste trabalho encontram-se de acordo com os de Rathod *et al.* (2012). Estes autores fizeram uma pesquisa semelhante em 2528 pacientes que recorreram à consulta de ginecologia em que, no exame clínico, 29% se queixaram de prurido vaginal e 31% de corrimento vaginal. No entanto somente em 180 casos (20%) foram obtidas culturas positivas para candidíase vulvovaginal. Num outro estudo idêntico feito numa comunidade em Tamil Nadu na Índia, das mulheres que se queixaram de prurido e corrimento, somente em 53% foi diagnosticada candidíase vulvovaginal após a obtenção de cultura positiva (Prasad *et al.* 2005).

Neste trabalho, os episódios de vulvovaginites de repetição foram observados em 51% do total das pacientes com cultura positiva (49/96), das quais, 88% apresentaram

dois episódios e seis pacientes tiveram três ou mais episódios durante o último ano, como está desmonstrado na Figura 3.4.

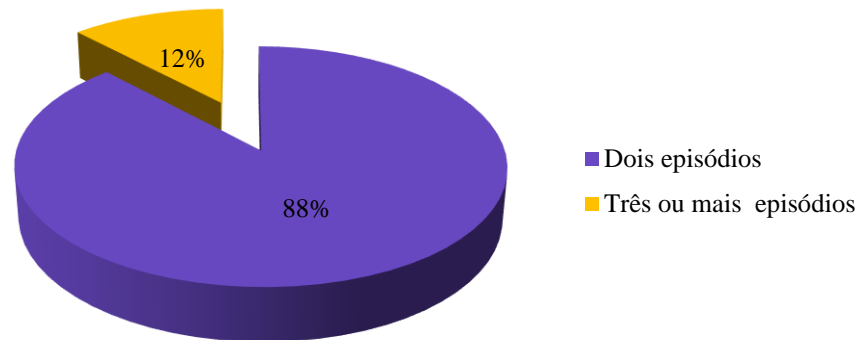


Figura 3.4: Percentagem dos casos de candidíase recorrente.

Normalmente na candidíase vulvovaginal, o quadro infeccioso primário pode ser facilmente tratado mas, episódios infecciosos recorrentes, dificilmente são tratados com sucesso.

Na análise dos resultados notamos que 12% das pacientes apresentaram candidíase vulvovaginal recorrente e esta percentagem revelou ser mais elevada em relação aos dados publicados em outros estudos, em que é reportado que 5% das mulheres em idade fértil teriam pelo menos quatro episódios sintomáticos de candidíase recorrente por ano (Gomes *et al.* 2011).

Trabalhos anteriores associam a candidíase recorrente a uma resposta alérgica vaginal. Relatam que cerca de um quarto ou mais mulheres com candidíase vulvovaginal recorrente poderiam ter um componente alérgico que contribui para a etiologia e gravidade da infecção por leveduras (Achkar & Fries 2010; Lucas *et al.* 2012). Nesta pesquisa realizada no âmbito deste trabalho, após o questionário respondido pelas pacientes, fez-se uma correlação dos factores de risco considerados para o estudo, e não verificámos associação entre a candidíase recorrente e alergias, apesar de não ter sido feito um estudo aprofundado sobre o assunto.

Rad *et al.* (2012) afirmam que 75% das mulheres em idade fértil apresentam pelo menos um episódio de vulvovaginite por *Candida* sp. durante a sua vida, e 5% de candidíase recorrente, geralmente causada por *C. albicans*.

Em seguida serão apresentados os resultados obtidos com as estirpes do género *Candida* isoladas em cultura, neste trabalho, a sua caracterização macroscópica, microscópica, bioquímica e molecular que permitiu identificar as diferentes espécies. Em Angola ainda são pouco comuns as publicações sobre a ocorrência de candidíase vulvovaginal com diagnóstico definido por cultura, sendo que a maioria dos estudos se baseia apenas nodiagnóstico clínico ou no autodiagnóstico das infecções.

3.2 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL CONVENCIONAL DA CANDIDÍASE VULVOVAGINAL

3.2.1 Exame directo das amostras de exsudado vaginal

O exame microscópico directo foi feito em 159 amostras clínicas de secreções vaginais onde 92 foram positivas neste teste. As amostras de exsudado vaginal foram tratadas com hidróxido de potássio, KOH a 20%, que provocou a degradação dos elementos celulares do epitélio das pacientes e artefactos deixando as paredes das células leveduriformes intactas. Permitiu deste modo a clarificação das células leveduriformes existentes nas amostras clínicas e melhorou o contraste na visualização das mesmas no exame microscópico *in vivo*.

A concentração de KOH empregue neste trabalho, se por um lado permite obter uma rápida e boa clarificação das células das amostras, por outro apresenta uma limitação por dispor de um período limitado de conservação das amostras. Após uma a duas horas este composto começa a precipitar e a formar cristais e a amostra desidrata, impedindo assim a correcta observação microscópica da amostra.

No entanto, facilita o reconhecimento da morfologia de células leveduriformes, a observação da sua forma e diâmetro, a presença ou ausência de pseudohifas, a observação do número de leveduras presentes na amostra, e se se apresentam isoladas ou agrupadas (Figura 3.5). A observação dos exames directos dos exsudados vaginais permitiu identificar e diferenciar as infecções causadas por leveduras das infecções

causadas por bactérias (Neufeld, 2009; Barbedo & Sgarbi 2010; Feuerschuette *et al.* 2010).

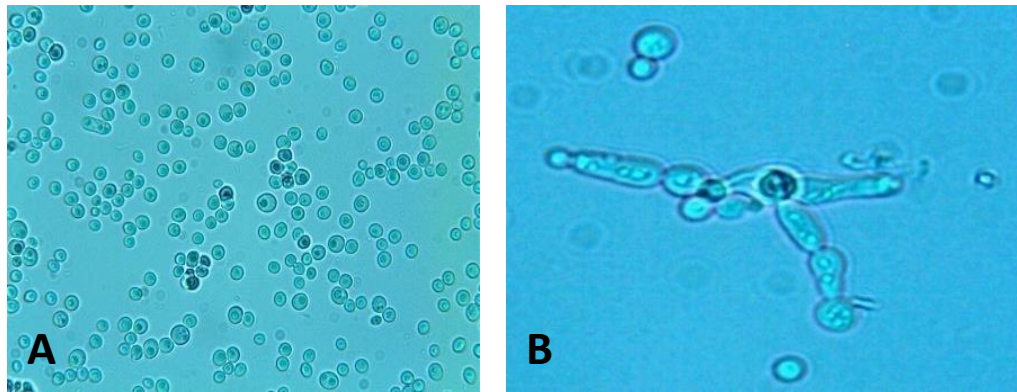


Figura 3.5: Observação microscópica directa de exsudados vaginais. A- células leveduriformes em gemulação, B - pseudohifas de *Candida* sp.

No exame directo dos 92 isolados considerados positivos, em 58 foram observadas células leveduriformes em gemulação, em 30 observados pseudofilamentos e em 4 pseudohifas (Anexo 4, Tabela 1). Na Figura 3.6 estão representadas as percentagens das estruturas observadas no exame directo dos 92 isolados clínicos.

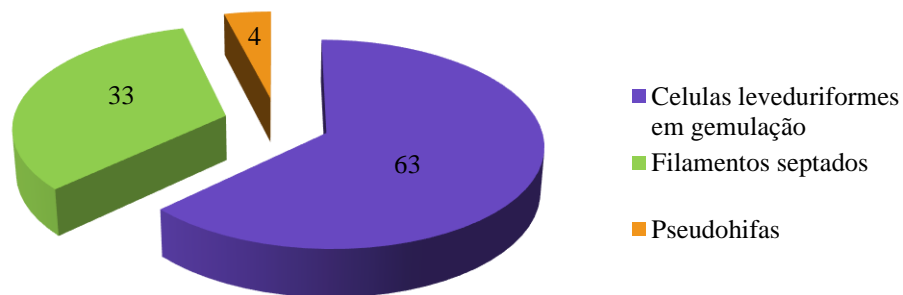


Figura 3.6: Percentagem das diferentes morfologias de *Candida* sp. observadas no exame directo em relação ao total das amostras positivas.

No exame microscópico directo das amostras números 5, 127, 145 e 146, observou-se a presença de numerosas bactérias e não houve crescimento logo na primeira inoculação feita em meio de agar de Sabouraud adicionado de cloranfenicol. Assim sendo, foi necessário inocular as amostras por mais duas vezes em meios selectivos de agar de Sabouraud adicionado de gentamicina e cloranfenicol (Gelose Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol® ou SGC®, BioMérieux, França), incubando a 30°C durante 24 a 48 horas com objectivo de certificar a negatividade das mesmas. Com algumas amostras, após as repetições das inoculações, foram obtidas culturas positivas para *Candida* sp.

Este resultado assemelha-se com a pesquisa feita por Lopes da Silva (2013), onde sete isolados clínicos de origem cabo-verdiana, também foram negativos no exame directo e, após inoculação no meio de cultura de Sabouraud com cloranfenicol, passadas 48 horas, cresceu um elevado número de colónias. No entanto pode-se dizer que, quando o resultado do exame directo é negativo não se deve descartar logo a amostra e queé fundamental aguardar pelo resultado da cultura realizada em meios de cultura adequados. Observámos que nem sempre na primocultura o resultado é positivo, devido às várias variáveis como: a parte da zaragatoa com amostra aplicada na lâmina ou no meio de cultura possivelmente tinha pouca amostra, as células leveduriformes tinham pouca viabilidade, a colheita da amostra ter sido mal feita ou tratar-se de uma infecção mista.

Na elucidação das estruturas celulares leveduriformes é muito importante relatar as formas ovais ou redondas das células, pseudomicélio e a quantidade de elementos celulares dos mesmos na amostra, uma vez que a predominância de pseudomicélio está relacionada com a patogénese da infecção por leveduras do género *Candida*, sendo que esta indica uma forma mais invasiva no tecido da mucosa vaginal. Estas formas ainda nos podem dar uma ideia do tempo e da gravidade da infecção (Lacaz *et al.* 1980; Barbedo & Sgarbi, 2010). Portanto concluímos que o exame microscópico directo apesar de ser uma técnica simples, de baixo custo, rápida e eficaz, tem algumas limitações, pois não permite a identificação das diferentes espécies *Candida*, as preparações com hidróxido de potássio não se conservam por muito tempo e o sobreaquecimento das preparações, caso seja utilizado, pode provocar rápida cristalização do KOH.

3.2.2 Isolamento de *Candida* sp.

Todos os isolados clínicos foram cultivados em meio selectivo de Sabouraud com cloranfenicol e gentamicina e incubados a 30°C durante 24 a 48 horas. Após a incubação foi registado o crescimento, número de colónias de levedura e observadas as características macroscópicas das 159 amostras. Para tal, foram estabelecidos critérios selectivos considerando o facto de *Candida* sp. tratar-se de um microrganismo que pode naturalmente estar presente na microbiota vaginal como levedura comensal. Só se consideraram culturas positivas quando um elevado número de colónias se desenvolveu em cultura. Em alguns isolados devido à contaminação por fungos filamentosos, *Rhodotorula* sp. e/ou bactérias houve a necessidade de re-isolar as colónias de *Candida* sp. utilizando meios selectivos. Outras amostras foram excluídas do estudo pois as culturas que não tiveram qualquer crescimento detectável foram consideradas como negativas. Assim sendo, de todas as amostras estudadas, somente foram obtidos 98 isolados clínicos de *Candida* sp. como está demonstrado no Anexo 5, tabela 2

Todos os isolados clínicos de *Candida* sp. desenvolveram colónias de cor creme, opacas, de consistência cremosa, relevo redondo e margens regulares, com superfície na maior dos casos parte lisa, mais ou menos brilhante, e de irregular a lisa. Alguns isolados desenvolveram colónias brancas ou bege e secas, com superfície rugosa, de relevo e margens irregulares, que posteriormente foram identificadas como sendo *C. parapsilosis*, *C. catenulata*, *C. pelliculosa* e *Saccharomyces cerevisiae*.

3.2.3 Teste da Blastese para identificação de *C. albicans*

O Teste da Blastese foi realizado com os 98 isolados clínicos que foram considerados cultura positiva. Do total de isolados, 71% (70/98) foram considerados positivos para *C. albicans* porque formaram tubos germinativos, pois esta é uma característica exclusiva desta espécie. Os isolados que não formaram tubo germinativo (28,6%, 28/98) foram consideradas *Candida* não-*albicans* como está apresentado na Figura 3.7. Os resultados obtidos estão representados no Anexo 6, Tabela 3.

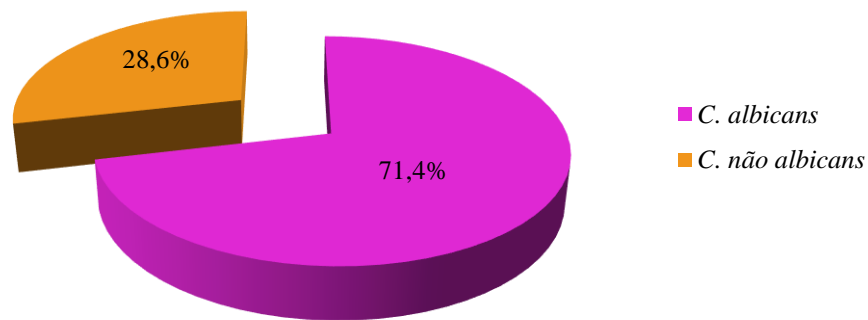


Figura 3.7: Percentagem de isolados de *C. albicans* identificados pelo Teste da Blastese.

Esta prova é um procedimento de diagnóstico que possibilita a observação de tubos germinativos na forma de pequenos filamentos que brotam com paredes paralelas sem formar constrição com a célula-mãe (Figura 3.8), permitindo assim a identificação presuntiva da *C. albicans*. Aproximadamente 95% dos isolados clínicos desta espécie são capazes de produzir tubos germinativos quando incubados em soro humano a 37 °C ao fim de 2 a 3 horas.



Figura 3.8: Observação microscópica de um Teste da Blastese positivo com células de *C. albicans* formando tubos germinativos (x600).

Verificou-se que apenas os isolados de *C. albicans* foram capazes de desenvolver esta estrutura embora 12 dos isolados estudados (14,6%) tenham dado um resultado falso negativo no Teste da Blastese (12/82), uma percentagem mais elevada do que aquela observada na literatura que normalmente reporta 5% de falsos negativos (Kwon-Chung & Bennet, 1992; Perreira, 2010). Uma justificação para estes resultados pode dever-se ao facto de estas estirpes terem sido isoladas de pacientes que possivelmente tenham iniciado uma prévia automedicação com antifúngico ou outros antibióticos sem comunicação ao clínico, o qual poderá conduzir à inibição do tubo germinativo *in vitro* por parte da levedura. Também, quando o inoculo utilizado no teste é demasiado abundante ($> 10^9$ células/ml), a formação de tubos germinativos decresce drasticamente e o resultado pode ser considerado nulo (Carneiro, 2007). Uma pequena percentagem da obtenção de falsos negativos tem sido atribuída ao curto tempo de incubação, a culturas demasiado velhas com células de vitalidade diminuída ou culturas contaminadas com bactérias (Lacaz, 1980). Também é importante que sejam tomados cuidados especiais durante o procedimento do Teste da Blastese, a fim de evitar que outras espécies de *Candida* além de *C. albicans* formem estruturas semelhantes a tubos germinativos, como pseudofilamentos no início da sua formação (Barbedo & Sgarbi, 2010).

Podem ocorrer falsos positivos em cerca de 1% a 2% dos casos, principalmente com as espécies *C. tropicalis*, *C. dubliniensis* e *C. parapsilosis*, quando o tempo de incubação a 37°C excede as 3 horas (Neufeld, 2009). Contudo, neste trabalho, não foram observados falsos positivos por parte dos isolados de *C. não-albicans* porque o tempo de incubação foi rigorosamente respeitado. Deste modo e, neste sentido, o Teste da Blastese apresentou ser igualmente fiável.

Num trabalho similar efectuado por Tietz *et al.* (1995) em 183 isolados clínicos provenientes da província de Luanda, Angola, 30% dos isolados (54/183) formaram tubo germinativo característico das espécies *C. albicans* e 70% (129/183) não o formaram. Em comparação com o presente trabalho, neste trabalho apesar de amostra ser elevada, noutro-se que houve uma baixa percentagem de isolados que não formaram tubos germinativos (30%). Possivelmente os critérios para a realização do teste da blastese não fora rigorosamente obedecidos. Outro estudo realizado na Tanzânia, num total de 5440 amostras submetidas ao teste do tubo germinativo, os resultados mostraram que 3661 (67,3%) formaram tubos germinativos, considerando o teste

positivo para *C. albicans*, enquanto as espécies de *Candida* não-*albicans* foram apenas 32,71% (Namkinga, 2012).

Uma outra pesquisa feita por Chiossi (2011) em 73 amostras de fluidos vaginais colhidos através de zaragatoas, mostra que 85% das amostras pertenciam à espécie *C. albicans* por terem formado tubos germinativo e 15% as espécies *C. não-albicans*.

Os resultados obtidos no presente trabalho assemelham-se com os de outros trabalhos, pois em relação à identificação das leveduras do género *Candida*, várias publicações relatam que na candidíase vulvovaginal, a espécie *C. albicans* tem sido a predominante na mucosa vaginal, apresentando índices entre os 78% e 87% (Albuquerque, 2013).

Na realidade este é um teste de baixo custo, fácil de executar e específico para *C. albicans* não tendo revelado a possibilidade de identificação de outras espécies, sendo sempre necessária a realização de testes adicionais para as identificar. A fim de obter a identificação dos restantes isolados clínicos que não filamentaram, foram utilizados outros métodos de identificação convencional (método de Dalmau aplicado em meio de agar de eosina e azul de metileno (EMB), o teste bioquímico ID32C[®] e os métodos moleculares por PCR Multiplex e o RFLP.

3.2.4 Identificação em Agar de Eosina e Azul-de-metileno (EMB)

O estudo micromorfológico e comparativo entre as diversas estruturas de leveduras do género *Candida* não-*albicans* foi igualmente possível após inoculação da amostra em meio de EMB acrescido ou não de Tween 80 a 1%, para estimular a produção dos clamidósporos e a filamentação das células leveduriformes, permitindo a identificação da espécie através da sua presença e da disposição dos blastoconídios, pseudomicélio e/ou pseudohifas. A adição de Tween 80 ao meio de cultura melhorou a visualização directa das estruturas micromorfológicas diferenciadoras das colónias quando observadas ao microscópio de contraste de fase, após incubação a 29°C durante 24-72 horas (Caneiro 2007; Barbedo & Sgarbi, 2010).

Foram estudados 14 isolados clínicos de *Candida* não-*albicans* com este método: 8, 13,33g, 48, 50,51p, 62, 65,68, 97, 104, 114, 117 e 127. Após 72 horas de crescimento em meio de EMB realizou-se a identificação das estruturas dos diferentes isolados clínicos. Para os dois isolados de *Saccharomyces cerevisiae* houve a necessidade de

prolongar o período de incubação para 7 dias a fim de observar a formação dos ascósporos. Com os quatro isolados de *Candida parapsilosis*, n^{os} 33 pm, 51p, 97 e 104 observou-se que o pseudomicélio apresentava-se bastante ramificado, e as células eram ligeiramente alongadas, facilmente diferenciadas (Figura 3.9). Também se pôde notar a presença de blastoconídios globosos ou ovoides.

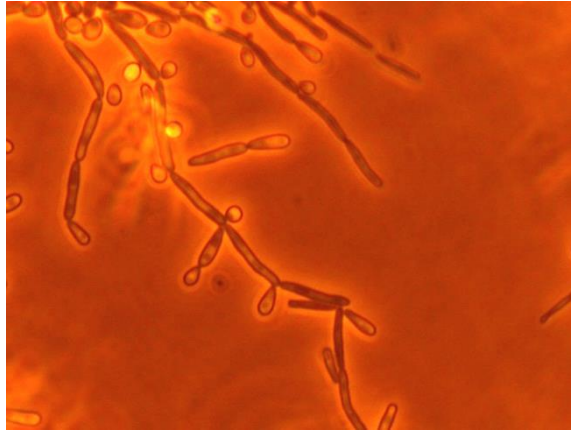


Figura 3.9: Aspecto microscópico de uma cultura de *C. parapsilosis* crescida em meio de EMB com Tween 80, após 72 horas de incubação (x400).

Foram estudados quatro isolados de *C. glabrata*, n^{os} 33g, 65, 117 e 132. Todas estas estirpes inoculadas no meio EMB com/sem Tween 80, após uma incubação de 72 horas a 29°C, permitiram a observação de blastoconídios pequenos, redondos e ovais de 2,5 a 3µm. No decorrer deste trabalho constatou-se que o Tween 80 não influenciou no desenvolvimento de microestruturas, o que seria de esperar com esta espécie (Figura 3.10).

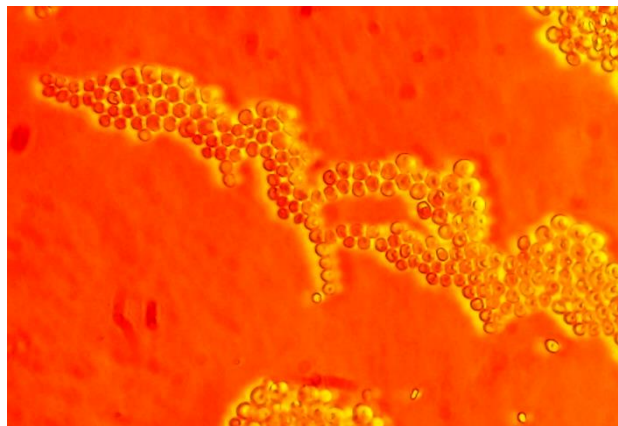


Figura 3.10: Aspecto microscópico de uma cultura de *C. glabrata* crescida em meio de EMB com Tween 80, após 72 horas de incubação (x 400).

Com o isolado de *C. tropicalis* nº114 observou-se a produção de pseudomicélio abundante e ramificado, com blastósporos (blastoconídios) ovoides e semi-globosos dispostos em cadeias simples, ramificadas, irregulares e inserção verticilada (Figura 3.11).

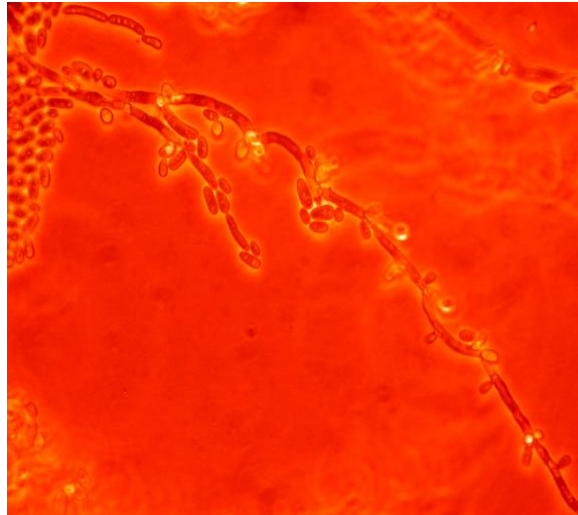


Figura 3.11: Aspecto microscópico de uma cultura de *C. tropicalis* crescida em meio de EMB com Tween 80, após 72 horas de incubação (x400).

Com o isolado de *C. krusei* nº68, após 72 horas de inoculação a 29°C, no meio EMB com/sem Tween 80, observou-se a formação de microestruturas típicas desta espécie. O pseudomicélio desenvolveu-se na forma de células alongadas ou delgadas ramificando-se como galhos de árvore. Blastoconídios ovoides e predominantemente cilíndricos, dispostas verticiladamente a partir das constrições do pseudomicélio (Figura 3.12).

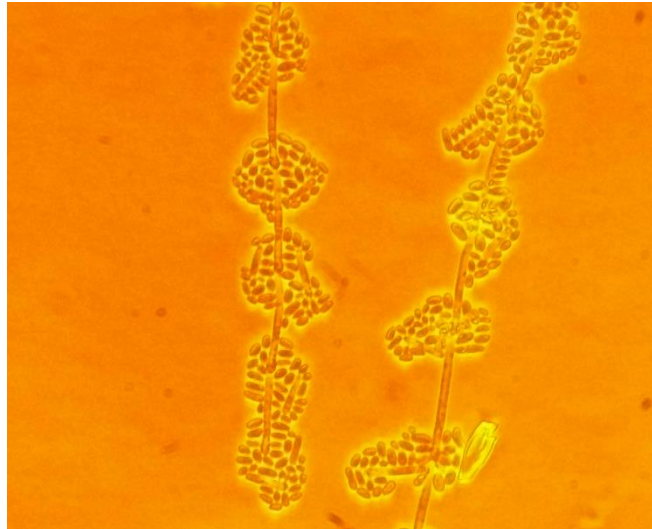


Figura 3.12: Aspecto microscópico de uma cultura de *C. krusei* crescida em meio de EMB com Tween 80, após 72 horas de incubação (x400).

De acordo com Lacaz (1980) os blastoconídios desagregam-se facilmente, permanecendo ao lado do pseudomicélio em pequenos aglomerados, assemelhando-se a paus de fósforo amontoados e entrecruzados.

Esta estirpe de *C. krusei* (nº68) foi identificada mediante o método acima referido, embora anteriormente tenha sido identificada pelo método molecular PCR multiplex como sendo *C. parapsilosis*. Na realidade os métodos morfológicos são menos sensíveis e precisos que os métodos moleculares, podendo levar a erros de identificação. Neste caso específico de *C. krusei* e *C. parapsilosis* ambas as espécies podem desenvolver morfologias microscópicas muito semelhantes (pseudomicélio alongado) e pode equivocar a identificação se esta se basear apenas em critérios morfológicos.

Foi ainda estudado um isolado de *C. catenulata*, o nº13. Observou-se a formação de pseudomicélio com constrições e muito ramificado e grupos de blastoconídios ovóides ou cilíndricos (figura 3.13). Neste caso notou-se que a adição de Tween 80 influenciou no desenvolvimento de maior quantidade de microestruturas típicas desta espécie.

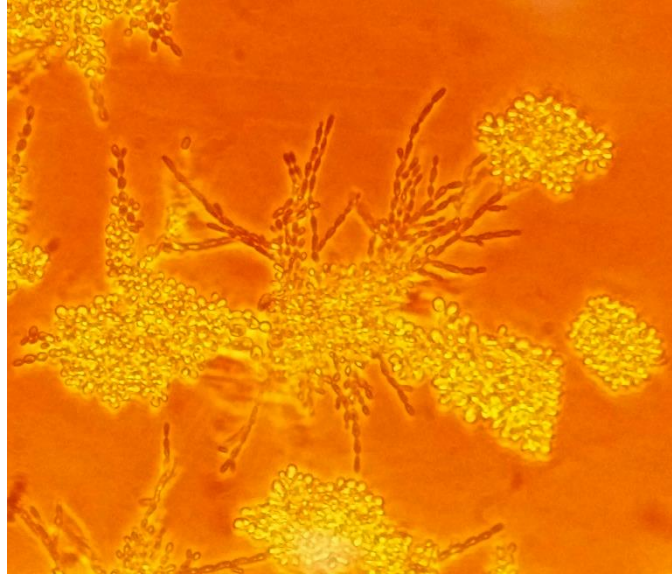


Figura 3.13: Aspecto microscópico de uma cultura de *C. catenulata* crescida em meio de EMB com Tween 80, após 72 horas de incubação (x400).

Foi igualmente estudado um isolado de *C. lipolytica* (amostra n°48) e, neste caso, observou-se pseudomicélio abundante e grupos de blastoconídios ovóides ou cilíndricos (Figura 3.14). Igualmente o Tween 80 influenciou no desenvolvimento das estruturas micromorfológicas com o isolado desta espécie.

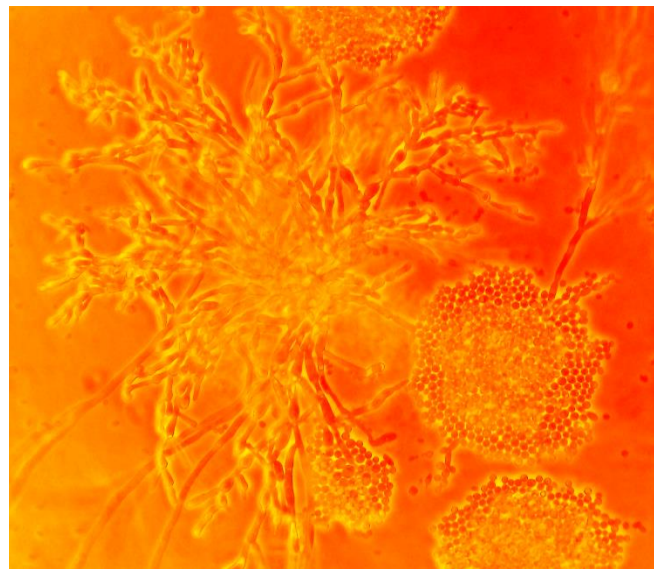


Figura 3.14: Aspecto microscópico de uma cultura de *C. lipolytica* crescida em meio de EMB com Tween 80, após 72 horas de incubação (x400).

Com um isolado da espécie de *Candida pelliculosa* observaram-se blastoconídios ovóides ou cilíndricos aglomerados em pequenos grupos. Notou-se que neste caso, o Tween 80 não influenciou muito no desenvolvimento de microestruturas (Figura 3.15).

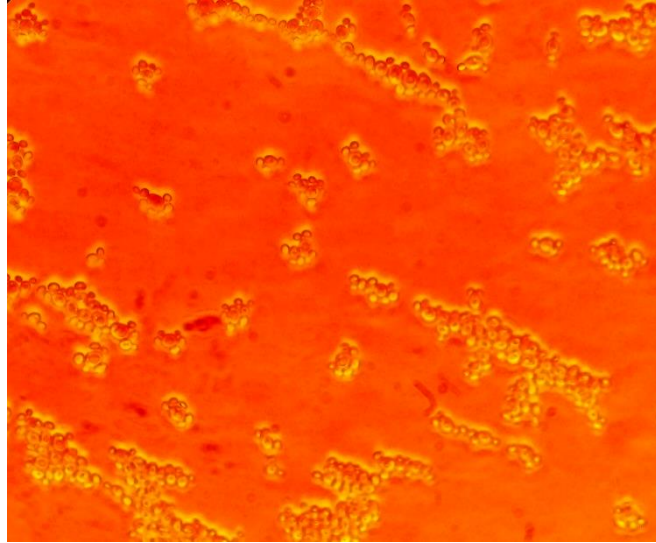


Figura 3.15: Aspecto microscópico de uma cultura de *C. pelliculosa* crescida em meio de EMB com Tween 80, após 72 horas de incubação (x400).

Estudaram-se ainda as duas amostras *S. cerevisiae* isoladas neste trabalho com o objectivo de observar as estruturas típicas: blastoconídios e ascósporos. Após 72 horas de incubação apenas se observaram blastoconídios e, somente após uma incubação prolongada de sete dias foi possível detectar a presença de ascósporos (Figura 3.16).

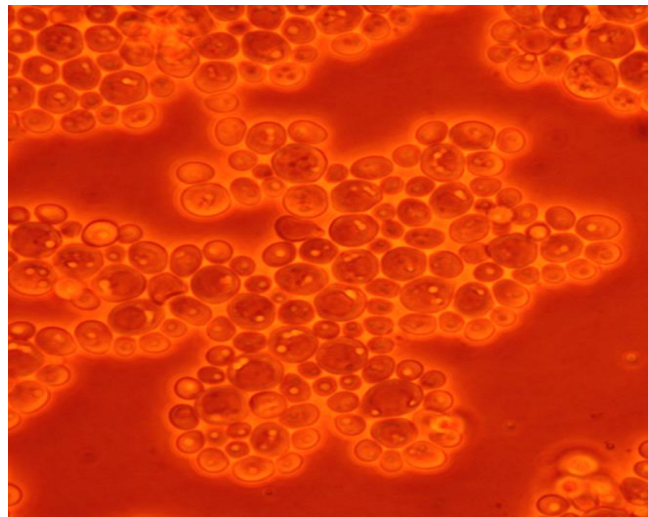


Figura 3.16: Aspecto microscópico de uma cultura de *S. cerevisiae* crescida em meio de EMB com Tween 80, após 72 horas de incubação (x400).

Foi por fim estudado por este método, um isolado de *Trichosporon asahii* n°50, posteriormente identificada por API. Neste isolado observaram-se as estruturas típicas: blastoconídios e arthroconídios (Figura 3.17). Com este isolado Tween 80 pareceu não

afectar os resultados visto que em ambas as culturas se observou a produção de blastoconídios e artroconídios.



Figura 3.17: Aspecto microscópico de uma cultura de *Trichosporon asahii* crescida em meio de EMB com Tween 80, após 72 horas de incubação (x400).

Apesar do meio de cultura EMB não ter sido desenvolvido para o estudo de diferenciação de leveduras, nesta pesquisa demonstrou a boa eficácia na diferenciação da micromorfologia. Com alguns isolados clínicos não se observou a influência do Tween 80 para o desenvolvimento de estruturas típicas de leveduras. Os resultados desta pesquisa correlacionam-se com os resultados obtidos num estudo realizado no laboratório de Microbiologia do Hospital Universitário de Santiago de Compostela, Espanha, feito por Carneiro (2007) onde isolados clínicos de *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *Trichosporon asahii* e *Saccharomyces cerevisiae* apresentaram características morfológicas típicas de cada espécie.

Na verdade este método é fácil de executar, simples, económico e, de certa forma confiável e, como no laboratório do Hospital Maternidade Irene Neto não se faz a identificação das leveduras do género *Candida* poderia ser contornada esta situação empregando este método como alternativa. No entanto, é um método que só pode ser executado por profissionais com um certo grau de experiência em Micologia, o que implica a formação de profissionais. Este método assemelha-se ao método de cultura em lâmina onde também se observam estruturas típicas de leveduras do género *Candida* spp. mas tem a vantagem de ser mais simples de executar por não necessitar de colocar a

preparação dentro de uma câmara húmida para evitar a dessecação do meio durante o período de incubação (ANISA, 2013).

3.2.5 Identificação bioquímica – Galerias ID 32C®

Como já foi referido na introdução, na actualidade existem vários testes comercializados para a realização de prova de assimilação de nutrientes que simplificam tanto o seu uso como a interpretação dos resultados. Todos os isolados clínicos que apresentaram Teste da Blastese negativo e os que não foram conclusivos nos testes moleculares, n^{os} 8, 13, 33g, 48, 50, 62 e 127, foram submetidos à prova de assimilação de nutrientes. Nesta pesquisa utilizou-se a galeria ID 32C® (BioMerieux, França) através da qual foram examinados os perfis de assimilação em relação a um conjunto de 32 cúpulas que contêm substratos carbonados desidratados. Na Figura 3.18 pode-se observar o crescimento da levedura em algumas cúpulas da galeria, sendo que nessas se regista uma reacção positiva, pois as leveduras só crescem se forem capazes de utilizar o substrato correspondente.



Figura 3.18: Galeria API ID 32C® com o resultado obtido como isolado clínico n° 127, *C. pelliculosa*. As cúpulas turvas representam reacção positiva e permitem determinar o perfil de assimilação da levedura.

O resultado da identificação bioquímica das leveduras do género *Candida* por esta metodologia estão representadas no Anexo 6, tabela 3. Três isolados, 50, 62 e 127, apresentaram excelente identificação (99,9%), com outros três isolados, 8, 33g e 50 a qualidade variou entre 99,9% a 99,6% com muito boa identificação, e com o isolado 13

obteve-se boa identificação com a qualidade de 95%. Na Figura 3.19 está esquematizado em percentagens a qualidade das identificações obtidas.

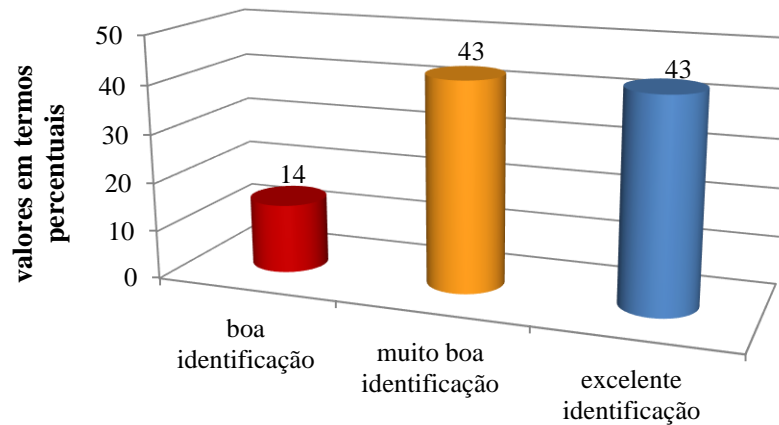


Figura 3.19: Percentagens da qualidade das identificações obtidas com o teste ID 32C®.

O sistema de identificação ID 32C® permitiu a identificação e a confirmação de todos os isolados anteriormente diagnosticados como sendo *C. não-albicans* pelo Teste da Blastese e cuja identificação também não tinha sido possível com os métodos moleculares. Revelou uma interpretação eficaz dos resultados obtidos a qual permitiu a identificação dos isolados com elevado nível de qualidade (de 95% a 99,9%) utilizando a base de dados e um programa informático da BioMerieux. Comparando com os resultados de outros trabalhos, o presente trabalho correlaciona-se com um estudo realizado por Ferreira (2010), que obteve igualmente resultados satisfatórios em 98,1% dos isolados (52/53). Relativamente à qualidade da identificação, esta foi menor que a observada neste trabalho, pois 18% daqueles isolados apresentaram boa identificação, 51% muito boa identificação e 24,5% excelente identificação.

A prova de identificação bioquímica ID 32C® é um dos métodos convencionais mais utilizados na identificação de leveduras por ser simples, específico e fácil de executar. Apesar disso apresenta algumas limitações como a morosidade na resposta e a dificuldade na interpretação visual. Por vezes a observação da turvação em cada cúpula pode levar a resultados dúbios sobretudo para quem não tem muita experiência na leitura visual deste tipo de prova. Em muitos laboratórios hospitalares dos países em vias de desenvolvimento seria muito indicado utilizar o kit do API ID 32C® pela sua capacidade de diferenciar um número elevado de espécies de leveduras do género

Candida mas, devido o seu elevado custo, é pouco utilizado. Contudo, é pertinente reportar que esta prova não é suficientemente específica quando é necessário diferenciar leveduras a partir de infecções mistas porque não tem suficiente poder discriminatório para indicar quando esta situação ocorre. Especialmente nestes casos, apresenta resultados dúbios e não conclusivos (Ferreira, 2010) Deste modo, devido a estas limitações, as provas bioquímicas não podem ser utilizados e, até em certos casos são inapropriadas, quando há urgência no diagnóstico de infecções em doentes em estado grave. Assim, como alternativa, podem ser utilizados métodos de identificação mais rápida, sensível e específica como os métodos baseados em técnicas de biologia molecular para a identificação das diferentes leveduras do género *Candida*.

3.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS LEVEDURAS DO GÉNERO *Candida*

3.3.1 Identificação das espécies de *Candida* mais prevalentes por PCR Multiplex

Devido à relativa facilidade e rapidez na execução das análises, durante a última década os métodos baseados em biologia molecular estão a tornar-se cada vez mais utilizados na identificação de microrganismos. O PCR, que inclui o PCR multiplex, tem sido a principal ferramenta molecular empregue na detecção de DNA de leveduras de interesse médico. Uma combinação de dois *primers* universais para fungos UNI1 e UNI2 e oito *primers* específicos foram utilizados neste trabalho para a detecção das espécies *Candida* mais prevalentes. Foram submetidos ao método molecular PCR multiplex, 28 isolados clínicos que, aquando da identificação convencional pelo Teste da Blastese, tiveram resultados negativos. Dos 28 isolados estudados, os isolados nº 33 e 51 revelaram tratar-se de uma cultura mista quando este método foi utilizado requerendo o re-isolamento das leveduras. Com o isolado nº33 só foi possível identificar apenas uma espécie e a outra foi submetida a outro teste molecular por apresentar bandas não conclusivas. Sendo assim 70% (20/28) dos isolados foram correctamente identificados pelo método PCR multiplex como estão discriminados no Anexo 6, tabela 3. Entretanto com os outros 28,6% dos isolados (8/28) não foi possível identificá-los por apresentarem bandas inespecíficas no gel de electroforese. Na Figura 3.20 estão demonstrados os números de isolados das diferentes espécies identificadas

pelo método molecular PCR multiplex: 63% *C. albicans* (12/20), 21% *C. parapsilosis* (4/20), 11% *C. glabrata* (2/20) e 5% *C. tropicalis* (1/20).

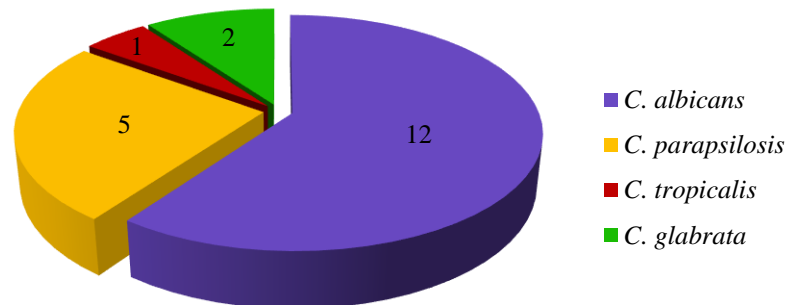


Figura 3.20: Número de isolados identificado pelo método molecular PCR multiplex.

Apesar de a literatura indicar que 5% das leveduras do género *C. albicans* podem não formar tubo germinativo (Kwon-Chung & Bennet, 1992), relativamente ao total de isolados clínicos identificados previamente como sendo *C. não-albicans*, após o teste molecular PCR multiplex 14,6% (12/82), revelaram ser *C. albicans* (n^{os} 41, 51mg, 53, 56, 75, 84, 85, 87, 99, 102, 106 e 139). Estas estirpes, que tinham tido inicialmente Teste da Blastese negativos, representam uma percentagem muito superior à que está descrita na literatura. Fica assim realçada a fiabilidade dos testes morfológicos e a importância da utilização de métodos moleculares no correcto diagnóstico de candidíase, para uma identificação correcta dos agentes. Na Figura 3.21 são apresentados alguns dos perfis electroforéticos obtidos após a aplicação da técnica da PCR multiplex.

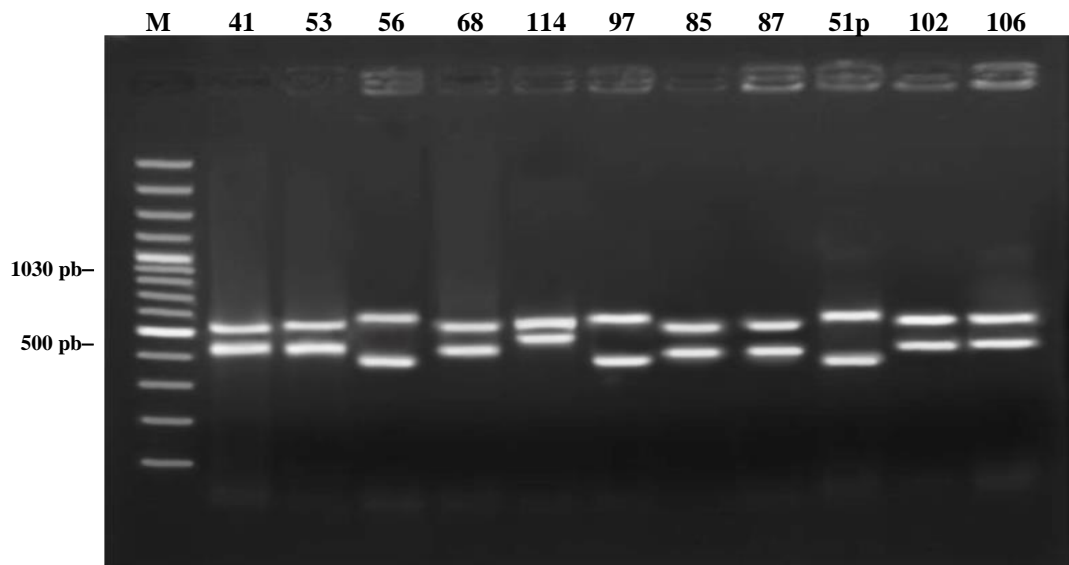


Figura 3.21: Gel de electroforese para identificação de *Candida* sp. por PCR multiplex a partir de culturas puras de levedura. *C. albicans*, isolados 41, 53, 68, 85, 87, 102 e 106. *C. parapsilosis*, isolados 56, 97 e 51p. *C. tropicalis*, isolado 114. M, marcador de pesos moleculares de 100bp.

Podem-se observar os perfis típicos de diferentes espécies para os quais existiam *primers* específicos. Para cada isolado foram obtidas duas bandas distintas esperadas: *C. albicans* 583 e 446 pb, *C. glabrata* 929 e 839 pb, *C. tropicalis* 583 e 507pb e *C. parapsilosis* 570 e 370 pb. A partir de duas culturas foi detectada mais do que uma espécie após se terem observado quatro bandas electroforéticas.

Para além da identificação destas espécies, foi ainda detectada a existência de quatro espécies diferentes de leveduras após a observação de uma única banda correspondente à amplificação pelos *primers* universais.

Os *primers* usados no PCR multiplex mostraram ser específicos e eficazes para a identificação das oito espécies de leveduras pertencentes ao género *Candida*, mas ineficazes para a identificação das espécies que não fazem parte deste complexo de *primers* específicos. A utilização de *primers* universais e específicos e a não extracção prévia do DNA proposta nesta técnica possibilitou a redução do tempo de obtenção da resposta, na medida em que permitiu a detecção e a identificação de diferentes espécies de *Candida* em uma única reacção de amplificação. Outra vantagem deste método foi a sua capacidade de identificar mais do que uma espécie de dois isolados clínicos numa mesma amostra, tal como foi detectado nesta pesquisa. Sendo assim foi

possível voltar à cultura e reisolar novamente as colónias e separar as duas espécies diferentes. Contudo, o método baseado em PCR multiplex também revelou algumas limitações como a concentração de DNA. Quando se retira uma porção de colónia com um palito, não se retira uma quantidade rigorosa de leveduras, pelo que o DNA na reacção de PCR pode por vezes ser demasiado e inibir a reacção. Por último, exige pessoal experiente e apenas identifica oito estirpes de leveduras do género *Candida*.

Uma pesquisa realizada em Portugal por Lopes de Silva (2013) em 100 amostras de pacientes Portuguesas cujas culturas foram estudadas por este mesmo método sem que se tivesse extraído previamente o DNA das leveduras, apenas se obteve a identificação correcta de 83% isolados (83/100). Nestas amostras, a prevalência das espécies de *Candida* foi de 72% de *C. albicans*, 7% de *C. glabrata*, 2% de *C. tropicalis*, 1% de *C. parapsilosis* e 1% de *C. lusitaniae*.

Os resultados também se correlacionam com uma outra publicação de Rad *et al.* (2012) num trabalho idêntico feito numa população do Irão, apesar de ter sido utilizado um kit de extracção e purificação de DNA. Com a técnica multiplex aplicada a amostras vaginais, verificaram que 89,7% continham apenas uma espécie de *Candida* e 10,3% continham duas ou mais espécies diferentes. A prevalência das espécies de *Candida* encontradas foi 65,1% para *C. albicans*, 13% para *C. glabrata*, 6,2% para *C. tropicalis*, 4% para *C. krusei*, 0,6% para *C. guilliermondii* e 0,6% para *C. parapsilosis*.

Os isolados em que não foi possível identificar a espécie por este método, por não terem apresentado produtos de amplificação inequívocos após a electroforese, foram submetidas a outro método molecular de identificação ainda mais sensível e específico. Para tal foi seleccionado um método que aplica a restrição de fragmentos amplificados por PCR, o RFLP da região ITS do rDNA destes isolados clínicos.

3.3.2 Identificação das espécies de *Candida* mais prevalentes por PCR-RFLP da região ITS do rDNA

Na presente pesquisa, oito dos isolados clínicos de leveduras do género *Candida* foram identificados por PCR-RFLP, por não ter sido possível a sua identificação com a técnica de PCR multiplex: 8, 13, 33g, 48, 50, 62,127 e 132. Neste caso foram empregues os *primers* universais ITS1 e ITS4 para amplificar a região ITS do rDNA (ITS1, 5,8S e ITS2) dos isolados clínicos, seguida de restrição com a enzima *MspI*.

Apesar da elevada eficácia desta metodologia e de os *primers* utilizados terem amplificado bem a região ITS, esta metodologia falhou com alguns isolados clínicos porque, após a restrição, foram geradas bandas não conclusivas. Deste modo foram apenas identificados três isolados clínicos por este método. Dois isolados pertenciam à espécie *C. glabrata* (n^{os}33g e 132) e um foi identificado como sendo *C. guilliermondii* (n^o13). Na Figura 3.22 estão representadas as percentagens de identificação por este método.

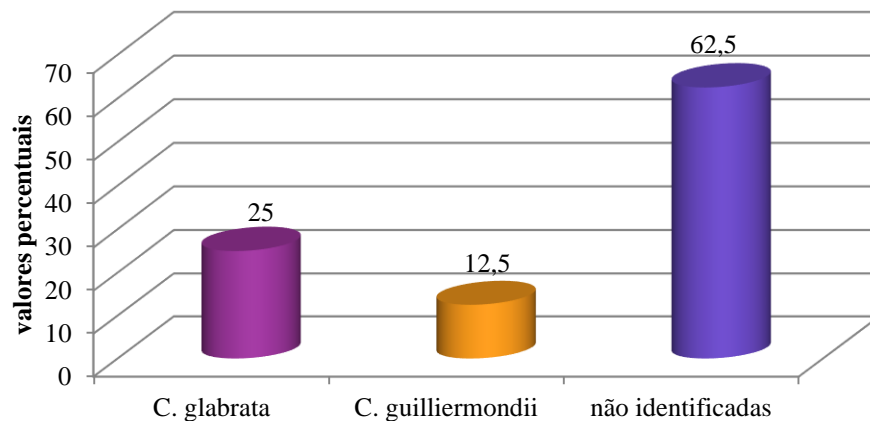


Figura 3.22: Percentagens dos resultados obtidos com o método de PCR-RFLP com os isolados clínicos não identificados pelo Teste da Blastese e por PCR multiplex.

Os isolados em relação aos quais não foi possível a identificação pelos dois métodos moleculares utilizados neste trabalho foram posteriormente identificados pelo teste convencional bioquímico já apresentado anteriormente, o ID 32C[®]: n^o 13 como sendo *C. catenulata*, n^o 48 como *C. lipolytica*, n^o 127 como *C. pelliculosa*, n^o 8 e n^o 62 identificados como sendo *Saccharomyces cerevisiae* e n^o 50 como *Trichosporon asahii*.

Com os resultados obtidos podemos verificar que para os três isolados clínicos identificados, as bandas características para cada espécie foram inequívocas, uma vez que cada espécie foi caracterizada por um padrão de bandas específicas. Nos restantes

seis isolados os *primers* universais ITS1 e ITS4 para fungos não foram capazes de amplificar as regiões ITS. Visto que a selecção dos *primers* é um parâmetro crítico para o sucesso da PCR-RFLP, podemos dizer que apesar do método ser específico, não foi possível identificar as espécies menos comuns.

De acordo com Lopes da Silva (2013), num estudo idêntico realizado em Portugal foi utilizada esta técnica de PCR-RFLP para identificar 17 isolados clínicos, onde 9 isolados foram identificados correctamente. De acordo com o protocolo descrito por Mirhendi *et al.* (2006), a identificação das leveduras do género *Candida* pelo método PCR-RFLP com enzima de restrição *MspI* é um método muito simples, fiável por ser específico e sensível, e rápido de executar e tem uma elevada reprodutibilidade em comparação com os métodos fenotípicos, quando se trata das espécies de *Candida* sp. mais comuns.

No entanto, este método requer a necessidade da extracção prévia de DNA obtido a partir de culturas puras após a sementeira das amostras biológicas, ao contrário de outros métodos moleculares, em que não é necessário extrair DNA, como é o caso do PCR multiplex (Carvalho *et al.* 2008).

No laboratório do Hospital Maternidade Irene Neto em Huíla, o método convencional utilizado para deteção, diferenciação e identificação de leveduras do género *Candida* é ambíguo, praticamente inexistente. Neste contexto os métodos moleculares representam uma importante alternativa pois, para além de aumentarem a sensibilidade e especificidade no processo de identificação, reduzem a subjectividade inerente aos métodos morfológicos e bioquímicos.

3.3.3 Prevalência das espécies isoladas

Em relação às diferentes espécies de leveduras identificadas pelos métodos convencionais e moleculares, verificou-se que a espécie *C. Albicans* foi a mais prevalente com 82 isolados. Foram ainda isoladas, mas em muito menor número, 4 *C. parapsilosis*, 4 *C. glabrata*, 2 *Saccharomyces cerevisiae*, 1 *C. pelliculosa*, 1 *C. guilliermondii*/*C. catenulata*, 1 *C. tropicalis*, 1 *C. lipolytica*, 1 *C. krusei* e 1 *Trichosporon asahii* (Figura 3.23).

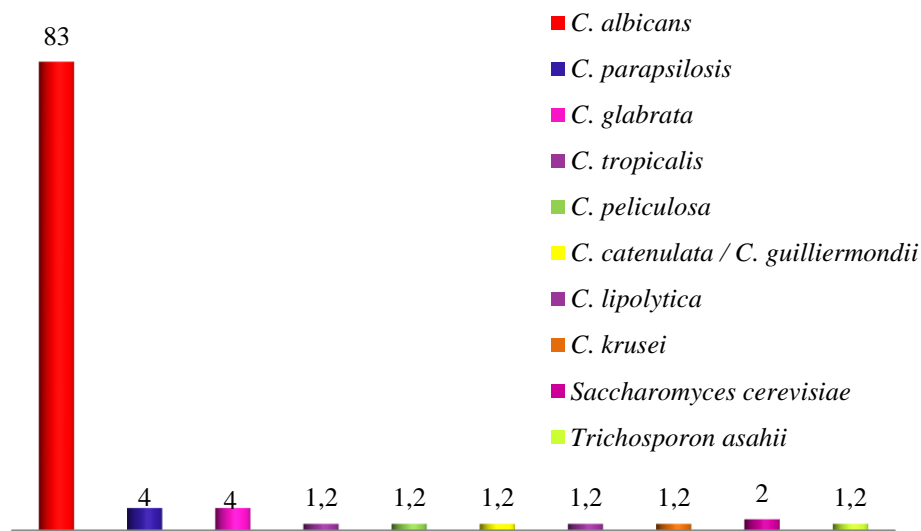


Figura 3.23: Percentagens das diferentes espécies de *Candida* isoladas de exsudados vaginais de pacientes do Hospital Maternidade Irene Neto, Huíla, Angola.

Fazendo uma retrospectiva geral dos resultados da presente pesquisa, relata índices mais elevados da espécie *C. albicans* em 83% dos casos. A espécie *C. albicans*, tem sido considerada como uma das leveduras mais patogénicas do género *Candida* e tem sido referido que é a levedura mais frequentemente isolada a partir de secreções vaginais de pacientes sintomáticas e assintomáticas. No entanto, de acordo com Achkar & Friest (2010), e Namkinga (2012), *C. albicans* mostra vários mecanismos que são sugestivos de virulência, tais como a capacidade de assumir morfologias variadas na forma de hifas, tubos germinativos e pseudofilamentos, a grande capacidade de adesão às superfícies das mucosas e a produção de enzimas hidrolíticas, de proteinases que hidrolisam peptídeos e de fosfolipases que hidrolisam fosfolípidos.

C. glabrata e *C. parapsilosis* foram, neste trabalho, as segundas espécies predominantes como agentes da candidíase vulvovaginal. Cada uma representou 4% dos isolados (5/98). Na verdade estas percentagens contrastam com aquelas que têm sido relatadas para *C. glabrata* como sendo a segunda espécie mais isolada de infecções vaginais por leveduras do género *Candida* (Chiossi, 2011). Contrariamente ao que está descrito na literatura, nesta pesquisa constatou-se que *C. parapsilosis* teve uma percentagem de ocorrência igual à de *C. glabrata*. Normalmente *C. parapsilosis* tem

sido descrita como sendo a segunda espécie mais comum isolada a partir de hemoculturas (Silva, 2011) e em pacientes transplantados ligados a cateteres. Apesar de ser uma espécie pouco frequente em amostras vaginais têm-se detectado percentagens de isolamento cada vez mais elevadas a partir de isolados vaginais (Treagan, 2011).

C. tropicalis tem sido considerada uma importante causa de candidemia em pacientes com linfoma, leucemia e diabetes *mellitus*. As infecções sistêmicas por *C. tropicalis* estão associadas a taxas mais elevadas de disseminação e de mortalidade (Barbedo & Sgarhi, 2010; Treagan, 2011).

C. lipolytica é uma levedura pouco frequente, isolada a partir de infecções oportunistas. Esta espécie tem sido isolada a partir de derivados de petróleo, matérias agrícolas, plantas e solo. No humano, tem sido detectada na urina, no esófago e no tracto genital feminino (Barbedo & Sgarhi, 2010). *C. krusei* tem demonstrado ser um patógeno importante nos pacientes transplantados da medula óssea, hematológicos. A identificação deste organismo é de grande importância médica devido à resistência intrínseca de alguns antifúngicos (Treagan, 2011). Na presente pesquisa notou-se que existe uma consistência com os dados da literatura no que refere há muito baixa ocorrência de *C. krusei* (1,2%), quando comparada as outras espécies de *C. não-albicans*. *C. guilliermondii* é uma levedura comensal embora seja cada vez mais descrita como emergente e considerada igualmente um agente patógeno causador de candidíase vaginal. Muitos casos de infecções por *C. guilliermondii* estão associados a pacientes submetidos a cirurgia abdominal, pacientes com cancro a pacientes submetidos a tratamentos invasivos (Neufried, 2009).

Nesta pesquisa a ocorrência das leveduras de *Saccharomyces cerevisiae* (2%) e *Trichosporon asahii* (1,2%) foi muito reduzida. Embora pouco comum, tem sido relatado o seu isolamento a partir de amostras vaginais. *Saccharomyces cerevisiae* tem sido descrita como causa de vaginite em mulheres e de balanite nos seus parceiros. A presença desta levedura é também muito frequente em pacientes com VIH. *Trichosporon asahii* é uma levedura oportunista descrita como sendo um agente patógeno emergente em infecções disseminadas e nosocomiais, embora seja isolado muito raramente. Esta levedura existe no solo, na água e faz parte da microbiota normal da pele e também foi isolada a partir de amostras genitais em cerca de 14% de um grupo de mulheres (Gomes *et al.* 2010).

No entanto, relativamente à ocorrência das espécies encontradas nesta pesquisa observou-se que os dados estão de acordo com os trabalhos realizados por Mutua *et al.* (2010) em outra região africana, em Nairobi, Quênia, num total de 101 amostras de secreções vaginais. Nesse trabalho *C. albicans* foi a espécie predominante (69,3%), seguido de *C. glabrata* (12,9%), *C. krusei* (3,0%), da espécie *Trichosporon* (3,0%), *S. cerevisiae* (3,0%) e *C. parapsilosis* (1,0%). Comparando os resultados dos dois trabalhos, nota-se que em ambos estudos houve uma prevalência significativa de espécies *C. não-albicans* pois as pacientes apresentaram factores de risco para o desenvolvimento de candidíase vulvovaginal. Em suma, a presente pesquisa contribuirá para o conhecimento da prevalência das espécies de *Candida* nas pacientes com infecção vaginal na província de Huíla, Angola.

3.3.4 Ocorrência de *Candida africana*

Candida africana é um agente patogénico oportunista recentemente descrito que tem sido associada a candidíase vulvovaginal filogeneticamente muito próximo de *C. albicans*. Na presente pesquisa, foi identificada utilizando o gene *HWP1* que codifica para a proteína de superfície da parede das hifas de *C. albicans* descrita por Romeo & Criseo (2011) a fim de discriminar esta espécie em relação a *C. africana*. Neste contexto, foram reexaminados todos os 82 isolados clínicos previamente identificados pelos métodos fenotípicos e moleculares como sendo *C. albicans*. Para a distinção das espécies por meio de uma reacção de PCR, foi utilizado um único par de *primers* CR-f e CR-r para amplificação do gene *HWP1*. A partir dos perfis electroforéticos dos isolados clínicos reexaminados, sete isolados produziram um fragmento de DNA com cerca de 700 pb correspondente à espécie *C. africana* (n^{os} 26, 42, 79, 122, 123, 131 e 141) enquanto os restantes 75 foram confirmados como sendo *C. albicans* (Romeo & Criseo 2008; Gumral *et al.* 2011). No Anexo 6, tabela 3 são apresentados os resultados obtidos com todos os isolados estudados e na Figura 3.24, as respectivas percentagens.

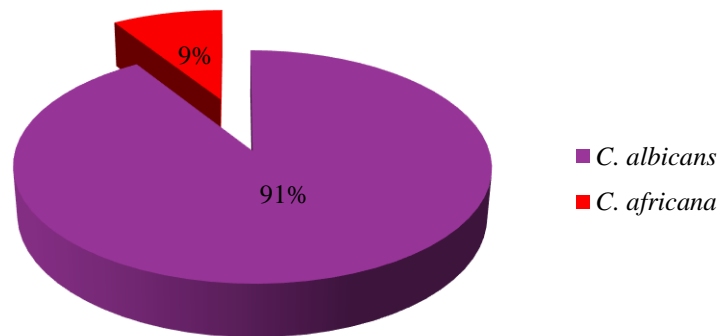


Figura 3.24: Percentagens obtidas com a diferenciação de *C. africana* e *C. albicans* após amplificação do gene *HWP1*.

Na figura 3.25 está representado o resultado da electroforese após amplificação por PCR do gene *HWP1* para diferenciação de *C. africana* em relação a *C. albicans*.

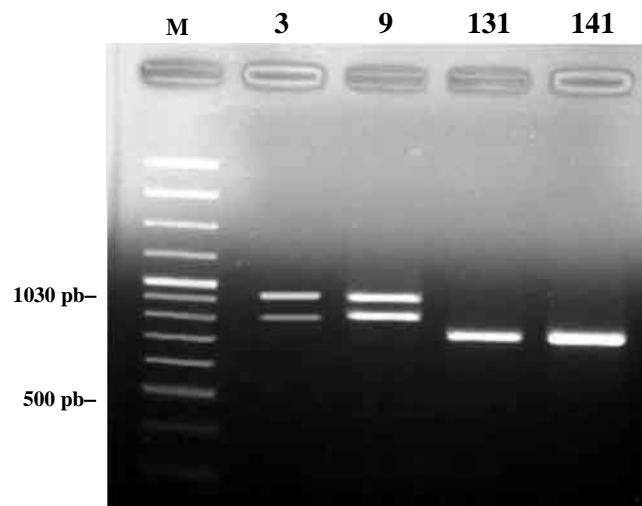


Figura 3.25: Padrão de bandas dos perfis electroforéticos obtidos por PCR resultantes da amplificação do gene *HWP1*. *C. albicans* isolados 3 e 9. *C. africana* isolados 131 e 141. M - marcador de pesos moleculares Gene Ruler DNA 100 pb®.

Com 39 dos isolados clínicos estudados por este método, inicialmente não foi possível obter qualquer amplificação do gene *HWP1*, sendo que foi necessário otimizar as reacções, principalmente ajustando as concentrações de DNA. No final foi possível obter resultados com todos os isolados de *C. albicans/C. africana*.

Candida africana parece ter uma distribuição de certa forma ampla, porque isolados desta espécie também foram relatados em pesquisas feitas em países Europeus,

incluindo a Alemanha, Espanha, Itália. Mesmo sendo difícil distinguir as colónias de *C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. africana* por métodos convencionais, Romeo e Criseo (2010) defendem que também é possível contornar esta situação utilizando um meio de cultura selectivo e diferencial onde normalmente se observam colónias diferentes para as três espécies.

De acordo com Dieng *et al.* (2012) numa pesquisa realizada no Senegal, a partir de 150 isolados de *C. albicans* provenientes de exsudados vaginais, identificaram três isolados *C. africana*.

Lopes da Silva (2013) também efectuado um estudo em Lisboa-Portugal com amostras de exsudados vaginais provenientes de Cabo-Verde. Onde dos 29 isolados testados ficou confirmado que 13 leveduras pertenciam realmente à espécie *C. albicans*, pois apresentavam uma banda electroforética com aproximadamente 1000 pb. Enquanto quatro leveduras revelaram ser da espécie *C. africana*, cuja banda específica tem aproximadamente 700 pb.

Num outro estudo realizado na Nigéria por Nnadi *et al.* (2011), um total de 177 isolados de leveduras do género *Candida*, 84 foram presumivelmente identificados como sendo *C. albicans* caracterizados fenotipicamente pela formação do tubo germinativo em soro humano a 37°C durante 2-3 horas e a produção de clamidósporos em meio cromogénico após incubação de cinco dias a uma temperatura 25°C. Destes 84 isolados, dois isolados não produziram clamidósporos e esta confirmação foi feita pelo método molecular na amplificação do gene *HWP1* como sendo *C. africana*.

A avaliação epidemiológica da prevalência de *C. africana* em amostras clínicas, neste momento, é escassa. Actualmente ainda existem diferentes opiniões sobre a posição taxonómica desta levedura patogénica e alguns autores consideram-na como sendo um biovar de *C. albicans* em vez de uma nova espécie (Romeo & Criseo 2010). Portanto nesta pesquisa apesar da elevada percentagem de isolados clínicos de *C. africana* encontrados comparativamente aos outros trabalhos sugerimos que seja necessária a realização de mais estudos entre, por exemplo, a população angolana e, num sentido mais lato, na população africana, tanto na residente em África como na emigrante.

3.4 COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS NA IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS CLÍNICOS

A capacidade das leveduras do género *Candida* aderirem às células, tecidos ou outro tipo de superfícies do hospedeiro, é um pré-requisito para a sua colonização, incluindo a região vulvovaginal, levando ao desenvolvimento de infecções.

Comparado o número das pacientes que apresentavam sinais e sintomas indicadores de candidíase vulvovaginal, esses valores foram concordantes com o resultado das culturas positivas (60,3%), indicando que a triagem foi adequada quando da selecção das pacientes que participaram desta pesquisa.

Comparando os resultados obtidos com os 92 isolados clínicos observados no exame directo positivo com os resultados obtidos nas provas morfológicas, verificou-se uma discrepância entre quatro isolados. Estas amostras tinham sido negativas no exame directo mas, após a inoculação e incubação das amostras biológicas em meio selectivos, desenvolveram-se colónias de leveduras.

Comparando os resultados obtidos no Teste da Blastese, que identifica leveduras da espécie *C. albicans*, com aqueles obtidos através da identificação por PCR-multiplex, verificamos que 14,6% dos isolados desta espécie apresentaram uma discrepância em relação aos resultados esperados, por terem sido negativos no teste da blastese.

A análise comparativa entre os resultados obtidos nos testes do tubo germinativo para as espécies *C. não-albicans* com os obtidos nos testes bioquímicos observou-se que os sete isolados apresentaram concordância de resultados no primeiro teste, pois nenhum deles formou tubo germinativo.

Verificou-se igualmente concordância entre os resultados dos testes bioquímicos em relação ao método micromorfológico realizado a partir das culturas em placas de Dalmau (meio EMB) excepto no caso em que se registou uma discrepância no isolado identificado como sendo *Candida parapsilosis* que na observação das microestruturas foi compatível com *C. krusei*.

A comparação entre os resultados obtidos na avaliação molecular PCR multiplex e de PCR-RFLP com aqueles encontrados nos testes bioquímicos revelou ter existido uma elevada correlação (100%), o que sugere a possibilidade de utilização dos testes bioquímicos na rotina laboratorial. A sensibilidade e especificidade do PCR multiplex e

PCR-RFLP em relação ao método bioquímico, para a *Saccharomyces cerevisiae*, *C. pelliculosa*, *C. catenulata*, *C. lipolytica* e *Trichosporon asahii*, foi elevada em ambos os testes moleculares, pois não sendo específicos para estas espécies, não geraram resultados falso positivos.

Uma vez que o método do PCR multiplex é específico, sensível e eficaz para a identificação de oito espécies de leveduras género *Candida*, após a repetição do procedimento, não seria de se esperar a ausência de produtos de amplificação dos três isolados *C. glabrata* e de *C. guilliermondii*, posteriormente identificados pela PCR-RFLP. Apesar da fiabilidade demonstrada pelos métodos moleculares em comparação com os métodos convencionais, estes ainda não são muito utilizados na rotina laboratorial para a identificação de leveduras do género *Candida*.

Foi ainda detectada a presença de isolados clínicos de *C. africana* por um método molecular, através da diferenciação do gene *HWP1* das espécies *C. albicans* e *C. africana*. Finalmente pôde-se constatar que os dois métodos moleculares PCR multiplex e PCR-RFLP, apesar de metodologias consideradas extremamente sensíveis, específicas e confiáveis, não foram capazes de identificar e distinguir a variante *C. africana* da espécie *C. albicans*.

3.5 TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS

Uma preocupação crescente na área de Micologia Médica tem sido, nestes últimos anos, o aumento do número de infecções causadas por leveduras do género *Candida* e a sua crescente aquisição de resistência aos antifúngicos. O aparecimento destas espécies resistentes, originou a necessidade de desenvolver, novas drogas e metodologias para determinar a sua sensibilidade *in vitro* às mesmas. O mercado farmacêutico oferece diversos antifúngicos de uso ambulatorio, de aplicação tópica e administração sistémica, bem como drogas de uso hospitalar. Na decorrência destes factos as organizações internacionais, *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* com a norma M44-A e, mais recentemente o EUCAST, têm levado a cabo a padronização dos testes de susceptibilidade aos antibióticos, bem como o estudo da incidência de resistências. Em Angola, a magnitude do estudo das resistências aos antifúngicos não é completamente conhecida fazendo com que o estudo do perfil de susceptibilidade às drogas

antifúngicas e a avaliação da metodologia dos testes disponíveis no Hospital Maternidade Irene Neto na Huíla seja bastante importante.

Neste trabalho foi avaliada a susceptibilidade *in vitro* de todos os isolados clínicos em estudo, utilizando quatro antifúngicos: fluconazol, voriconazol, caspofungina e posaconazol. Os testes foram realizados utilizando o método de difusão a partir de disco, utilizando o meio de cultura Müller-Hinton agar. Este método permitiu efectuar a triagem da resistência de todas as espécies de *Candida*. Os testes foram interpretados ao fim de 48 horas após incubação das culturas a 30°C e registadas as dimensões dos halos de inibição com os 98 isolados clínicos, para cada antifúngico. Foram ainda utilizadas duas estirpes de referência para o controle de qualidade provenientes de uma colecção de culturas com características fenotípicas e perfis de sensibilidade já conhecidos.

A interpretação dos resultados dos antifungigramas foi estabelecida de acordo com os critérios definidos para o método de Kirby-Bauer segundo a norma do CLSI. Cada isolado foi classificado nas categorias de sensível (S), sensível dependente da dose (SDD), intermédio (I) e resistentes (R) (figura 3.26). Os valores dos diâmetros dos halos de inibição e a concentração mínima inibitória (CMI) para os quatro antifúngicos encontrados nesta pesquisa estão expostos no Anexo 7, Tabela 4.

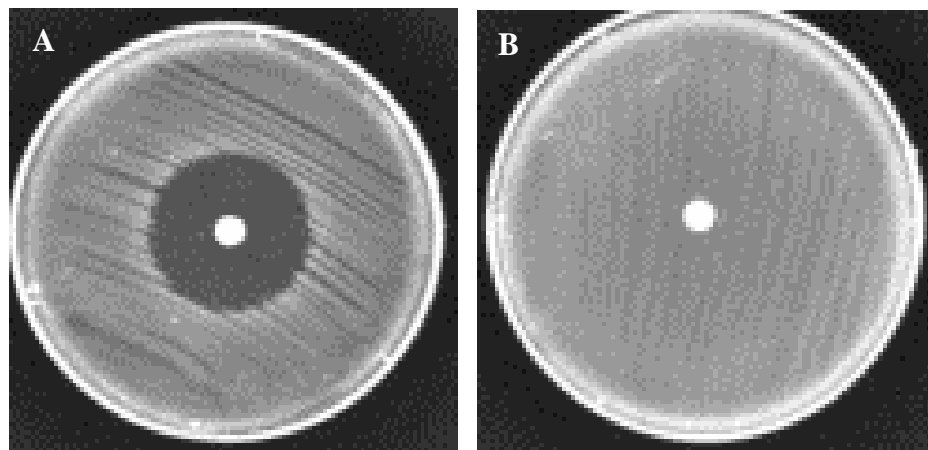


Figura 3.26: Exemplo dos resultados do teste de sensibilidade pelo método de Kirby-Bauer. A, isolado sensível; B, isolado resistente.

3.5.1 Susceptibilidade ao fluconazol

Em relação ao perfil de susceptibilidade ao fluconazol, 66% dos 98 isolados clínicos (65/98) foram considerados susceptíveis, 4% susceptíveis dependente da dose (4/98), 28% foram resistentes a este fármaco (27/98) e dois isolados não tiveram qualquer crescimento. Os resultados estão apresentados no Anexo 7, Tabela 4, e as percentagens de cada espécie estudada estão apresentadas na Tabela 3.27.

Analisando os resultados verificou-se um considerável grau de susceptibilidade de *C. albicans* a este fármaco. Dois isolados de *C. albicans* e um isolado de *C. parapsilosis* pertenciam à categoria de sensível dependente da dose. Embora as pacientes tenham relatado que não tinham feito tratamentos anteriores com fluconazol e sabendo que no Hospital Maternidade Irene Neto este fármaco não tem sido utilizado com frequência, 28% isolados clínicos (27/98) apresentaram resistência *in vitro* ao fluconazol, com maior predominância em *C. albicans*. Observou-se também que isolados de *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* apresentaram resistência a este fármaco.

Tabela 3.1: Percentagem dos perfis de susceptibilidade obtidos para o antifúngico fluconazol.

Espécie	Isolados sensíveis		SDD		Isolados resistentes	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<i>C. albicans</i>	58	89	2	50	22	81
<i>C. glabrata</i>	3	5	0	0	1	4
<i>C. lipolytica</i>	0	0	0	0	1	4
<i>C. parapsilosis</i>	2	3	1	25	1	4
<i>C. tropicalis</i>	0	0	0	0	1	4
<i>C. guilliermondii/ C.catenulata</i>	1 ¹	1,5	0	0	0	0
<i>C. pelliculosa</i>	1	1,5	0	0	0	0
<i>C. krusei</i>	0	0	0	0	1	3
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0 ²	0	0	0	0	0
<i>Trichosporon asahii</i>	0	0	1	25	0	0
Total	65	100	4	100	27	100

¹Ausência de crescimento no meio de Müller-Hinton com o antifúngico fluconazol: amostras 8 e 62, *S. cerevisiae*.² amostra nº13, *C. guilliermondii* por RFLP da região ITS do rDNA e *C. catenulata* por API ID32C®.

Estes valores são consistentes com aqueles relatados por Lopes da Silva (2013) num estudo realizado em Portugal onde 6,9% de *C. albicans* e 25% de *C. glabrata* foram resistentes ao fluconazol. No outro estudo também realizado com isolados clínicos da região de Lisboa por Carvalho (2010), verificou-se que, em relação às diferentes espécies, os isolados resistentes ao fluconazol foram 100% para *C. krusei*, 16% para *C. glabrata* e 14% para *C. tropicalis*. De acordo com Murray *et al.* (2009) *C. glabrata* exibe uma resistência primária ao fluconazol e menos de 2% das leveduras de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* são intrinsecamente resistentes ao fluconazol. Apesar de estas espécies exibirem resistência ao fluconazol, também é possível que as pacientes tenham feito anteriormente terapêutica com antibióticos e aplicando várias terapêuticas tópicas e, provavelmente as leveduras existentes na microbiota vaginal podem ter desenvolvido algum mecanismo de resistência, incluindo ao fluconazol. Na realidade deveria existir uma tendência para se evitar o uso profilático do fluconazol em doses baixas a fim de se prevenir o surgimento de isolados resistentes e de infecções causadas por espécies naturalmente resistentes a este antifúngico com *C. glabrata* e *C. krusei* (Alves *et al.* 2010).

3.5.2 Susceptibilidade ao voriconazol

O voriconazol é um antifúngico triazólico de amplo espectro que tem sido reservado para o tratamento de micoses oportunistas como é caso da candidíase vulvovaginal. Do número total de isolados testados em relação ao voriconazol, 62% dos isolados mostraram ser susceptíveis a este antifúngico (61/98), 3% apresentaram resistência intermédia (3/98) e 33% revelaram ser resistentes (32/98). As amostras nº8 e nº68 não apresentaram qualquer crescimento no meio de cultura de Müeller-Hinton, como está citado no Anexo 7, tabela 4. As percentagens de cada espécie são apresentadas na Tabela 3.2.

Tabela 3.2: Percentagem dos perfis de susceptibilidade obtidos para o antifúngico voriconazol.

Espécie	Isolados sensíveis		Intermédio		Isolados resistentes	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<i>C. albicans</i>	51	85	3	100	28	88
<i>C. glabrata</i>	3	5	0	0	1	3
<i>C. lipolytica</i>	1	2	0	0	0	0
<i>C. parapsilosis</i>	3	5	0	0	1	3
<i>C. tropicalis</i>	0	0	0	0	1	3
<i>C. guilliermondii/C. catenulata</i>	1 ¹	2	0	0	0	0
<i>C. pelliculosa</i>	0	0	0	0	1	0
<i>C. krusei</i>	0	0	0	0	1	3
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0 ²	0	0	0	0	0
<i>Trichosporon asahii</i>	1	1	0	0	0	0
Total	60	100	3	100	33	100

¹Ausência de crescimento no meio de Müeller-Hinton com o antifúngico voriconazol: amostras 8 e 62, *S. cerevisiae*.² Amostra n°13, identificada como *C. guilliermondii* por RFLP da região ITS do rDNA e *C. catenulata* por API ID32C.

Relativamente ao perfil de susceptibilidade ao voriconazol, houve maior predominância para a espécie *C. albicans* assim como em relação ao fluconazol. Verificou-se que 5% dos isolados de *C. glabrata* e *C. parapsilosis* foram sensíveis, ao voriconazol bem como o único isolado de *C. lipolytica*. Comparado com os resultados obtidos com fluconazol, o isolado de *C. lipolytica* foi resistente a ambos os antifúngicos. *Trichosporon asahii* mostrou ser susceptível ao voriconazol e susceptível dependente da dose ao fluconazol. Para os dois isolados de *Saccharomyces cerevisiae*, mesmo depois do teste ter sido repetido duas vezes, nunca foi obtido qualquer crescimento no meio Müeller-Hinton. A fim de contornar esta situação poder-se-ia ter usado o meio sólido RPMI em placa de petri ou líquido em microdiluição (AVISA 2013), mas para tal teria de ser realizada toda a metodologia adaptada a esses meios de cultura, na medida em que, segundo o CLSI, o método de Kirby-Bauer de difusão a partir de disco está padronizado para a utilização exclusiva de meio de Müeller-Hinton.

Foi observado ainda que 3% das estirpes de *C. tropicalis* e de *C. krusei* foram resistentes tanto ao voriconazol como ao fluconazol.

Num estudo realizado em Portugal por Lopes da Silva (2013), na região de Lisboa, verificou-se que 5,9% dos isolados clínicos de *C. albicans*, 50% de *C. glabrata* e 33,3% de *C. tropicalis* foram resistentes ao voriconazol. De acordo com outro estudo realizado também em Portugal por Carvalho (2008), a partir de amostras de exsudados vaginais, nenhum isolado apresentou qualquer resistência a este fármaco, demonstrando assim uma elevada actividade do voriconazol contra os isolados clínicos resistentes ao fluconazol. Este tipo de resultado, em que nenhum isolado apresenta resistência a este antifúngico, é incomum e não está muito descrito nas outras publicações. No presente estudo verificou-se a presença de isolados resistentes ao voriconazol, não diferindo muito do número de isolados resistentes ao fluconazol. Esta semelhança pode estar relacionada com a resistência cruzada devido a similaridade da estrutura química desses azólicos, pois os isolados resistentes ao fluconazol também podem apresentar resistência ao voriconazol.

3.5.3 Susceptibilidade ao posaconazol

Posaconazol é um novo triazol com uma actividade antifúngica e um largo espectro. Nesta pesquisa foi muito activo contra as leveduras do género *Candida*, como está demonstrado no Anexo 7, tabela 4. Nos resultados obtidos, (Tabela 3.4) foi observado que 83% das leveduras estudadas (81/98) foram identificados como susceptíveis a este antifúngico, 2% consideradas como susceptíveis dependente da dose (2/98) e 14% dos isolados apresentaram resistência a este fármaco (14/98).

O antifúngico posaconazol demonstrou ter boa actividade contra as estirpes estudadas. Ainda relativamente a este fármaco, os dois isolados susceptíveis dependentes da dose pertencem à espécie *C. albicans*, tal como foi observado para o voriconazol. Dos isolados de *C. não-albicans*, não se observou nenhum susceptível dependente da dose. Apesar de este antifúngico também ser um triazólico, *C. krusei* mostrou ser susceptível o posaconazol quando comparado à acção do fluconazol e do voriconazol.

Tabela 3.4: Percentagem dos perfis de susceptibilidade obtidos para o antifúngico posaconazol.

Espécie	Isolados sensíveis		SDD		Isolados resistentes	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<i>C. albicans</i>	69	85	2	100	11	79
<i>C. glabrata</i>	3	4	0	0	1	7
<i>C. lipolytica</i>	1	1,2	0	0	0	0
<i>C. parapsilosis</i>	4	5	0	0	0	0
<i>C. tropicalis</i>	1	1,2	0	0	0	0
<i>C. guilliermondii/ C. catenulata</i>	0	0	0	0	1	7
<i>C. pelliculosa</i>	1	1,2	0	0	0	0
<i>C. krusei</i>	1	1,2	0	0	0	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1 ¹	1,2	0	0	0	0
<i>Trichosporon asahii</i>	0	0	0	0	1	7
Total	81	100	2	100	14	100

¹Ausência de crescimento no meio de Mueller-Hinton com o antifúngico posaconazol: amostra 62.

Para além de *C. albicans*, três isolados pertencentes a espécies de *C. não-albicans* mostraram ser resistentes a este fármaco. Num estudo realizado por Tietz (2010) numa população alemã, onde participaram 15 pacientes diagnosticadas com candidíase vulvovaginal recorrente, 93% das pacientes (14/15) foram tratadas com sucesso com posaconazol e 6,6% (1/15) mostrou ser resistente a este fármaco. Durante a presente pesquisa notou-se que até agora, existem poucos estudos com dados clínicos que suportam a eficácia do posaconazol no tratamento da candidíase vaginal. Portanto devem ser realizados mais ensaios clínicos para aprofundar o conhecimento da acção antifúngica deste fármaco no tratamento desta infecção.

3.5.4 Susceptibilidade à caspofungina

A caspofungina pertence à classe das equinocandinas, um antifúngico que actua na inibição da síntese da (1,3)- β -D-glucano, um polissacarídeo componente essencial, presente na estrutura da parede celular das leveduras (Murray *et al.* 2009). Em relação à caspofungina, 82% dos isolados (80/98) mostraram ser susceptíveis a este antifúngico, 4% (4/98) revelaram ser susceptíveis dependentes da dose e 26,5% dos isolados (13/98)

apresentaram resistência. Um isolado, a amostra nº62, não cresceu no meio de cultura do teste. Os valores dos diâmetros dos halos de inibição são apresentados no Anexo7, Tabela 4. As percentagens de susceptibilidade determinada para cada uma das espécies, está demonstrada na Tabela 3.3.

A caspofungina demonstrou ter boa acção antifúngica em relação às diferentes espécies de *Candida*, incluindo as estirpes resistentes aos azólicos. Nos resultados obtidos notou-se que houve uma maior predominância do perfil de susceptibilidade de todas as espécies *C. não-albicans* em relação a este fármaco. A caspofungina foi mais eficaz quando comparada com os outros três fármacos anteriormente estudados. Um isolado de *S. cerevisiae* mostrou ser sensível em relação a este fármaco.

Tabela 3.3: Percentagem dos perfis susceptibilidade obtidos para o antifúngico caspofungina.

Espécie	Isolados sensíveis		SDD		Isolados resistentes	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<i>C. albicans</i>	65	81,25	4	100	13	100
<i>C. glabrata</i>	4	5	0	0	0	0
<i>C. lipolytica</i>	1	1,25	0	0	0	0
<i>C. parapsilosis</i>	4	5	0	0	0	0
<i>C. tropicalis</i>	1	1,25	0	0	0	0
<i>C. guilliermondii/C. catenulata</i>	1	1,25	0	0	0	0
<i>C. pelliculosa</i>	1	1,25	0	0	0	0
<i>C. krusei</i>	1	1,25	0	0	0	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1 ¹	1,25	0	0	0	0
<i>Trichosporon asahii</i>	1	1,25	0	0	0	0
Total	80	100	4	100	13	100

¹Ausência de crescimento no meio de Mueller-Hinton com o antifúngico caspofungina: amostra 62

De acordo com Murry (2009) a espécie *Trichosporon asahii* não é activa a caspofungina. Mas no presente trabalho foi ser susceptível ao fármaco em questão. A caspofungina, em relação aos isolados de *C. albicans* resistentes e susceptíveis dependentes da dose aos outros antifúngicos, mostrou ter uma eficácia superior. Durante a pesquisa notou-se uma falta de publicações de estudos de casos de candidíase

vulvovaginal tratadas com caspofungina e, deste modo, não foi possível fazer uma comparação dos resultados obtidos com os publicados por outros autores. Os resultados obtidos reforçam a importância da realização de programas de estudos epidemiológicos para comprovação do perfil susceptibilidade em relação aos novos antifúngicos.

3.5.5 Comparação dos perfis de susceptibilidade aos antifúngicos

Comparando os perfis de susceptibilidade obtidos para os quatro antifúngicos estudados, de uma forma global observou-se que um elevado número de isolados era susceptível. Tal como em outros trabalhos, os isolados susceptíveis dependentes da dose em relação ao fluconazol ao voriconazol não foram muito frequentes, tanto para *C. albicans* como para *C. não-albicans*. Em relação ao posaconazol e à caspofungina, para além de ter sido detectado um número reduzido de isolados susceptíveis depende da dose, todos *C. albicans*, também se detectou uma baixa percentagem de isolados resistentes. A espécie *C. krusei* foi resistente em ambos azóis fluconazol e voriconazol e o posaconazol apesar de pertencer a classe os azólicos, mostrou ser activo em relação a *C. krusei*. A caspofungina, pertencente à classe das equinocandinas, demonstrou ter boa actividade em relação aos antifúngicos fluconazol, voriconazol e posaconazol em relação aos isolados *Candida*, tanto *C. albicans* como *C. não-albicans*.

A variação dos diâmetros das zonas de inibição para cada um dos antifúngicos foi de 6 a 48 mm para o fluconazol, de 6 a 50 mm para o voriconazol, de 4 a 35 mm para a caspofungina e de 6 a 45 mm para o posaconazol. Como resultado, as CMI variaram entre <0,25 a 78 µg/ml para o fluconazol e 0,01 a 4,9 µg/ml para o voriconazol. Para a caspofungina e o posaconazol ainda não há valores de CMI estabelecidos.

Do total de isolados, 7% dos isolados da espécie *C. albicans* (7/98) apresentaram multi-resistência aos quatro fármacos azólicos e à equinocandina. Como se sabe a multi-resistência dos fármacos *in vivo* e *in vitro* ocorre quando pelo menos dois diferentes mecanismos de resistência coexistentes conferem resistência há dois ou mais compostos químicos não relacionados. Na medicina esse mecanismo é conhecido como Resistência a Múltiplas Drogas (MDR) e é responsável pelo fracasso terapêutico de uma ampla gama de agentes anti-fúngicos. De acordo Murray *et al.* (2009) e Mário (2012) os principais factores das falhas terapêuticas em relação à terapêutica com antifúngicos são os seguintes:

- a) Dose inadequada ou uma modificação na quantidade ou na qualidade da enzima-alvo, acesso reduzido do fármaco ao alvo, ou uma combinação de ambos;
- b) Absorção, distribuição ou metabolismo deficiente;
- c) Interações medicamentosas do hospedeiro, entre a droga e o agente patogénico;
- d) Super expressão da bomba de efluxo;
- e) Super expressão do gene *ERG11*. Também pode haver pontos de mutações nos genes *ERG11* e *FKS1*.

Existem ainda outros factores clínicos que contribuem para o desenvolvimento de resistências como factores locais que interferem na acção do antifúngico como formação de biofilmes pelo microrganismo ou uma depressão severa do sistema imunológico em pacientes portadoras do vírus imunodeficiência humana também pode ser responsável pelo fracasso da terapêutica pois, para a erradicação da infecção, também é necessário um bom funcionamento dos leucócitos polimorfonucleares e das células mediadoras de imunidade (Mário, 2012). Quando há vários mecanismos que contribuem para resistência, são necessárias diversas doses para obter informação suficiente gerar relações significativas dose/resposta, ou outros testes de sensibilidade como é o caso da microdiluição.

De acordo com Murray *et al.* (2009) os testes de susceptibilidade aos antifúngicos são, por um lado, úteis para determinar a actividade relativa de um ou mais antifúngicos em relação ao agente patogénico que está a causar a infecção e, por outro, para auxiliar na escolha do antifúngico mais apropriado para o tratamento das diferentes formas de infecção.

Em decorrência da sua simplicidade sugere-se que, o método de Kirby-Bauer, com a aplicação discos impregnados de antifúngico e sua difusão em meio de cultura, possa ser uma ferramenta útil nos laboratórios de microbiologia clínica na avaliação da susceptibilidade das leveduras em relação aos antifúngicos. Pode tornar-se muito comum na rotina laboratorial por possuir boa eficácia, apresentar um baixo custo e facilidade de execução. Uma das limitações deste teste é a possibilidade de aplicação inicial de um inóculo demasiado denso que pode vir a influenciar, posteriormente, os resultados.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na última década, tem-se avançado muito na aplicação de técnicas de biologia molecular no que concerne à identificação molecular de *Candida* spp. Na presente pesquisa a determinação das características fenotípicas e genotípicas das leveduras do género *Candida* permitiram uma correcta identificação das diferentes espécies. O principal objectivo deste trabalho consistia na detecção e identificação rápida e específica de diferentes espécies de leveduras de interesse médico do género *Candida* presentes em amostras clínicas de exsudados vulvovaginais e no estudados padrões de resistência aos fármacos antifúngicos e, no final, todos estes objectivos inicialmente traçados foram alcançados.

Dado que estes agentes etiológicos são a maior causa de infecção fúngica no ser humano, torna-se fundamental conhecer melhor as diferentes formas de detectar a presença das leveduras do género *Candida* em amostras biológicas. Na presente pesquisa participaram pacientes em idade fértil com factores de risco e manifestações clínicas de candidíase vulvovaginal. Em relação à colheita e transporte das amostras foram utilizadas zaragatoas esterilizadas e meio de transporte adequado para manter as amostras viáveis por um longo período de tempo. Na realidade, a utilização deste material foi imprescindível para a conservação e transporte das amostras biológicas desde o Hospital Maternidade Irene Neto de Huíla, Angola para o laboratório de Micologia do Instituto de Higiene e Medicina Tropical em Lisboa. Das 159 amostras recolhidas, apenas 98 tiveram cultura positiva de *Candida* sp. confirmando deste modo candidíase vulvovaginal.

Candida. albicans foi a espécie mais prevalente, embora as espécies *C. não-albicans* estejam a aumentar de frequência. Em relação a estas últimas, houve nesta pesquisa uma frequência elevada das espécies *C. parapsilosis* e *C. glabrata* (4%). Para uma identificação económica e acessível de *C. albicans*, a prova do tubo germinativo mostrou ser eficaz e aplicável em laboratórios com recursos limitados. No entanto é de realçar que se observou uma taxa mais elevada de falsos negativos (14,6%) do que a que está descrita na literatura, ou seja, de leveduras da espécie *C. albicans* não

formadoras de tubo germinativo. Para a identificação bioquímica utilizou-se a galeria ID32C® e verificou-se uma excelente eficácia com esta técnica.

O meio de EMB adicionado ou não de Tween 80 mostrou ser útil na identificação das espécies através da observação das características micromorfológicas das leveduras, incluindo nos três isolados que não pertenciam ao género *Candida*.

Os métodos moleculares apresentaram-se como sendo métodos rápidos, práticos e eficazes, principalmente na detecção de infecções mistas. Devido à sensibilidade e especificidade das reacções de PCR desde que haja *primers* específicos, também foi possível identificar *C. africana*, uma nova variante da *C. albicans*.

Os testes de susceptibilidade aos antifúngicos devem ser utilizados, mesmo que não façam parte da rotina laboratorial, pois permitirão a escolha do fármaco adequado e da dose ideal a serem usada para cada paciente com base em critérios farmacológicos, evitando-se a administração de dose excessiva ou errada e, conseqüentemente efeitos colaterais como, por exemplo, a selecção de microrganismos resistentes (Giolo & Svidzinski, 2010). A maioria parte dos isolados clínicos estudados apresentaram, de uma forma geral, uma boa susceptibilidade aos quatro antifúngicos testados. Todavia a espécie *C. albicans*, apesar de ser a mais prevalente, apresentou uma susceptibilidade maiselevada em relação aos fármacos estudados. A monitorização das amostras clínicas, a cuidados na escolha e planificação dos protocolos adoptados, podem ser ferramentas extremamente úteis no sentido de diminuir as conseqüências da infecção causada por *Candida* spp. A resistência ao fluconazol foi verificada em 28% isolados clínicos. Em relação ao voriconazol, 33% dos isolados clínicos apresentaram resistência. Estes resultados já eram de esperar, pois tem sido largamente descrito que algumas espécies de *Candida* não-*albicans* são intrinsecamente resistentes aos azóis. Em relação ao posaconazol e à caspofungina observou-se uma baixa percentagem de resistências (14% e 13%, respectivamente). Foi igualmente observada multirresistência em sete isolados clínicos, face aos quatro antifúngicos sugerindo-se a necessidade efectuar o estudo dos mecanismos de resistência destes isolados, incluindo os genes associados à resistência. Neste contexto, reforçamos a necessidade de realizar mais pesquisas mais aprofundadas para a avaliação da susceptibilidade *in vitro* das leveduras aos fármacos antifúngicos.

Finalmente, é preciso aumentar a divulgação sobre a etiologia da candidíase vulvovaginal quer entre a população em geral, quer entre os profissionais de saúde da

província de Huíla e estabelecer programas eficazes de fármaco-vigilância ligados à determinação da susceptibilidade *in vitro* das leveduras *Candida* sp. no Hospital Maternidade Irene Neto a fim de procurar controlar melhor o número e a gravidade dos casos de candidíase vulvovaginal.

Futuramente, será importante dar continuidade a esta pesquisa devido a avaliação do impacto que ela deve ter na comunidade lubanguense. Esta é a primeira pesquisa realizada na província de Huíla na tentativa melhorar as condições desta população no controlo e combate destas infecções causada por *Candida* spp. Deste modo, segundo Neufeld (2009), o método de identificação mais adequado será aquele que oferecer a melhor correlação de resultados *in vitro* e *in vivo*.

Pensamos que no futuro, deverão ser realizados estudos epidemiológicos aplicando novos métodos de diagnóstico. Neste contexto, a implementação de novas técnicas, em particular no laboratório do Hospital Maternidade Irene Neto, é de extrema importância pois facilitará a adaptação de novas estratégias para identificação, tratamento, controle e prevenção destas infecções, bem como acompanhar as alterações na ocorrência e distribuição das leveduras do longo do tempo.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Achkar, J. M. & Friest, B. C. (2010). *Candida* Infections of the Genitourinary Tract, *clinical microbiology reviews*.23 (2): 253- 273.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2013). Microbiologia Clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde Módulo VIII: Detecção e Identificação dos Fungos de Importância Médica Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/mod> pdf Acessado em: 02.10.2013

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). (2004). Detecção e Identificação dos Fungos de Importância Médica. Módulo VII. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/mod> pdf Acessado em: 10.05.2013

Águas, F. & Silva, D. P. (2012). Revisão dos Consensos em Infecções Vulvovaginais. *Sociedade Portuguesa de Ginecologia*. 6-12

Akpan, U. P., Ekpenyong C. E., Ibu, J., E. e Ibu, J. O. (2011). Incidence of vulvovaginal candidiasis among Nigeria women in tight fitting underwears: The need for counseling and health education. *Journal of Public Health and Epidemiology*, 3(10): 478-481

Albuquerque, C., Beltrán, S., Olivares, R., Falconer, M. A., Amaro, J., Fuentes, M. y. e Tapia, C.V. (2013). Distribución de especies y perfil de susceptibilidad de aislados de *Candida* spp: la importancia de vigilar también cepas de la comunidad. *Revista chilena de infectologia* 3: (3)

Alves I. A., Fernanda; P. C.e Goulart L. S., (2010) Identification by PCR and antifungal susceptibility of vaginal clinical *Candida* sp isolates. *Rev. Soc. Bras. Med.Trop.* 43 (5)

Amadio, J. V. R. S. (2010). Caracterização fenotípica de leveduras do género *Candida* na cavidade oral de lactentes em alimentação artificial e aleitamento materno e mamas das nutrizes. Dissertação para obtenção do grau de Mestre. Universidade Federal de Mato Grosso Faculdade de Ciências Médicas

Amouri, I., Sellami, H., Borji, N., Abbes, S., Sellami, A., Cheikhrouhou, F., Maazoun, L., Khaled., S, Khrouf, S., Boujelben, Y. e Ayadi, A.(2010) Epidemiological survey of vulvovaginal candidosis in Sfax, Tunisia. *Mycoses*.54 (5): 499-505.

Barbedo, L.S. & Sgarbi, D.B.G. (2010) Candidíase. *DST - J bras Doenças Sex Transm.* 22(1): 22-38

Bhavasara R. S., Goje S. K., Takalkar A. A., Ganvir S. M., Hazarey V. K. e Gosavi S.R. (2010). Detection of Candida by calcofluor white. Department of Oral Pathology and Microbiology. *Acta Cytol.* 54 (5):679-84.

Brooks, G. F. *et al.* (2010) Multilocus digital sequence reveals transmission of *Candida albicans* within and between families. *J. Clin. Microbiol.* 44:1810-1820

Burmester Gerd-Rudi & Pezzutto A. (2005) Imunologia, texto e Atlas. *LIDEL*.58-59

Campos, A. C. C., Murta, E. F. C., Michelin, M. A., Paulnelli R. R. e Reis, C. (2011). Avaliação de citocinas com candidíase, tricomaníase ou vaginite bacteriana, *revista de patologia tropical.* 40 (2): 125-136.

Lacaz C. S. (1980). Candidíases editora *Pedagógica e Universitária de São Paulo.* 58-59

Carneiro S. G. de Sá (2007) utilidad del Agar Eosina y Azul-de-metileno en la diferenciación y identificación morfológica de levaduras de interés clínico, Universidade de Santiago de Compostela Faculdade de Biología

Carvalho, A. Oliveira, S., Martins, M. L., Pina-Vaz C., Rodrigues A.e Rodrigues F. (2007). Multiplex PCR identification of eight clinically relevant *Candida* species. *Med Mycol.*18:1-9

Carvalho, E. E. (2010). Diagnóstico Laboratorial de Micoses Humana – Métodos Convencionais vs Métodos Moleculares. Tese de Mestrado. Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa.

Chiossi, L.G. (2011). Identificação de *Candidas* de fluido vaginal e perfil de susceptibilidade *in vitro* ao fluconazol. Universidade Feevale. Novo Hamburgo-RS.

Costa K. R. C. & Candido R. C. (2007) Diagnóstico Laboratorial da Candidíase Oral *News Lab.* 83 Edição.

Diegn, Y., Sow, D., Ndiaye, M., Guichet, E., Faye, B., Tine, R., Lo, A., Sylla, K., Ndiaye, M., Abiola, A., Dieng, T., Ndiaye, J.L., Le Pape, P. e Gaye, O. (2012) Identification of three sources of *Candida* africana au Sénégal. *Journal de Mycologie Médicale* 22:335-340.

Almeida, S. R., (1999). Apostila de Micologia Clínica. Faculdade de Ciências Farmacêuticas Universidade de São Paulo.

- Eraso, E. Ruesga M., Villar-Vidal, M., Carrillo-Muñoz, A. J., Espinel-Ingroff, A., e Quindós.G. (2008).Comparative evaluation of ATB Fungus 2 and Sensititre Yeast One panels for testing *in vitro* *Candida* antifungal susceptibility. *Rev. Iberoam. Micol.* 25: 3-6.
- Estermann, C., (1956). Etnografia do Sudoeste de Angola. Lisboa: *Junta de Investigações do Ultramar.* (3). (128)
- Farage, A. M. & Maibach, H. I., (2011). Morphology and Physiological Changes of Genital Skin and Mucosa. *Karger AG, Basel* .40: 9-19.
- Ferreira, A. S. A. (2008). Infecções fúngicas – Diagnóstico e epidemiologia. Tese de Mestrado. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.
- Ferreira W.F.C, Sousa J.C.F. e Lima N. (2010) Microbiologia. *LIDEL*.145-165
- Feuerschuette, O. H. M., Silveira S. K, Feuerschuette I., Corrêa T., Grando L. e Trepani A. (2010) Recurrent vaginal candidiasis: clinical management. *FEMINA* 38 (2)
- Fischer G. (2010). Chronic vulvitis in pre-pubertal girlsajd. *Australasian Journal of Dermatology* 51:118–123
- Fournier, P., Schwebel C., Maubon, D., Vesin, A., Lebeau¹, B., Feroni L., Hamidfar-Roy, R., Cornet, M., Timsit J. F. e Pelloux H., (2011) Antifungal use influences *Candida* species distribution and susceptibility in the intensive care unit. *Journal of antimicrobial chemotherapy.* 66: 2880– 2886.
- Fukuda, E. K. Dalberto A., F., Vasconcelos; Matias, A., C. Barbos, A, de M; Robert Dekker, F. H; Silva M. e Silva M. L. C. (2009) Polissacarídeos de parede celular fúngica: Purificação e caracterização. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina.* 30 (1):117-134.
- Giolo, M. P. & Svidzinski T. I. E., (2010). Physiopathogenesis, epidemiology and laboratory diagnosis of candidemia. *J Bras Patol Med Lab* 46 (3): 225-234.
- Gomes B. S., Motta C.M., Lima A. N. e Porto A. L. F., (2011). Pathogenic characteristics of yeasts isolated from vaginal secretion preserved under mineral oil, *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 17 (4): 460-466.
- Gondo, D. C. A. F. Duarte; M. T. C., da Silva; M. G. e Parada, C. M. G. L., (2010). Alteração de flora vaginal em gestantes de baixo risco, atendidas em serviço público de saúde: prevalência e associação à sintomatologia e achados do exame ginecológico. *Rev. Latino-Am. Enfermagem.*18 (5)

- Gumral R, Sancak B, Guzel B. A., Saracılı M. A. e Ilkit M., (2011) Lack of *Candida africana* and *Candida dubliniensis* in Vaginal *Candida albicans* Isolates in Turkey Using *HWP1* Gene Polymorphisms. *Mycopathologia* 172:73–76.
- Hainer, B. L. & Gibson M. V., (2011). Vaginitis: Diagnosis and Treatment. *Am Fam Physician*, 83 (7): 807-815.
- Hernández, M. L., Pla J. e Nombela C. (1997). Aspectos moleculares y genéticos de la resistencia a azoles en *Candida Albicans*. *Rev Iberoam Micol.* 14:150-154.
- Hofling, J. F. & Gonçalves R. B. (2008), microscopia de luz em microbiologia: microscopia bacteriana e fúngica. ISBN 978-85-363 1596-6.
- Johnson, E. M. (2008). Issues in antifungal susceptibility testing. *J. Antimicrob. Chemother.* 61: i13-i18.
- Kennedy, M. A. & Sobel J. D., (2010) Vulvovaginal Candidiasis Caused by Non-*albicans Candida* Species: New Insights. *Curr Infect Dis Rep.* 12: 465-70.
- Kwon-Chung, K. J. & Bennett, J. E., (1992) Medical Micology. Lea & Feb
- Lacasa, E. C., E. C., Mazulos, E. M., Espinel. Ingroff, A., (2007) Método estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos. *Revista iberoamericana de Micología.* 15a-1
- Linhares I. M., Giraldo, P.C., Baracat, E. C., (2010) Novos conhecimentos sobre a flora bacteriana vaginal. *Rev Assoc Med Bras.* 56 (3): 370-4.
- Lopes da Silva, Z. D. (2013). Ocorrência, diagnóstico molecular e resistência a antifúngicos de *Candida* sp. de infecções vaginais em Portugal e Cabo-Verde. Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Genética Molecular e Biomedicina. Portugal.
- Lucas, I. C. R. N., Freitas, A. F., de Oliveira, S. M., da Silva, J. A. e Gomes, D. A. G. da S. (2012). Prurido vulvar: diagnóstico diferencial para médicos generalistas *Revista de Medicina e Saúde de Brasília.* 1 (1):20-5
- Llovo J., Rodrigues-Orteo L., Cortizo-Vidal, S. e Muñoz, Z. A.(2006).The 16th congresso of the Internacional Society for Human and Animal Micology. *ISHAM, IMEDEX.* Paris. 0405-0405
- Madhavan, P., Jamal F. Pei, P. C. (2011) Isolamento de laboratório e Identificação de *Candida* Espécies. *Journal of Applied Sciences.* 11: 2870-2877.

Mario D. A. N (2012), Actividade das equinocandinas, anfotericina B e voriconazol frente a isolados de *Candida glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol. Dissertação para obtenção do grau de Mestre. Brasil. Universidade Federal de Santa Maria.

Martins, M. L (2010). Apontamentos de Micología Médica. Laboratório de Micología do instituto de higiene e medicina tropical, Lisboa.

Mazulos, E. M., Lacasa, E. C., E. C., Espinel-Ingroff, A., (2007) Outros método estudo de la sensibilidade de las antifúngicos. *Revista ibero-americana de Micologia*. 16 a-1

Mirhendi, H., Makimura, K., Khoramizadeh, M. e Yamaguchi, H., (2006). A one-enzyme PCR-RFLP assay for identification of six medically important *Candida* species. *JpnJ. Med. Mycol*. 47:225-229

Murray P. R., Rosenthal, K. S. e Pfaller M. A., (2009). Microbiologia Médica, *Elsevier Editora Ltda*. 6ª Edição.

Mutua F, G Revathi e Machoki J.M., (2010) Species distribution and antifungal sensitivity patterns of vaginal yeasts. *Médio AfrMed J*. 87 (4): 156-62.

Namkinga L. A. (2012). Diversity of Pathogenic *Candida* Species Colonizing Women with and without *Candida* Vaginitis in Dar es Salaam Region, Tanzania. *Jornal of Biology and Life science*.4 (1).

Nascimento, A. C. M. O. B. (2009). Susceptibilidade antifúngica, produção de biofilme e caracterização do gene *ALS3* em isolados de *cândida albicans* e não-*albicans* do hospital das clínicas, unesp. Botucatu. Dissertação para obtenção do grau de Mestre Universidade estadual paulista Instituto de Biociências. câmpus de botucatu.

Neufeld P. M. (2009). Caracterização taxonômica e susceptibilidade a antifúngicos de leveduras isoladas de infecção hospitalar. Dissertação para obtenção do grau de Doutorado em Vigilância Sanitária. Instituto Nacional de Controlo de Qualidade em Saúde-Fundação Oswaldo Cruz. Brasil.

Nndai N.E, Ayanbimpe G.M., Gumral R., Sancak B., Ahmet B. G., Sararc M.L. e Ilkiti I.M. (2011) Lack of *Candida africana* and *Candida dubliniensis* in Vaginal *Candida albicans* Isolates in Turkey Using *HWP1* Gene Polymorphisms. *Mycopathologia*. 172:73-76

Nobile C. J., Nett J. E., Andes D. R., e Mitchell A. P., (2006) Function of *Candida albicans* Adhesin *HWP1* in Biofilm Formation. *Eukaryot Cell*.5 (10) 1604– 1610.

Nodarse, J. F. (2012). Virus de *Trichomonas vaginalis*: análisis filogenético y de la posible asociación con la virulencia del parasito. Dissertação para obtenção do grau de Doutoramento. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" Departamento de Parasitología.la habana.

Oliveira, A. W., Pereira, F. de O., de Luna G. C. D. G. e Oliveira I. (2011). antifungal activity of *cymbopogon winterianus* jowitt ex bor against *candida albicans*. *Brazilian Journal of Microbiology*. 42: 433-441.

Oliveira, J. C. (2012). Tópicos em Micologia Médica. ISBN 3ª edição

Paredes, C. V. T. (2009). Actualización en pruebas de susceptibilidad antifúngica. *Rev. Chil. Infect.* 26: 144-150.

Paróla A. G. (2010). Estudo Epidemiológico de Candidíase Invasiva na Unidade de Cuidados Intensivos do Hospital Egas Moniz-Centro Hospitalar Lisboa Ocidental.Dissertação para obtenção do grau de Mestre Universidade de Lisboa Faculdade de Medicina de Lisboa.

Pereira A. P. V. (2010). Identificação Molecular de Candidoses invasivas no Centro Hospitalar Cova da Beira, E.P.E Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas, Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa. 66

Pfaller, M. A. (2012). Antifungal Drug Resistance: mechanisms, Epidemiology and consequences for treatment, the *American Journal of Medicine*.125 (1A): S3-S13

Prasad, H., Abraham, S., Kurz, K., M., George, Lalitha, V., John M.K, R., Jayapaul, M., N., R., Shetty e Joseph, N., A. (2005). Reproductive tract infections among young married women in Tamil Nadu, India,"*International Family Planning Perspectives, ELSEVIER* 31(2):73–82.

Quan M. (2010) Vaginitis: diagnosis and management. *Review. Postgrad Med.* 122: 117-27.

Rad, M.M., Zafarghandi, A.S., Zabihi, M.A., Tavallae, M. e Mirdamidi, Y. (2012). Identification of Candida Species Associated with Vulvovaginal Candidiasis by Multiplex PCR. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*.

Rathod, S. D., Klausner, J. D., Krupp K., Reignold., A. L. e Madhivanam, P.,(2012) Epidemiologic Features of Vulvovaginal Candidiasis among Reproductive-Age Women in India. *Infections Diseases in obstetrics and gynecology*.1-8

Roberts C. L., Rickard K., Kotsiou G. e Morris J., M., (2011). Treatment of asymptomatic vaginal candidiasis in pregnancy to prevent preterm birth: an openlabel pilot randomized controlled trial *licensee Bio Med Central Ltd Pregnancy and Childbirth* 1471-2393/11/18 Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/pdf> Acessado em: 11.06.2013

Romeo, O. & Criseo. G. (2008). First molecular method for discriminating between *Candida africana*, *Candida albicans*, and *Candida dubliniensis* by using hwp1 gene, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 62:.230–233.

Romeo, O. & Criseo, G. (2010). *Candida africana* and its closest relatives. *Mycoses*, 54: 475– 486

Santos R. da S., Lima, P. de S., Almeida D. C. e Barbosa M. S., (2012). Interações moleculares mediadas por proteínas de adesão celular levam à sobrevivência e ao Sucesso na infecção causada por fungos patogênicos em humanos. *Revista Saúde e Pesquisa*. 5 (1): 183-196.

Shokohi, T. Soteh, H. M. B, Pouri, S. Z., HedayatI, M. T., Mayahis. (2010). Identification of *Candida* species using PCR-RFLP in cancer patients in Iran. *Journal of Medical Microbiology*, 28 (2):147-151.

Sobel, J.D. (2010). Genital candidiasis. *vaginal infections*

Stainki D. R. (2012). Centro de Ciências da Saúde (CCS) Departamento de Microbiologia e Parasitologia Disciplina de Microbiologia Geral universidade Federal de Santa Maria. disponível em: [www.ufsm.br/microgeral/Microbiota%20 normal.pdf](http://www.ufsm.br/microgeral/Microbiota%20normal.pdf) Acessado em: 19.05.2013

Surber, C., Elsner, P. e Farage, M. A. (2011). Morphology and Physiological Changes of Genital Skin and Mucosa. Topical Applications and the Mucosa. *Curr Probl Dermatol*. Basel, Karger, 40, 9–19

Tietz H. J. (2010) Treatment of chronic vulvovaginal candidiasis with posaconazole and ciclopiroxolamine. *Health*. 2 (6) 513-518

Treagan, L. (2011). *Candida* and Its Role In Opportunistic Mycoses California Association for Medical Laboratory Technology. USA

Williams, D. & Lewis, M. (2011). Pathogenesis and treatment of oral candidosis, *Journal of Oral Microbiology*, 3:57711

Referência on-line

<http://www.fas-angola.org/wp-content/themes/fas/images/Huíla.gif> acessado em 25/07/13

6 ANEXOS

Anexo 1



Parecer no12-2012-TM sobre Protocolo de Estudo

Conselho de Ética do Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Título do Estudo: “Etiologia das infeções fúngicas vaginais na região de Lubango, Huila, e sua resistência a fármacos antifúngicos”

Investigador principal: Esmeralda Clarisse Beth Sacato João, no âmbito da sua tese de mestrado orientada pela Investigadora Maria da Luz Martins.

Promotor: Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Objectivo do estudo: O projecto situa-se na área do diagnóstico da candidíase vaginal, detecção de estirpes resistentes aos fármacos antifúngicos convencionais e avaliação da sensibilidade *in vitro* a produtos naturais com potencial actividade antifúngica e a sua realização implica a colheita de aproximadamente uma centena de amostras biológicas humanas.

Desenho do estudo: A análise da documentação enviada, revela um estudo genericamente válido, com um plano correctamente elaborado e adequado do ponto vista ético. O desenho é consistente com os objectivos do estudo.

Conflito de interesses: Não foi identificada a existência de conflito de interesses.

1/2



Rua da Junqueira, 100 • 1349-008 Lisboa • PORTUGAL • Tel 213 652 600 • Fax 213 632 105 • www.ihmt.unl.pt

(Continuação do anexo 1)



Consentimento informado/ informação para o participante: A informação prestada à doente no contexto do pedido de participação e obtenção de consentimento está apresentada de forma clara e sucinta. São salientados o objectivo do estudo e a sua relevância, bem como o carácter voluntário da participação e a salvaguarda do anonimato relativo à identidade dos indivíduos envolvidos e resultados dos testes efectuados. O estudo foi aprovado pelo Directora Geral da Maternidade Irene Neto do Lubango, local de colheita das amostras, e pelo Instituto Nacional de Saúde Pública, Ministério da Saúde de Angola.

Conclusão: Este Conselho considera assim aprovado o presente protocolo de estudo, considerando-o eticamente valido e justificado.

Lisboa, 22 de Janeiro de 2013

Relatores:

Prof. Aida Esteves Simões

Prof. Doutor Gilles Dussault

GILLES DUSSAULT
Presidente do Conselho de Ética

2/2



Anexo 2-Modelo para Consentimento Informado

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

Etiologia das infecções fúngicas vaginais na região de Lubango, Huila, e sua resistência a fármacos antifúngicos

Eu, abaixo-assinada, (nome completo da doente) _____

_____,
declaro não ter participado em nenhum outro projecto de investigação nos últimos meses, tendo compreendido a explicação que me foi fornecida acerca do meu caso clínico e da investigação que se tenciona realizar. Foi-me ainda dada oportunidade de fazer as perguntas que julguei necessárias, e de todas obtive resposta satisfatória.

Tomei conhecimento que a informação ou explicação que me foi prestada versou os objectivos, os métodos, os benefícios previstos, os riscos potenciais e o eventual desconforto. Além disso, foi-me afirmado que tenho o direito de recusar a todo o tempo a minha participação no estudo, sem que isso possa ter como efeito qualquer prejuízo na assistência que me é prestada.

Por isso, consinto que seja realizado o estudo proposto pelo investigador.

Data: ____ / _____ / 201____

Assinatura da doente:

O Investigador responsável:

Nome:

Assinatura:

Anexo 3 - Etiologia das infecções fúngicas vaginais na região de Lubango, Huila, e sua resistência a fármacos antifúngicos

Questionário para as participantes do estudo

Parte 1

Nº	Nome	Diabetes?	Diabetes	Alergias pele	HIV	Doenças anteriores	Doenças actuais	Cirurgias abdominais

Parte 2

Nº	Nome	Idade	Gravidez	Etnia	Nº parceiros	Grupo sanguíneo	Candidíase anterior?	Tratamento	Sintomatologia

Parte 3

Nº	Nome	Fuma	Bebe	Anticonceptivo	Consome drogas?	Toma antibióticos?	Usa roupa sintética?	Telefone

Anexo 4, Tabela 1 - Observação em exame directo das amostras clínicas de exsudados vaginais de pacientes do Hospital Maternidade Irene Neto, Huíla, Angola e isolamento das leveduras em cultura.

Amostra	Nº lab	Exame Directo	Isolamento em cultura
		KOH 20%	Sabouraud + cloranfenicol
1	127	leveduras em gemulação, pseudofilamentos, numerosas bactérias	leveduras (isolamento3x) + <i>Penicillium</i> sp.
2	128	numerosas leveduras soltas, agrupadas, ovais e redondas	Leveduras
3	129	numerosas leveduras redondas, pequenas e grandes	Leveduras
4	130	numerosas leveduras em gemulação e bactérias	Leveduras
5	131	numerosas bactérias	leveduras (repetido 2x)
6	132	raras leveduras e numerosas bactérias	não cresceu
7	133	numerosas leveduras em gemulação e numerosas bactérias	Leveduras
8	134	numerosas leveduras em gemulação soltas, numerosas bactérias	Leveduras
9	135	numerosas leveduras em gemulação soltas e raras bactérias	Leveduras
10	136	numerosas leveduras em gemulação e raras bactérias	Leveduras
11	137	numerosas bactérias	Bactérias
12	138	numerosas leveduras e numerosas bactérias	não cresceu (repetido 2x)
13	139	numerosas leveduras redondas e ovais, raras bactérias	Leveduras
14	140	raras leveduras e numerosas bactérias	não cresceu (repetido 2x)
15	141	numerosas leveduras e raras bactérias	Leveduras
16	142	numerosas leveduras e raras bactérias	Leveduras
17	143	numerosas leveduras e numerosas bactérias	não cresceu (repetido 2x)
18	144	raras leveduras em gemulação soltas, numerosas bactérias	<i>Penicillium</i> sp.
19	145	numerosas leveduras e raras bactérias	Leveduras
20	146	numerosas leveduras soltas, agrupadas	Leveduras
21	147	numerosas leveduras soltas, numerosos pseudofilamentos	Leveduras
22	148	numerosas leveduras soltas, pseudofilamentos, numerosas bactérias	Leveduras
23	149	raras leveduras soltas, redondas,numerosas bactérias	Bactérias

(Continuação do Anexo 4 Tabela 1)

Amostra	Nº lab	Exame Directo	Isolamento em cultura
		KOH 20%	Sabouraud + cloranfenicol
24	150	numerosas leveduras em gemulação soltas, numerosas bactérias	Leveduras
25	151	raras leveduras, numerosas bactérias	não cresceu (repetido 2x)
26	152	numerosas leveduras soltas, pseudofilamentos, raras bactérias	Leveduras
27	153	numerosas leveduras em gemulação soltas, numerosas bactérias	Leveduras
28	154	numerosas leveduras soltas, pseudofilamentos, numerosas bactérias	Leveduras
29	155	numerosas leveduras em gemulação soltas, numerosos pseudofilamentos	Leveduras
30	156	numerosas leveduras soltas e poucos pseudofilamentos	Leveduras
31	157	raras leveduras em gemulação, numerosas bactérias	não cresceu (repetido 2x)
32	158	numerosas bactérias	não cresceu (repetido 2x)
33pm	159	numerosas leveduras em gemulação soltas, numerosas bactérias	Leveduras
33g	150	numerosas leveduras ovais e redondas, pseudofilamentos, raras bactérias	Leveduras
34	161	numerosas leveduras em gemulação soltas, numerosas bactérias	Leveduras
35	162	raras leveduras em gemulação, numerosas bactérias	<i>Penicillium</i> sp.
36	163	raras leveduras em gemulação, numerosas bactérias	não cresceu (repetido 2x)
37	164	numerosas leveduras em gemulação soltas e agrupadas, raras bactérias	leveduras
38	165	numerosas leveduras em gemulação soltas e agrupadas, raras bactérias	leveduras
39	166	numerosas leveduras, pseudofilamentos, raras bactérias	leveduras
40	167	numerosas leveduras em gemulação soltas, raras bactérias	leveduras
41	168	numerosas leveduras em gemulação soltas, numerosas bactérias	leveduras

(Continuação do Anexo 4 Tabela 1)

Amostra	Nº lab	Exame Directo	Isolamento em cultura
		KOH 20%	Sabouraud + cloranfenicol
42	169	numerosas leveduras em gemulação soltas, numerosas bactérias	leveduras
43	170	numerosas leveduras, pseudofilamentos, numerosas bactérias.	leveduras
44	171	raras leveduras soltas, numerosas bactérias	não cresceu (repetido 2x)
45	172	numerosas bactérias	não cresceu (repetido 2x)
46	173	numerosas leveduras em gemulação soltas, numerosas bactérias	leveduras
47	174	numerosas leveduras em gemulação soltas, numerosas bactérias	leveduras
48	175	numerosas leveduras em gemulação soltas e agrupadas, raras bactérias	leveduras
49	176	numerosas bactérias	não cresceu (repetido 2x)
50	177	numerosas leveduras soltas, ovais, numerosas bactérias	leveduras
51p	178	numerosas leveduras soltas e agrupadas, raras bactérias	leveduras
51mg	179	numerosas leveduras soltas, pseudofilamentos, numerosas bactérias	leveduras
52	180	numerosas leveduras soltas e, numerosos pseudofilamentos	leveduras
53	181	numerosas leveduras soltas e agrupadas, numerosos pseudofilamentos	leveduras
54	182	raras leveduras em gemulação soltas, numerosas bactérias	bactérias
55	183	numerosas levedura em gemulação, soltas, redondas	leveduras
56	184	numerosas levedura em gemulação, soltas, redondas	leveduras
57	185	raras leveduras em gemulação soltas, numerosas bactérias	bactérias
58	186	raras leveduras em gemulação soltas, numerosas bactérias	não cresceu (repetido 2x)
59	187	numerosas bactérias	bactérias
60	188	numerosas bactérias	não cresceu (repetido 2x)
61	189	numerosas bactérias	não cresceu (repetido 2x)

(Continuação do Anexo 4 Tabela 1)

Amostra	Nº lab	Exame Directo	Isolamento em cultura
		KOH 20%	Sabouraud + cloranfenicol
62	190	numerosas leveduras em gemulação soltas, numerosas bactérias	leveduras
63	191	leveduras em gemulação, numerosas bactérias	<i>Penicillium sp.</i>
64	192	numerosas leveduras soltas, pseudofilamentos, numerosos pseudofilamentos	leveduras
65	193	leveduras, soltas e redondas, pseudohifas, numerosas bactérias	leveduras
66	194	numerosas bactérias	não cresceu (repetido 2x)
67	195	leveduras gemulação em, soltas e redondas, numerosas bactérias	leveduras
68	196	leveduras, soltas e redondas, pseudofilamentos, numerosas bactérias	leveduras
69	197	leveduras, soltas e redondas, numerosas bactérias	não cresceu (repetido 2x)
70	198	raras leveduras, numerosas bactérias	<i>Rhodotorula sp.</i>
71	199	raras leveduras em gemulação, numerosas bactérias	leveduras
72	200	raras leveduras e numerosas bactérias	não cresceu (repetido 2x)
73	201	numerosas bactérias	não cresceu (repetido 2x)
74	202	leveduras em gemulação, numerosas bactérias	não cresceu (repetido 2x)
75	203	numerosas leveduras, pseudohifas, numerosas bactérias	leveduras
76	204	numerosas leveduras ovais, numerosas bactérias	não cresceu (repetido 2x)
77	205	numerosas bactérias	leveduras
78	206	leveduras, soltas e redondas, numerosas bactérias	não cresceu (repetido 2x)
79	207	raras leveduras em gemulação, soltas, pseudofilamentos, numerosas bactérias	leveduras
80	208	raras leveduras, soltas e redondas, numerosas bactérias	não cresceu (repetido 2x)
81	209	numerosas bactérias	não cresceu (repetido 2x)
82	210	numerosas bactérias	não cresceu (repetido 2x)
83	211	leveduras, soltas e redondas, pseudofilamentos, numerosas bactérias	leveduras
84	212	numerosas leveduras, soltas, pseudofilamentos, numerosas bactérias	leveduras
85	213	raras leveduras, soltas e redondas, pseudofilamentos, numerosas bactérias	leveduras

(Continuação do Anexo 4 Tabela 1)

Amostra	Nº lab	Exame Directo	Isolamento em cultura
		KOH 20%	Sabouraud + cloranfenicol
86	214	numerosas leveduras em gemulação soltas e agrupadas em três	leveduras
87	215	numerosas leveduras em gemulação, soltas, redondas, pseudofilamentos	leveduras
88	216	numerosas leveduras em gemulação, soltas e redondas, pseudofilamentos	leveduras
89	217	leveduras em gemulação, pseudofilamentos, numerosas bactérias	<i>Penicillium sp.</i>
90	218	numerosas leveduras em gemulação soltas, numerosas bactérias	leveduras
91	219	raras leveduras soltas, numerosas bactérias	não cresceu (repetido 2x)
92	220	numerosas bactérias	bactérias
93	221	numerosas leveduras soltas, redondas pseudofilamentos, raras bactérias	leveduras
94	222	numerosas leveduras soltas, agrupadas, pseudofilamentos, raras bactérias	leveduras
95	223	raras leveduras soltas e redondas, numerosas bactérias	não cresceu (repetido 2x)
96	224	numerosas bactérias	não cresceu (repetido 2x)
97	225	numerosas leveduras soltas, redondas pseudofilamentos, raras bactérias	leveduras
98	226	numerosas leveduras soltas e redondas, numerosas bactérias	leveduras
99	227	numerosas leveduras soltas, redondas e numerosas bactérias	leveduras
100	228	numerosas bactérias	não cresceu (repetido 2x)
101	229	numerosas bactérias	não cresceu (repetido 2x)
102	230	numerosas leveduras soltas, redondas, raras bactérias	leveduras
103	231	raras leveduras, redondas, numerosas bactérias	não cresceu (repetido 2x)
104	232	numerosas leveduras soltas, redondas pseudofilamentos, raras bactérias	leveduras
105	233	numerosas bactérias	não cresceu (repetido 2x)
106	234	numerosas leveduras soltas, redondas pseudohifas, raras bactérias	leveduras
107	235	leveduras soltas, redondas, ovais, numerosas bactérias	leveduras
108	236	numerosas leveduras com 3 a 4 gémulas agrupadas, raras bactérias	leveduras

(Continuação do Anexo 4 Tabela 1)

Amostra	Nº lab	Exame Directo	Isolamento em cultura
		KOH 20%	Sabouraud + cloranfenicol
109	237	numerosas leveduras em gemulação agrupadas, raras bactérias	leveduras
110	238	numerosas leveduras e pseudofilamentos, raras bactérias	leveduras
111	239	raras leveduras soltas, numerosas bactérias	não cresceu (repetido 2x)
112	240	leveduras redondas e soltas, numerosas bactérias	leveduras
113	241	levedura com 3 a 4 gémulas, agrupadas, raras bactérias	leveduras
114	242	leveduras redondas e soltas, pseudohifas, numerosas bactérias	leveduras
115	243	leveduras em gemulação, pseudofilamentos, numerosas bactérias	leveduras (isolamento 3x) + <i>Penicillium sp.</i>
116	244	numerosas leveduras redondas e soltas, numerosas bactérias	leveduras
117	245	numerosas leveduras soltas, redondas, numerosas bactérias	leveduras
118	246	raras leveduras soltas, numerosas bactérias	não cresceu (repetido 2x)
119	247	raras leveduras em gemulação, numerosas bactérias	<i>Penicillium sp.</i>
120	281	numerosas leveduras soltas e redondas numerosas bactérias	leveduras
121	282	numerosas leveduras soltas e redondas numerosas bactérias	leveduras
122	283	numerosas leveduras pequenas, numerosas bactérias	levedura (isolamento 3x) + <i>Rhodotorula sp.</i>
123	284	numerosas leveduras com micélio, numerosas bactérias	leveduras
124	285	raras leveduras em gemulação, numerosas bactérias	não cresceu (repetido 2x)
125	286	numerosas bactérias	não cresceu (repetido 2x)
126	287	numerosas bactérias	bactérias
127	288	numerosas bactérias	leveduras
128	289	numerosas leveduras ovais, numerosas bactérias	leveduras
129	290	leveduras soltas, agrupadas, cada célula tem duas gémulas	leveduras
130	291	leveduras, pseudofilamentos e micélio, numerosas bactérias	leveduras(isolamento 1x)+numerosas bactérias
131	292	leveduras soltas, agrupadas, numerosas bactérias	leveduras
132	293	leveduras redondas, numerosos pseudofilamentos, numerosas bactérias	leveduras(isolamento 1x)+numerosas bactérias

(Continuação do Anexo 4 Tabela 1)

Amostra	Nº lab	Exame Directo	Isolamento em cultura
		KOH 20%	Sabouraud + cloranfenicol
133	294	raras leveduras em gemulação, numerosas bactérias	<i>Penicillium</i> sp.
134	295	numerosas bactérias	leveduras
135	296	raras leveduras soltas numerosas bactérias	leveduras
136	297	leveduras, com gemulação central e lateral, numerosas bactérias	leveduras
137	298	leveduras gemulação em agrupadas , numerosas bactérias	não cresceu (repetido 2x)
138	299	numerosas bactérias	não cresceu (repetido 2x)
139	300	numerosas leveduras em gemulação soltas, numerosas bactérias	leveduras
140	301	raras leveduras soltas, numerosas bactérias	não cresceu (repetido 2x)
141	302	leveduras em gemulação, pseudofilamentos, numerosas bactérias	leveduras
142	303	raras leveduras em gemulação e numerosos bactérias	<i>Rhodotorula</i> sp.
143	304	numerosas leveduras em gemulação soltas, numerosas bactérias	leveduras
144	305	leveduras em gemulação, pseudofilamentos, numerosas bactérias	leveduras (isolamento3x) + <i>Penicillium</i> sp.
145	306	numerosas bactérias	leveduras
146	307	numerosas bactérias	leveduras
147	308	numerosas bactérias	não cresceu
148	309	numerosas leveduras em gemulação soltas, numerosas bactérias	leveduras
149	310	raras leveduras soltas, numerosas bactérias	não cresceu
150	311	numerosas bactérias	não cresceu
151	312	numerosas bactérias	bactérias
152	313	numerosas bactérias	não cresceu
153	314	numerosas leveduras em gemulação soltas, numerosas bactérias	leveduras
154	315	raras leveduras em gemulação, soltas, agrupadas e numerosas bactérias	não cresceu
155	316	numerosas bactérias	não cresceu
156	317	numerosas leveduras em gemulação, pseudofilamentos, numerosas bactérias	leveduras

(Continuação do Anexo 4 Tabela 1)

Amostra	Nº lab	Exame Directo	Isolamento em cultura
		KOH 20%	Sabouraud + cloranfenicol
157	318	rara leveduras em gemulação, pseudofilamentos, numerosas bactérias	<i>Penicillium sp.</i>
158	319	numerosas leveduras em gemulação, pseudofilamentos, numerosas bactérias	leveduras
159	320	numerosas bactérias	não cresceu

Anexo 5, Tabela 2 - Morfologia macroscópica e microscópica dos isolados clínicos provenientes dos exsudados vaginais de pacientes observadas no Hospital Maternidade Irene Neto, Huíla, Angola.

Morfologia das colónias			
Amostra	Nº lab	Exame macroscópico	Exame microscópico
1	127	cremosa branca; pulverulenta verde	leveduras em gemulação
2	128	cremosa, plana, opaca, branca	leveduras em gemulação
3	129	cremosa, plana, lisa, branca	leveduras em gemulação
4	130	cremosa, plana, lisa, branca	leveduras em gemulação
5	131	brilhante, mucosa	numerosas bactérias
6	132	brilhante, mucosa	numerosas bactérias
7	133	cremosa, plana, lisa, branca	leveduras em gemulação
8	134	cremosa, plana, lisa, branca	leveduras em gemulação
9	135	cremosa, plana, lisa, branca	leveduras em gemulação
10	136	cremosa, plana, lisa, branca	leveduras em gemulação
11	137	brilhante, mucosa	numerosas bactérias
12	138	brilhante, mucosa	numerosas bactérias
13	139	cremosa, plana, lisa, branca	leveduras em gemulação
14	140	brilhante, mucosa	numerosas bactérias
15	141	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
16	142	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
17	143	seca, fissurada, irregular, pulverulenta, verde	<i>Penicillium sp.</i>
18	144	brilhante, mucosa	numerosas bactérias
19	145	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
20	146	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	Levedura em gemulação e pseudofilamentos
21	147	cremosa, brilhante, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação e bactérias
22	148	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
23	149	brilhante, mucoide	numerosas bactérias
24	150	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
25	151	brilhante, mucosa	numerosas bactérias
26	152	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação e pseudofilamentos

(Continuação do Anexo 5 Tabela2)

Morfologia das colónias			
Amostra	Nº lab	Exame macroscópico	Exame microscópico
27	153	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação e pseudofilamentos
28	154	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação ovais e pseudofilamentos
29	155	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação e pseudofilamentos
30	156	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação e pseudofilamentos
31	157	brilhante, mucoide	numerosas bactérias
32	158	brilhante, mucoide	numerosas bactérias
33pm	159	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
33g	160	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
34	161	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
35	162	brilhante, mucoide	numerosas bactérias
36	163	brilhante, mucoide	numerosas bactérias
37	164	cremosa, mucoide, húmida, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
38	165	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
39	166	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
40	167	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
41	168	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
42	169	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
43	170	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
44	171	brilhante, mucoide	numerosas bactérias
45	172	brilhante, mucoide	numerosas bactérias
46	173	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
47	174	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
48	175	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
49	176	brilhante, mucoide	numerosas bactérias
50	177	rugosa, fisurada, irregular creme	leveduras em gemulação ovais e redondas
51p	178	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação

(Continuação do Anexo 5 Tabela 2)

Morfologia das colónias			
Amostra	Nº lab	Exame macroscópico	Exame microscópico
51mg	179	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
52	180	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
53	181	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
54	182	brilhante, mucoide	numerosas bactérias
55	183	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação e pseudofilamentos
56	184	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação e pseudofilamentos
57	185	brilhante, mucoide	numerosas bactérias
58	186	brilhante, mucoide	numerosas bactérias
59	187	brilhante, mucoide	numerosas bactérias
60	188	brilhante, mucoide	numerosas bactérias
61	189	mucoide, irregular, rosa-laranja, branca	<i>Rhodotorula</i> + bactérias
62	190	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
63	191	brilhante, mucoide	numerosas bactérias
64	192	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
65	193	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
66	194	brilhante, mucoide	numerosas bactérias
67	195	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação ovais e raras bactérias
68	196	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
69	197	mucoide, irregular, rosa-laranja, branca	<i>Rhodotorula</i> + bactérias
70	198	brilhante, mucoide	numerosas bactérias
71	199	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
72	200	brilhante, mucoide	numerosas bactérias
73	201	brilhante, mucoide	numerosas bactérias
74	202	brilhante, mucoide	numerosas bactérias
75	203	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
76	204	brilhante, mucoide	numerosas bactérias
77	205	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
78	206	brilhante, mucoide	numerosas bactérias
79	207	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação

(Continuação do Anexo 5 Tabela2)

Morfologia das colónias			
Amostra	Nº lab	Exame macroscópico	Exame microscópico
80	208	brilhante, mucoide	numerosas bactérias
81	209	brilhante, mucoide	numerosas bactérias
82	210	brilhante, mucoide	numerosas bactérias
83	211	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
84	212	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
85	213	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
86	214	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
87	215	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
88	216	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
89	217	brilhante, mucoide	numerosas bactérias
90	218	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
91	219	brilhante, mucoide	numerosas bactérias
92	220	brilhante, mucoide	numerosas bactérias
93	221	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
94	222	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
95	223	brilhante, mucoide	numerosas bactérias
96	224	brilhante, mucoide	numerosas bactérias
97	225	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
98	226	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
99	227	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
100	228	brilhante, mucoide	numerosas bactérias
101	229	brilhante, mucoide	numerosas bactérias
102	230	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
103	231	brilhante, mucoide	numerosas bactérias
104	232	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
105	233	brilhante, mucoide	numerosas bactérias
106	234	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
107	235	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação

(Continuação do Anexo 5 Tabela2)

Morfologia das colónias			
Amostra	Nº lab	Exame macroscópico	Exame microscópico
108	236	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
109	237	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
110	238	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
111	239	brilhante, mucoide	numerosas bactérias
112	240	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
113	238	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
114	239	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
115	240	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
116	241	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
117	242	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
118	243	brilhante, mucoide	numerosas bactérias
119	244	brilhante, mucoide	numerosas bactérias
120	281	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
121	282	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
122	283	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
123	284	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
124	285	bactérias brilhante	numerosas bactérias
125	286	bactérias brilhante	numerosas bactérias
126	287	bactérias brilhante	numerosas bactérias
127	288	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação +ovais e redondas
128	289	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
129	290	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
130	291	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
131	292	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
132	293	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
133	294	brilhante, mucoide	numerosas bactérias
134	295	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação

(Continuação do Anexo 5 Tabela 2)

Morfologia das colónias			
135	296	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
136	297	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
137	298	brilhante, mucoide	numerosas bactérias
138	299	brilhante, mucoide	numerosas bactérias
139	300	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
140	301	brilhante, mucoide	numerosas bactérias
141	302	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
142	303	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
143	304	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
144	305	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
145	306	brilhante, mucoide	numerosas bactérias
146	307	brilhante, mucoide	numerosas bactérias
147	308	brilhante, mucoide	numerosas bactérias
148	309	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
149	310	brilhante, mucoide	numerosas bactérias
150	311	brilhante, mucoide	numerosas bactérias
151	312	brilhante, mucoide	numerosas bactérias
152	313	brilhante, mucoide	numerosas bactérias
153	314	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
154	315	brilhante, mucoide	numerosas bactérias
155	316	brilhante, mucoide	numerosas bactérias
156	317	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
157	318	brilhante, mucoide	numerosas bactérias
158	319	cremosa, plana, opaca, lisa, branca	leveduras em gemulação
159	320	brilhante, mucoide	numerosas bactérias

Anexo 6, Tabela 3 - Identificação laboratorial dos isolados clínicos por métodos convencionais (Teste da Blastese e API ID 32C®) e métodos moleculares (PCR multiplex e RFLP da região ITS do rDNA).

Amostra	Nº lab	Teste da Blastese	PCR multiplex	PCR-RFLP	API ID 32C®	gene <i>HWPI</i>
1	127	<i>C.albicans</i>				
2	128	<i>C.albicans</i>				
3	129	<i>C.albicans</i>				
4	130	<i>C.albicans</i>				
5	131	<i>C.albicans</i>				
7	133	<i>C.albicans</i>				
8	134	negativo	inespecíficos	inespecíficos	<i>S. cerevisiae</i>	
9	135	<i>C.albicans</i>				
10	136	<i>C.albicans</i>				
13	139	negativo	inespecíficos	<i>C. guilliermondii</i>	<i>C. catenulata</i>	
15	141	<i>C.albicans</i>				
16	142	<i>C.albicans</i>				
19	145	<i>C.albicans</i>				
20	146	<i>C.albicans</i>				
21	147	<i>C.albicans</i>				
22	148	<i>C.albicans</i>				
24	150	<i>C.albicans</i>				
26	152	<i>C.albicans</i>				<i>C. africana</i>
27	153	<i>C.albicans</i>				
28	154	<i>C.albicans</i>				
29	155	<i>C.albicans</i>				
30	156	<i>C.albicans</i>				
33pm	159	negativo	<i>C.parapsilosis</i>			

(Continuação do Anexo 6 Tabela 3)

Amostra	Nº lab	Teste da Blastese	PCR multiplex	PCR-RFLP	API ID 32C®	gene HWPI
33g	160	negativo	inespecíficos	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>	
34	161	<i>C. albicans</i>				
37	164	<i>C. albicans</i>				
38	165	<i>C. albicans</i>				
39	166	<i>C. albicans</i>				
40	167	<i>C. albicans</i>				
41	168	negativo	<i>C. albicans</i>			
42	169	<i>C. albicans</i>				<i>C. africana</i>
43	170	<i>C. albicans</i>				
46	173	<i>C. albicans</i>				
47	174	<i>C. albicans</i>				
48	175	negativo	inespecíficos	inespecíficos	<i>C. lipolytica</i>	
50	177	negativo	inespecíficos	inespecíficos	<i>Trichosporon asahii</i>	
51p	178	negativo	<i>C. parapsilosis</i>			
51mg	179	negativo	<i>C. albicans</i>			
52	180	<i>C. albicans</i>				
53	181	negativo	<i>C. albicans</i>			
55	183	<i>C. albicans</i>				
56	184	negativo	<i>C. albicans</i>			
62	190	negativo	inespecíficos	inespecíficos	<i>S. cerevisiae</i>	
64	192	<i>C. albicans</i>				
65	193	negativo	<i>C. glabrata</i>			
67	195	<i>C. albicans</i>				
68	196	negativo	<i>C. parapsilosis</i>			
71	199	<i>C. albicans</i>				
75	203	negativo	<i>C. albicans</i>			
77	205	<i>C. albicans</i>				

(Continuação do Anexo 6 Tabela 3)

Amostra	Nº lab	Teste da Blastese	PCR multiplex	PCR-RFLP	API ID 32C®	gene <i>HWPI</i>
79	207	<i>C. albicans</i>				<i>C. africana</i>
83	211	<i>C. albicans</i>				
84	212	negativo	<i>C. albicans</i>			
85	213	negativo	<i>C. albicans</i>			
86	214	<i>C. albicans</i>				
87	215	negativo	<i>C. albicans</i>			
88	216	<i>C. albicans</i>				
90	218	<i>C. albicans</i>				
93	221	<i>C. albicans</i>				
94	222	<i>C. albicans</i>				
97	225	negativo	<i>C. parapsilosis</i>			
98	226	<i>C. albicans</i>				
99	227	negativo	<i>C. albicans</i>			
102	230	negativo	<i>C. albicans</i>			
104	232	negativo	<i>C. parapsilosis</i>			
106	234	negativo	<i>C. albicans</i>			
107	235	<i>C. albicans</i>				
108	236	<i>C. albicans</i>				
109	237	<i>C. albicans</i>				
110	238	<i>C. albicans</i>				
112	240	<i>C. albicans</i>				
113	241	<i>C. albicans</i>				
114	239	negativo	<i>C. tropicalis</i>			
115	240	<i>C. albicans</i>				
116	241	<i>C. albicans</i>				
117	242	negativo	<i>C. glabrata</i>			
120	281	<i>C. albicans</i>				
121	282	<i>C. albicans</i>				

(Continuação do Anexo 6 Tabela 3)

Amostra	Nº lab	Teste da Blastese	PCR multiplex	PCR-RFLP	API ID 32C®	gene <i>HWPI</i>
122	283	<i>C. albicans</i>				<i>C. africana</i>
123	284	<i>C. albicans</i>				<i>C. africana</i>
127	288	negativo	inespecíficos	inespecíficos	<i>C. pelliculosa</i>	
128	289	<i>C. albicans</i>				
129	290	<i>C. albicans</i>				
130	291	<i>C. albicans</i>				
131	292	<i>C. albicans</i>				<i>C. africana</i>
132	293	negativo	inespecíficos	<i>C. glabrata</i>		
134	295	<i>C. albicans</i>				
135	296	<i>C. albicans</i>				
136	297	<i>C. albicans</i>				
139	300	negativo	<i>C. albicans</i>			
141	302	<i>C. albicans</i>				<i>C. africana</i>
143	304	<i>C. albicans</i>				
145	306	<i>C. albicans</i>				
146	307	<i>C. albicans</i>				
148	309	<i>C. albicans</i>				
153	314	<i>C. albicans</i>				
156	317	<i>C. albicans</i>				
158	320	<i>C. albicans</i>				

Anexo 7, Tabela 4 - Resultados obtidos com o teste de susceptibilidade aos antifúngicos pelo método de Kirby-Bauer (CLSI, norma M44-A) com todos os isolados clínicos incluídos neste trabalho.

Amostra	Nº lab	Fluconazol			Voriconazol			Caspofungina		Posaconazol	
		Ø halo	CMI µg/mL	Susceptibilidade	Ø halo	CMI µg/mL	Susceptibilidade	Ø halo	Susceptibilidade	Ø halo	Susceptibilidade
1	127	29	1,8	Sensível	30	0,06	Sensível	21	Sensível	26	Sensível
2	128	20	0,32	Sensível	21	<0,01	Sensível	25	Sensível	35	Sensível
3	129	37	0,25	Sensível	42	<0,01	Sensível	32	Sensível	42	Sensível
4	130	27	3	Sensível	28	0,03	Sensível	33	Sensível	21	Sensível
5	131	31	1,1	Sensível	36	0,02	Sensível	23	Sensível	33	Sensível
7	133	31	1,1	Sensível	31	0,05	Sensível	18	Sensível	23	Sensível
8	134			não cresceu			não cresceu	22	Sensível	37	Sensível
9	135	28	2,4	Sensível	33	0,03	Sensível	47	Sensível	28	Sensível
10	136	42	<0,25	Sensível	43	<0,01	Sensível	15	SDD	12	Resistente
13	139	25	14	Sensível	42	0,08	Sensível	40	Sensível	6	Resistente
15	141	6	>165	Resistente	6	<0,01	Resistente	11	Resistente	12	Resistente
16	142	47	<0,25	Sensível	6	<0,01	Resistente	15	SDD	20	Sensível
19	145	27	3	Sensível	28	0,1	Sensível	22	Sensível	37	Sensível
20	146	27	3	Sensível	31	0,05	Sensível	25	Sensível	40	Sensível
21	147	32	5	Sensível	37	0,06	Sensível	21	Sensível	46	Sensível
22	148	31	3,9	Sensível	34	0,15	Sensível	20	Sensível	43	Sensível
24	150	31	3,9	Sensível	33	0,15	Sensível	24	Sensível	40	Sensível
26	152	48	<0,25	Sensível	50	>6,1	Sensível	16	Resistente	47	Sensível
27	153	31	>165	Sensível	36	0,15	Sensível	25	Sensível	30	Sensível
28	154	36	0,32	Sensível	38	<0,01	Sensível	21	Sensível	31	Sensível
29	155	38	<0,25	Sensível	42	<0,01	Sensível	25	Sensível	32	Sensível
30	156	33	0,68	Sensível	34	0,03	Sensível	24	Sensível	31	Sensível
33 pm	159	27	3	Sensível	31	0,05	Sensível			33	Sensível
33g	160	29	18	Sensível	35	0,02	Sensível	20	Sensível	34	Sensível
34	161	6	>165	Resistente	6	>6,1	Resistente	6	Resistente	6	Resistente

(Continuação do Anexo 7 Tabela 4)

Amostra	Nº lab	Fluconazol			Voriconazol			Caspofungina		Posaconazol	
		Ø halo	CMI µg/mL	Susceptibilidade	Ø halo	CMI µg/mL	Susceptibilidade	Ø halo	Susceptibilidade	Ø halo	Susceptibilidade
37	164	37	<0,25	Sensível	41	<0,01	Sensível	24	Sensível	33	Sensível
38	165	30	1,4	Sensível	31	0,05	Sensível	29	Sensível	35	Sensível
39	166	30	1,4	Sensível	28	0,1	Sensível	20	Sensível	34	Sensível
40	167	29	1,8	Sensível	31	0,05	Sensível	24	Sensível	31	Sensível
41	168	13	100	Resistente	10	>6,1	Resistente	6	Resistente	25	Sensível
42	169	34	0,53	Sensível	6	>6,1	Resistente	15	SDD	18	Sensível
43	170	31	1,4	Sensível	40	0,05	Sensível	25	Sensível	25	Sensível
46	173	28	2,4	Sensível	33	0,03	Sensível	8	Resistente	23	Sensível
47	174	15	2,4	Resistente	14	0,03	Resistente	22	Sensível	24	Sensível
48	175	12	129	Resistente	13	22	Resistente	17	Sensível	19	Sensível
50	177	16	47	SDD	22	0,33	Sensível	21	Sensível	7	Resistente
51p	178	21	14	Sensível	37	<0,01	Sensível	10	Resistente	35	Sensível
51mg	179	27	3	Sensível	31	0,05	Sensível	24	Sensível	24	Sensível
52	180	37	<0,25	Sensível	45	<0,01	Sensível	28	Sensível	37	Sensível
53	181	39	<0,25	Sensível	38	<0,01	Sensível	25	Sensível	33	Sensível
55	183	38	<0,05	Sensível	42	<0,01	Sensível	24	Sensível	37	Sensível
56	184	35	0,41	Sensível	45	<0,01	Sensível	6	Resistente	35	Sensível
62	190			não cresceu			não cresceu	33	Sensível	37	Sensível
64	192	38	<0,25	Sensível	39	<0,01	Sensível	28	Sensível	32	Sensível
65	193	20	17	Sensível	31	0,11	Sensível	30	Sensível	33	Sensível
67	195	34	0,53	Sensível	38	<0,01	Sensível	24	Sensível	27	Sensível
68	196	6	>165	Resistente	11	3,3	Resistente	20	Sensível	27	Sensível
71	199	16	47	SDD	8	>6,1	Resistente	25	Sensível	34	Sensível
75	203	6	>165	Resistente	15	1,4	Resistente	31	Sensível	31	Sensível
77	205	6	<0,25	Resistente	6	<0,01	Resistente	31	Sensível	32	Sensível
79	207	15	22	Resistente	6	>6,1	Resistente	6	Resistente	6	Resistente

(Continuação do Anexo 7 Tabela 4)

Amostra	Nº lab	Fluconazol			Voriconazol			Caspofungina		Posaconazol	
		Ø halo	CMI µg/mL	Susceptibilidade	Ø halo	CMI µg/mL	Susceptibilidade	Ø halo	Susceptibilidade	Ø halo	Susceptibilidade
83	211	31	1,1	Sensível	37	<0,01	Sensível	22	Sensível	31	Sensível
84	212	30	1,4	Sensível	35	0,02	Sensível	23	Sensível	36	Sensível
85	213	22	0,68	Sensível	42	0,27	Sensível	27	Sensível	42	Sensível
86	214	34	11	Sensível	39	<0,01	Sensível	28	Sensível	30	Sensível
87	215	30	0,53	Sensível	31	<0,01	Sensível	23	Sensível	35	Sensível
88	216	30	1,4	Sensível	27	0,12	Sensível	25	Sensível	30	Sensível
90	218	19	22	Sensível	16	1,2	I	24	Sensível	35	Sensível
93	221	27	3	Sensível	30	0,06	Sensível	23	Sensível	34	Sensível
94	222	34	0,54	Sensível	34	0,03	Sensível	28	Sensível	34	Sensível
97	225	31	1,1	Sensível	34	0,03	Sensível	21	Sensível	31	Sensível
98	226	8	>165	Resistente	11	3,3	Resistente	23	Sensível	29	Sensível
99	227	6	0,53	Resistente	13	2,2	Resistente	31	Sensível	32	Sensível
102	230	16	>165	Resistente	10	4	Resistente	10	Resistente	19	Sensível
104	232	17	37	SDD	10	4	Resistente	22	Sensível	31	Sensível
106	234	11	>165	Resistente	34	0,02	Sensível	25	Sensível		Sensível
107	235	9	>165	Resistente	6	>6,1	Resistente	27	Sensível	35	Sensível
108	236	15	<0,25	SDD	7	>6,1	Resistente	24	Sensível	26	Sensível
109	237	40	0,53	Sensível	47	4	Sensível	30	Sensível	39	Sensível
110	238	34	0,53	Sensível	10	4,9	Resistente	22	Sensível	30	Sensível
112	240	34	0,53	Sensível	9	4,9	Resistente	24	Sensível	31	Sensível
113	241	7	>165	Resistente	7	>6,1	Resistente	4	Resistente	25	Sensível
114	239	6	>165	Resistente	12	2,6	Resistente	19	Sensível	21	Sensível
115	240	13	100	Resistente	16	1,2	I	28	Sensível	16	SDD
116	241	6	>165	Resistente	8	>6,1	Resistente	27	Sensível	15	SDD

(Continuação do Anexo 7 Tabela 4)

Amostra	Nº lab	Ø halo	Fluconazol		Voriconazol		Caspofungina		Posaconazol		
			CMI µg/mL	Susceptibilidade	Ø halo	CMI µg/mL	Susceptibilidade	Ø halo	Susceptibilidade	Ø halo	Susceptibilidade
117	242	7	>165	Resistente	6	>6,1	Resistente	21	Sensível	8	Resistente
120	281	6	>165	Resistente	7	>6,1	Resistente	12	Resistente	13	Resistente
121	282	31	1,1	Sensível	8	>6,1	Resistente	25	Sensível	21	Sensível
122	283	6	>165	Resistente	6	>6,1	Resistente	21	Sensível	10	Resistente
123	284	6	>165	Resistente	6	>6,1	Resistente	10	Resistente	6	Resistente
127	288	21	14	Sensível	14	0,62	Sensível	25	Sensível	19	Sensível
128	289	34	0,53	Sensível	13	0,05	Resistente	27	Sensível	13	Resistente
129	290	35	0,41	Sensível	32	<0,01	Sensível	27	Sensível	32	Sensível
130	291	29	1,8	Sensível	26	0,05	Sensível	24	Sensível	26	Sensível
131	292	38	<0,25	Sensível	39	<0,01	Sensível	35	Sensível		Sensível
132	293	29	100	Sensível	24	1,2	Sensível	24	Sensível	29	Sensível
134	295	13	100	Resistente	16	1,2	Resistente	31	Sensível	45	Sensível
135	296	37	<0,25	Sensível	40	<0,01	Sensível	24	Sensível	27	Sensível
136	297	37	<0,25	Sensível	34	0,02	Sensível	26	Sensível	34	Sensível
139	300	6	>165	Resistente	35	3,3	Sensível	26	Sensível	37	Sensível
141	302	27	>165	Sensível	37	3,3	Sensível	17	Sensível	6	Resistente
144	305	39	3	Sensível	32	<0,01	Sensível	11	Resistente	32	Sensível
145	306	27	3	Sensível	12	2,6	Sensível	27	Sensível	42	Sensível
146	307	37	<0,2	Sensível	38	<0,01	Sensível	33	Sensível	38	Sensível
148	309	19	22	Sensível	38	1,4	Sensível	26	Sensível	38	Sensível
153	314	14	78	Resistente	15	1,4	Intermédio	22	Sensível	38	Sensível
156	317	8	>165	Resistente	6	>6,1	Resistente	11	Resistente	6	Resistente
158	319	8	>165	Resistente	7	>6,1	Resistente	26	Sensível	6	Resistente