



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
REDE DE BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA DA
AMAZÔNIA LEGAL - BIONORTE**



**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, TAXONOMIA POLIFÁSICA,
SUSCEPTIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS E EXTRATOS DAS SEMENTES DE
Vatairea guianensis EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *Candida* spp. NA CIDADE DE
MANAUS**

Andreia Ferreira de Souza

**MANAUS - AM
OUTUBRO/2016**

ANDREIA FERREIRA DE SOUZA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, TAXONOMIA POLIFÁSICA,
SUSCEPTIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS E EXTRATOS DAS SEMENTES DE
Vatairea guianensis EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *Candida* spp. NA CIDADE DE
MANAUS**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Antonia Queiroz de Lima Souza – FCA/UFAM

Área de concentração: Biotecnologia

Linha de Pesquisa: Bioprospecção e Desenvolvimento de Bioprocessos e Bioprodutos

**MANAUS - AM
OUTUBRO/2016**

FICHA CATALOGRÁFICA
(a ser revisada pela biblioteca da Universidade)

Souza, Andrea Ferreira de.

Caracterização molecular, taxonomia polifásica, susceptibilidade a antifúngicos e extratos das sementes de *vatairea guianensis* em isolados clínicos de *candida* spp. na cidade de Manaus / Andrea Ferreira de Souza. – Manaus, 2016.

Tese Doutorado – Rede de Biodiversidade e Bioecnologia da Amazônia Legal, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, 2016.

Orientador(a): Profa. Dra. Antonia Queiroz de Lima Souza

1. Assunto. 2. Assunto. 3. Assunto. 4. Assunto 5. Assunto I. Título

CDU xxx

ANDREIA FERREIRA DE SOUZA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, TAXONOMIA POLIFÁSICA,
SUSCEPTIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS E EXTRATOS DAS SEMENTES DE
Vatairea guianensis EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *Candida* spp. NA CIDADE DE
MANAUS**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado
do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e
Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade
Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do
Título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Antonia Queiroz de Lima Souza – FCA/UFAM

Área de concentração: Biotecnologia

Linha de Pesquisa: Bioprospecção e Desenvolvimento de Bioprocessos e Bioprodutos

Banca examinadora

Profa. Dra. Antonia Queiroz Lima de Souza (UFAM)- Presidente

Profa. Dra. Claudia Marques de Oliveira Soeiro (UEA)- Membro

Profa. Dra. Sonia Maria da Silva Carvalho (UFAM)- Membro

Prof. Dr. Felipe Gomes Naveca (FIOCRUZ)- Membro

Profa. Dra. Cintia Mara Costa de Oliveira (FMT-HVD)- Membro

**MANAUS - AM
OUTUBRO/2016**

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho as pessoas que são a razão da minha existência:
Aos meus pais Raimundo Sampaio e Maria das Graças por todo apoio,
compreensão e por serem meus exemplos de luta, persistência,
honestidade e amor!! por estarem presentes em todos os momentos e
por não medirem esforços para a realização de meus sonhos- eu os amo
com toda a força do meu ser!!!*

*Ao meu marido, Túlio de Orleans, meu maior incentivador, amigo e
companheiro, que sempre colaborou para a realização deste sonho,*

*E ao meu filho, Victor de Orleans, minha fonte inesgotável de amor e o
motivo pelo qual eu procuro sempre ser uma versão melhor de mim
mesma!*

AGRADECIMENTOS

“Não há no mundo exagero mais belo que a gratidão”

Jean de La Bruyere

E falando em gratidão, aqui deixo a minha

À DEUS, pela dádiva da vida!!!! Por tudo que me concedeu a trilhar neste caminho, as vezes com lindos jardins, outros com grandes obstáculos... mas nunca me abandonou, e meu deu forças e refrigério para ultrapassá-los!! Sei que só cheguei até aqui pela Tua vontade!!! A Ti toda honra e toda glória! e não é hora de lamuriar...

Ao meu avô Sergio Ferreira da Silva, nordestino de fibra, soldado da borracha, injustiçado pela história, mas um valente guerreiro, um herói brasileiro!!!! Porque eu sei que tudo começou nele. E Deus me oportunizou agradecer a ele antes de ir para a grande morada...

Ao meu irmão Ronaldo Augusto e sua linda família Giselle e Giovana, que na sua provação de vida, sempre me falou palavras de incentivo, carinho e amor!! Eu te amo muito!!! E, esse trabalho, devo a ti também, por caminhos que só o Pai sabe definir...

À minha orientadora Dra. Antônia Queiroz Lima de Souza por SEMPRE acreditar em mim, me incentivando e sempre acreditando no meu potencial em momentos que eu mesma duvidei...

À minha grande amiga Dolores Fonseca do PPG-BIONORTE que com sua perseverança, paciência e amor ao próximo me deu várias lições que extrapolaram os conhecimentos de laboratório;

A minha avó Amelia Martins Ferreira um amor!!! Meus tios: Valdecy que fazia quando criança ler todas os outdoors e a bíblia com seu vocabulário robusto. Val uma batalhadora, sempre acolhedora, lição: perseverar. Waldir a alegria da infância!! Serginho e Vanilza os gênios da família!! Todos exemplos na minha história- AMO VOCES!!!

Vanete minha tia querida e feliz, que o tempo levou, mas as lembranças ficaram!!

À Vanda Maria, primeira secretária do PPG-BIONORTE pela alegria e vontade em sempre ser prestativa!!

À Marta Rodrigues do PPG-BIONORTE, pelo modo único em se fazer presente e a grande ajuda na realização dos experimentos.

À Ana Cláudia Cortéz do PPG-BIONORTE que tanto me ajudou de forma incansável, obrigada pelas conversas prazerosas!!

À Sarah Raquel do MBT, Sandro Fonseca do PPG-BIONORTE e o André Higa pela ajuda no laboratório.

Aos meus grandes amigos Prof. José Fernandes e Profa. Paula Rita que estiveram comigo neste processo extremamente doloroso... sempre com um sorriso e palavras, palavras, palavras mais que carinhosas!!

Ao meu “parceiraço” Dr. César Dourado um grande amigo!! Obrigada pelo companheirismo, palavras de incentivo e o apoio em todos os momentos!

À Dra. Silmara Pennini que ao pedir uma informação, tomou meu texto pela mão como se fosse seu... e ele não foi mais o mesmo. Obrigada pela leitura “pra lá” de criteriosa, pelo carinho e o cuidado!!

Aos meus colegas professores da disciplina Saúde da Mulher da Universidade do Estado do Amazonas que colaboraram comigo sendo perseverantes, obrigada!

À Universidade Federal do Amazonas e ao Programa de Pós-graduação em Diversidade e Biotecnologia PPG-BIONORTE pelo apoio e condições de pesquisa, e a Secretaria Estadual do PPG-BIONORTE no nome do Dr. Jair Maia e as secretárias Luana e Joci pelos serviços prestados.

Ao Laboratório de Biologia Molecular da Universidade da Federal do Amazonas, um agradecimento em particular ao Dr. Spartaco Astolfi Filho e Dra. Enedina Nogueira pelo apoio nos sequenciamentos.

Ao Dr. Edison Rodrigues e Dra. Marília Trapp do Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Microrganismos da Universidade Federal de São Carlos- São Paulo, pelo apoio e análises no Mald-Tof.

À Universidade do Estado do Amazonas-UEA, Laboratórios do MBT no nome do prof. Cleiton Fantin e Laboratório-GEMMA Grupo de Pesquisa em Espectrometria de Massas e Micro-organismos da Amazônia da Universidade Federal do Amazonas no nome do prof. Dr. Afonso Duarte Leão de Souza pela disponibilização das instalações para o desenvolvimento do meu projeto de pesquisa.

Aos colegas do doutorado turma 2012 que dividimos momentos de riso extremo e outros de angústias, Dolores Fonseca, Greicianne, Hilton Marcelo, João Marcelo, Jucileuza Santos, Sandro Fonseca, Cícero Costa, Ana Cláudia Cortéz, Marcelo, Ferdyanne...

Aos meus alunos que neste último ano tiveram pouco de mim... mas sempre me incentivaram sabendo do que viria pela frente!E aos que neste momento de pânico esqueci, mas que de alguma forma me ajudaram de forma direta ou indiretamente nesta caminhada,

OBRIGADA DE CORAÇÃO A TODOS!

Menção Especial

Segundo Fernando Pessoa:

“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que elas acontecem. Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis”.

Com a minha Orientadora, Dra. Antonia Queiroz de Lima Souza, foi assim... ela surgiu de repente e fez desse momento único!! Ali criamos laços, sabe esses encontros assim determinados por Deus!! Que se olha, se confia e dali se segue juntos... mais isso só foi possível porque ela é um ser mais que especial, acredita no próximo!!

E por isso Profa. quero lhe agradecer pelo carinho incondicional, apoio incansável, paciência interminável e principalmente por ter cumprido o papel mais importante de um professor: “desvendar um novo mundo ao seu aluno”

Muito obrigada!!

Epígrafe

*“Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir
entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar, por que
descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante
é o DECIDIR”*

Cora Coralina

RESUMO

A *C. albicans* é o fungo mais frequentemente isolado em humanos saudáveis, sendo considerada a principal espécie patogênica oportunista, entretanto, nas últimas décadas, tem sido observado um significativo aumento de outras espécies não-*albicans*, implicadas tanto na colonização como em processos infecciosos humanos. A manifestação clínica mais prevalente, deste fungo, na mulher é a Candidíase Vulvovaginal (CVV). OBJETIVO: realizar a caracterização molecular e a taxonomia polifásica de espécies de *Candida* oriundas de isolados de exsudato vaginal e descrever seus perfis de susceptibilidade a antifúngicos e aos extratos de *Vatairea guianensis*. METODOLOGIA: A identificação foi realizada por métodos clássicos (Microcultivo, CHROMagar, Auxonograma), MALDI-TOF, multiplex PCR e a molecular. A variabilidade fenotípica foi feita por AFLP, e os testes de susceptibilidade em placa de Elisa por microdiluição com os antifúngicos e os extratos de *Vatairea guianensis*. RESULTADO: A colonização de *Candida* sp. na vagina foi estatisticamente significativa em pacientes com idade igual ou maior que 35 anos, que faziam uso de roupas íntimas justas e/ou sintéticas, em uso de antibioticoterapia e que tinham episódios CVV recorrente. Das 202 amostras 37,1 % (N=75) foi possível isolar leveduras *Candida* sp. Na análise da variabilidade genética foi feito a AFLP. *Candida albicans* foi a espécie mais isolada (64 %), seguida por *C. parapsilosis* (20 %), *C. glabrata* (5,3 %), *C. tropicalis* (4 %), *C. haemulonius* (4%) e *C. krusei* (1,3 %) e *C. lusitaniae* (1,3 %). São necessárias combinações entre métodos fenotípicos e também a realização de provas complementares para a identificação de *Candida* spp. Os métodos moleculares disponíveis confirmam que o uso de métodos fenotípicos para o diagnóstico clínico deve ser cauteloso, pois possuem baixa acurácia na determinação de espécies *Candida* não *albicans* e na identificação de novas espécies. CONCLUSÃO: O MALDI-TOF se mostrou como uma excelente ferramenta para a identificação de espécies de *Candida* sp, pois associa simplicidade da técnica, procedimentos parcialmente automatizados e principalmente a rapidez do resultado microbiológico, a limitação deste método está na ausência de um completo banco de dados. *C. haemulonii*, uma espécie emergente e rara, foi pela primeira vez identificada em isolados do exsudato vaginal de mulheres assintomáticas em Manaus. A grande maioria dos isolados de *Candida* sp., do exsudato vaginal, apresentou resistência aos antifúngicos fluconazol, itraconazol, cetoconazol e a nistatina. Os extratos das sementes de *Vatairea guianensis* apresentou apenas atividade fungistática em 04 isolados de *Candida* sp. do exsudato vaginal. Assim, esta pesquisa contribuiu para o conhecimento epidemiológico das espécies de *Candida* na flora vaginal de pacientes assintomáticas, podendo orientar o diagnóstico em condições patológicas e sendo utilizado na monitorização de infecções emergentes e resistentes às drogas, pois a variação das espécies de acordo com a localização geográfica deve ser levada em conta entre os fatores epidemiológicos de CVV.

PALAVRAS-CHAVES: *Candida* spp., Taxonomia Polifásica, MALDI-TOF, Candidíase Vulvovaginal, *Vatairea guianensis*.

ABSTRACT

The *C. albicans* is the most frequently isolated fungus in humans healthy, being considered the main opportunistic pathogenic species. However, in recent decades, it has been observed a significant increase of other non-*albicans* species, involved both in colonization as in human infectious processes. The clinical manifestation but prevalent, This fungus, the woman is Vulvovaginal candidiasis (VVC). This study had the objective of making the molecular characterisation and polyphasic taxonomy of *Candida* species isolated from vaginal exudate and describe their susceptibility profiles antifungals and extracts of *Vatairea guianensis*. The identification was performed by methods Classics (Microculture, CHROMagar, Auxonogramme), MALDI-TOF, multiplex PCR and molecular. In the analysis of genetic variability was made to AFLP. The colonization of *Candida* sp. in the vagina was statistically significant in patients aged 35 years or more, which made use of underwear fair and/or synthetic, in use of antibiotic therapy and who had CVV recurrent episodes. Of the 202 samples 37.1% (N = 75) was possible isolating yeasts *Candida* sp. *C. albicans* was the most isolated species (64%), followed by *C. parapsilosis* (20%), *C. glabrata* (5.3%), *C. tropicalis* (4%), *C. haemolius* (4%) and *C. krusei* (1.3%) and *C. lusitaniae* (1.3%). Combinations of methods are required phenotypic and also carrying out additional evidence to the identification of *Candida* spp. molecular methods available confirm that the use phenotypic methods for clinical diagnosis must be cautious, have low accuracy in determination of *Candida* species not *albicans* and the identification of new species. The MALDI-TOF proved as an excellent tool for species identification of *Candida* sp, as it associates simple technique, procedures partially automated and mainly the speed of the result Microbiology, the limitation of this method is in the absence of a complete database. *C. haemulonii*, an emerging and rare species, was first identified in isolates of vaginal exudate asymptomatic women in Manaus. The vast majority of isolates of *Candida* sp., vaginal exudate, presented resistance to antifungals fluconazole, itraconazole, ketoconazole and Nystatin. The extracts of the seeds of *V. guianensis* presented only fungistatic activity in 04 isolates of *Candida* sp. vaginal exudate. Thus, this research contributed to the epidemiological knowledge of species of *Candida* in vaginal flora of asymptomatic patients, and may guide the diagnosis in pathological conditions and being used in monitoring of emerging infections and drug resistant, because the variation of species according to geographical location should be taken into account between the epidemiological factors of CVV.

Key words: *Candida* spp., Polyphasic Taxonomy, MALDI-TOF, Vulvovaginal Candidiasis, *Vatairea guianensis*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura do DNA ribossômico, com os fragmentos Internal Transcribed Spaces, a ITS 1 e ITS2. La amplificación de estas zonas de ADNr utilizando los iniciadores ITS-1 e ITS-4 y posterior secuenciación de los fragmentos amplificados, permite diferenciar entre la mayoría de las especies fúngicas (PEMAN et al., 2001).....	27
Figura 2 - Modelo esquemático de funcionamento do MALDI-TOF (COSTA, 2015)	29
Figura 3 - <i>Vatairea guianensis</i> : Aspectos da árvore (A) e do fruto (B). Imagens cedidas por Cléia Tereza Lamarão da Silva.....	34
Figura 4 - Métodos de conservação das cepas isoladas (A) Óleo mineral, (B) Glicerol.....	39
Figura 5 - Figura 5: Semente e fruto de <i>Vatairea guianensis</i>	51
Figura 6 - Material pós- moagem da semente de <i>Vatairea guianensis</i>	51
Figura 7 - Ensaio quantitativo para determinação da atividade antimicrobiana.....	54
Figura 8 - Distribuição segundo a prevalência de colonização de <i>Candida</i> spp. em isolados de exsudato vaginal nas mulheres amostradas, Manaus - AM.....	57
Figura 9 - Distribuição da faixa etária das mulheres amostradas, Manaus - AM.....	59
Figura 10 - Figura 10: Placa de Petri com meio Ágar Sabourad Dextrose positiva para <i>Candida</i> sp.	66
Figura 11 - Micromorfologia em Agar-fubá (1000x) de <i>Candida albicans</i>	67
Figura 12 Distribuição das espécies de <i>Candida</i> em meio cromogênico para identificação presumtiva destas leveduras em amostras isoladas do exsudato vaginal	68
Figura 13 - Distribuição das espécies de <i>Candida</i> identificadas pelo método molecular isoladas do exsudato vaginal	69
Figura 14 - Distribuição das espécies de <i>Candida</i> identificadas pelo método de Maldi-tof isoladas do exsudato vaginal	70
Figura 15 - Distribuição por espécie de <i>Candida</i> entre os métodos de identificação auxonograma, CHROMagar e molecular nos isolados do exsudato vaginal em mulheres amostradas, Manaus- AM.....	74
Figura 16 - Distribuição por espécie de <i>Candida</i> entre os métodos de identificação MALDI-TOF e molecular nos isolados do exsudato vaginal em mulheres amostradas, Manaus- AM .	75

Figura 17 - Distribuição das amostras de Candida spp. cuja a identificação da espécie foi concordante em 05 técnicas diagnósticas diferentes	75
Figura 18 - Dendograma gerado pelo programa IQ-TREE pelo método de máxima verossimilhança referente as cepas de Candida spp. isolados do exsudato vaginal	77
Figura 19 - Placa de AFLP em gel de poliacrilamida a 6% das amostras de Candida spp dos isolados	79
Figura 20 - Dendograma representando todas as amostras de Candidas de isolados de exsudato vaginal	80

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1 - Cálculo da reação de amplificação do PCR para as amostras fúngicas	42
Tabela 2 - Critérios de leitura, segundo CLSI (2008), para a avaliação da sensibilidade para os antifúngicos Cetoconazol, Fluconazol, Itraconazol e Nistatina	52
Tabela 3 - Descrição dos antifúngicos nas concentrações da solução e de sensibilidade	53
Tabela 4 - Esquema das amostras nos poços na placa de Elisa	54
Tabela 5 - Esquema das amostras nos poços na placa de Elisa para a determinação da dosagem inibitória mínima (MID).....	55
Tabela 6 - Descrição dos antifúngicos nas concentrações da solução e de resistência	55
Tabela 7 - Esquema das amostras nos poços na placa de Elisa	56
Tabela 8 - Distribuição segundo os dados sociodemográficos, ciclo menstrual, uso de roupas específicas, álcool, antibiótico, relação sexual nos últimos 30 dias e uso de anticoncepcional das mulheres amostradas, Manaus - AM.....	60
Tabela 9 - Distribuição segundo os dados sociodemográficos, ciclo menstrual, uso de roupas específicas, anticoncepcional, antibiótico e relação sexual nos últimos 30 dias em relação a prevalência de <i>Candida</i> nas mulheres amostradas, Manaus - AM	64
Tabela 10 - Regressão Logística dos dados sociodemográficos, ciclo menstrual, uso de roupas específicas, álcool, antibiótico e relação sexual nos últimos 30 dias em relação a prevalência de <i>Candida</i> nas mulheres amostradas, Manaus - AM.....	65
Tabela 11 - Distribuição da frequência e comparação dos diferentes métodos fenotípicos para identificação das espécies de <i>Candida</i> , Manaus - AM.....	71
Tabela 12 - Distribuição segundo a sensibilidade e especificidade dos diferentes métodos de identificação do gênero <i>Candida</i> em relação ao método molecular, Manaus - AM	72
Tabela 13 - Relação de concordância entre os métodos Molecular e CHROMagar de isolados clínicos do gênero <i>Candida</i>	73
Tabela 14 - Distribuição das cepas de <i>Candida</i> sp. que apresentaram sensibilidade aos antifúngicos itraconazol, nistatina, fluconazol e cetoconazol	81
Tabela 15 - Descrição da atividade fungistática dos extratos de <i>Vatairea guianensis</i> sob as cepas de <i>Candida</i> sp.	83

Quadro 1 - Concentrações e respectivos volumes usados na PCR dos iniciadores espécie-específico. [] = concentração **Erro! Indicador não definido.**

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 JUSTIFICATIVA.....	19
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	20
3.1 <i>Candida</i> spp.	20
3.2 Colonização do Trato Genital pela <i>Candida</i> sp. e Fatores Predisponentes ao Desenvolvimento da Infecção por <i>Candida</i> sp.	21
3.3 Candidíase Vulvovaginal (CVV).....	23
3.4 Diagnóstico Laboratorial	24
3.4.1 Métodos Fenotípicos	24
3.4.2 Métodos Moleculares	26
3.4.2.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Sequenciamento.....	26
3.4.2.2 PCR associada Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)	27
3.4.2.3 Espectrometria de massas (MS) e matrix Associated Laser Desorption - Ionization -Time of Flight (MALDI-TOF MS).....	28
3.5 Considerações sobre os Antifúngicos e Testes de Susceptibilidade.....	30
3.6 Plantas Medicinais - Caminho para Novos Fármacos	31
3.6.1 <i>Vatairea guianensis</i>	33
4 OBJETIVOS.....	36
4.1 Geral.....	36
4.2 Específicos	36
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
5.1 Tipo de Estudo	37
5.2 Local de Estudo	37
5.3 Aspectos Éticos.....	37
5.4 Sujeitos do Estudo	37
5.5 Avaliação Clínica e Coleta dos Isolados.....	38
5.6 Conservação das Cepas Isoladas.....	39
5.7 Métodos Fenotípicos.....	39

5.7.1 Aspectos Macromorfológicos / Crescimento em Ágar Sabourad (SB).....	39
5.7.2 Aspectos Micromorfológicos	40
5.7.3 Crescimento em Meio Cromogênico	40
5.7.4 Auxanograma (Assimilação de Carboidratos)	40
5.8 Identificação Taxonômica Molecular	41
5.8.1 Extração de DNA	41
5.8.2 Quantificação do DNA.....	42
5.8.3 Amplificação por PCR	43
5.8.4 Purificação da PCR por ExoSAP.....	43
5.8.5 Sequenciamento e Análise Molecular	43
5.9 Método Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time Of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)	43
5.10 Análise de variabilidade genética por AFLP (<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>).....	44
5.10.1 Preparação das amostras.....	45
5.10.2 Análise do produto da AFLP.....	49
5.11 Análise Estatística.....	50
5.12 Avaliação biológica com extratos de <i>Vatairea guianensis</i>	50
5.12.1 Coleta e obtenção do material botânico	50
5.12.2 Preparação do material vegetal e obtenção dos extratos.....	51
5.12.3 Ensaio das Atividades Antimicrobiana das Cepas de <i>Candida</i> sp.	52
5.12.3.1 Teste de Sensibilidade.....	53
5.12.3.1.1 Preparo dos Controles.....	53
5.12.3.1.2 Determinação da Atividade Antimicrobiana- Ensaio em Placas de Microdiluição..	53
5.12.3.2 Teste de Resistência.....	55
5.12.3.2.1 Preparo das Amostras.....	55
5.12.3.2.2 Preparo ddos controles.....	56
5.12.3.2.3 Determinação da Atividade Antimicribiana- Ensaio em Placas de Microdiluição..	56
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
6.1 Caracterização das Amostras e Fatores de Risco.....	57
6.1.1 Isolados clínicos	57
6.1.2 Perfil Sociodemográfico das Pacientes	58
6.1.3 Fatores de Risco para CVV em Pacientes Colonizadas por <i>Candida</i> spp.	61
6.2 Identificação dos isolados clínicos do gênero <i>Candida</i>	66

6.2.1 Identificação dos isolados clínicos do gênero <i>Candida</i> pelos métodos fenotípicos	66
6.4.2 Identificação dos isolados clínicos por métodos moleculares.....	69
6.5 Comparação entre os Métodos Diagnósticos	70
6.6 <i>C. haemulonii</i> - primeiro isolamento no exsudato vaginal no Brasil.....	76
6.7 Variabilidade Genética das espécies de <i>Candida</i> por AFLP (<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>).....	78
6.8 Perfil de Susceptibilidade e de Resistência dos isolados clínicos aos agentes antifúngicos convencionais	81
6.9 Atividade antifúngica de extratos brutos de <i>Vaitarea guianensis</i>	83
7 CONCLUSÃO.....	85
8 REFERÊNCIAS	87
ANEXOS	98

1 INTRODUÇÃO

A taxonomia de fungos com relevante importância médica é uma área crescente de pesquisa. Os fungos causam amplo espectro de doenças, originando desde infecções bem limitada de pele e mucosas até o envolvimento sistêmico e disseminado nos órgãos internos. Constituindo uma situação de grave problema de saúde pública nas regiões subdesenvolvidas e extremamente preocupantes nos países desenvolvidos, com mortalidade atribuída direta ou indiretamente de 40 % a 60 %. A importância das infecções por fungos, particularmente das leveduras do gênero *Candida*, têm estimulado estudos voltados à compreensão da epidemiologia, genética, bioquímica e patogênese dessas doenças, em uma interdisciplinaridade dos conteúdos envolvendo esses micro-organismos (GARVEY et al, 2015; GIOLO et al., 2010).

Uma das manifestações clínicas mais prevalentes do gênero *Candida* é a vulvovaginite, estima-se que 75 % das mulheres adultas apresentarão pelo menos um episódio de Candidíase Vulvovaginal (CVV) em sua vida. Destas 40 a 55 % vivenciarão novos surtos e 5-8 % irão tornar-se recorrentes com resistência antifúngica instalada (ZISOVA et.al., 2016). A CVV é a principal queixa de Ambulatório de Ginecologia, sendo o tipo mais comum de vaginite aguda nos países tropicais e nos Estados Unidos da América ocupa o segundo lugar, precedido apenas pela Vaginose Bacteriana (GARVEY et. al., 2015). Numerosos estudos indicam que *C. albicans* é o agente etiológico mais frequente das vulvovaginites, respondendo por 85 a 95 % dos casos. Entretanto, nos últimos anos, tem-se observado um aumento na frequência de outras espécies de *Candida*, principalmente *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr* e *C. lusitaniae*, indicando uma tendência de mudança na etiologia da candidíase após décadas de domínio de *C. albicans*. Estas espécies são parte da microbiota vaginal, e estão presentes em 20 a 80 % da população adulta saudável, somente como colonizadores, no entanto, em condições apropriadas se multiplicam, expressam os fatores de virulência, e causam os sintomas e sinais clínicos da CVV (FORNARI et al., 2016).

As mulheres no menacme são mais acometidas, e manifesta-se clinicamente por prurido vulvar intenso, leucorréia grumosa, disúria, edema e hiperemia vulvovaginal. Não existem manifestações clínicas patognômicas de CVV por cada espécie, tornando-se importante identificar o agente etiológico para o diagnóstico diferencial inclusive de outras vaginites infecciosas, portanto o diagnóstico clínico não é conclusivo, tornando imprescindível a confirmação laboratorial (RODRIGUES et al, 2013). Para o diagnóstico microbiológico das *Candida* spp., os métodos de identificação convencional são bem conhecidos e utilizados há muitos anos, estão amplamente otimizados e são considerados padrão-ouro no diagnóstico em

Micologia, estes são baseados nas características morfológicas e bioquímicas desses micro-organismos, como: exame a fresco, exame de cultura, testes de assimilação e fermentação de carboidratos, teste de assimilação de fontes de nitrogênio, prova do tubo germinativo e a utilização de meios cromogênicos. Porém, devido às limitações decorrentes das técnicas convencionais, na última década foram desenvolvidos vários métodos moleculares para a identificação de *Candida* spp., esse avanço de estudos de taxonomia com métodos moleculares possibilitou a descoberta de novas espécies causando infecção. A facilidade, rapidez, versatilidade e sensibilidade da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) a torna particularmente importante para estudos genético-moleculares, envolvendo grande número de indivíduos de qualquer organismo vivo e um dos aspectos mais fundamentais da revolução causada pela PCR é a possibilidade de se gerar grandes quantidades de DNA de segmentos específicos do genoma. Assim temos na atualidade inúmeras metodologias com modificação desta técnica que tem sido considerada uma poderosa ferramenta para identificação taxonômica (SILVA, 2013).

Atualmente uma nova metodologia utilizada é a análise de macromoléculas por Espectrometria de Massa por Tempo de Voo- Ionização/Dessorção a Laser Assistida por Matriz (MALDI-TOF), é uma técnica físico-química, que possibilita o diagnóstico microbiológico de forma rápida, eficaz e precisa. Com essa técnica, um micro organismo desconhecido pode ser identificado por comparação de seu espectro de massa ribossomais com um banco de dados de espectros de referência, mas recentemente tem sido usado para detectar e identificar leveduras, pois é capaz de discriminar espécies estreitamente relacionadas de forma automatizada com baixo custo e em tempo mínimo (COSTA, 2015).

A terapêutica da CVV é limitada aos derivados azólicos de uso oral (fluconazol e itraconazol) e de uso tópico ou intravaginal (clotrimazol, econazol, fenticonazol, miconazol e sertaconazol) e poliênicos (nistatina e anfotericina B). No entanto, uma grande parcela de mulheres não responde ao tratamento inicial e os casos de recidivas são comuns, uma vez que estas necessitam de concentrações maiores ou de novos antifúngicos para serem inibidas (MAHMOUDI et al., 2012). O uso indiscriminado e crescente desses antifúngicos na profilaxia dessas infecções, bem como o uso dos mesmos em doses inadequadas muitas vezes resulta em seleção de cepas, representando fatores importantes relacionados a ocorrência de casos resistentes ao tratamento (RODRIGUES et al., 2013; PANIZZO, 2009). Mahmoudi et al (2012) relatam que o perfil de suscetibilidade das espécies de *Candida* aos antifúngicos é diverso nas variadas populações, o que torna primordial a identificação da espécie antes de instituir o tratamento. Assim como a determinação da atividade dos antifúngicos *in vitro* possibilita realizar uma correlação com a resposta clínica, sendo possível desta forma, monitorar a

resistência aos antifúngicos no curso do tratamento clínico e determinar as espécies que apresentam mais comumente resistência (PANIZZO, 2009).

Por conta deste cenário que vem se desenhando é importante que a ciência traga novas informações sobre a dinâmica dessas infecções, o perfil epidemiológico local, bem como sobre a descoberta de novos fármacos antifúngicos, onde uma fonte promissora são as plantas medicinais. Nos últimos anos, no Brasil, pesquisas com plantas medicinais envolvendo diversas áreas como a fitoquímica, a etnobotânica, a etnofarmacologia e a farmacologia, têm sido realizadas de forma bastante intensa, apresentando contribuições relevantes no que diz respeito aos aspectos relacionados ao isolamento de princípios ativos e principalmente à atividade biológica de plantas que ocorrem nos diferentes biomas brasileiros (LAMARÃO SILVA, 2011). Contudo, pesquisas regionais são necessárias não só para a descoberta de novos agentes terapêuticos, uma vez que a Amazônia é detentora de uma imensa biodiversidade sendo que a maior parte encontra-se ainda sem o devido estudo, um exemplo é a *Vatairea guianensis*, espécie botânica nativa da Amazônia, cuja semente é utilizada popularmente contra diversos tipos de infecções fúngicas como as micoses superficiais e sob a forma de tintura, há também relato do uso em duchas vaginais no caso de corrimento vaginal porém sem comprovações científicas, sendo poucas as referências na literatura sobre sua atividade biológica (OTOBELLI et al, 2011). Não foi encontrado registros sobre sua ação em isolados clínicos de *Candida* spp.

Portanto, esta pesquisa se propôs a estudar a ação antifúngica da espécie *V. guianensis* em cepas de *Candida*, que colonizam a mucosa genital feminina, identificadas através da taxonomia clássica e por métodos moleculares como o MALDI-TOF, multiplex PCR e a molecular, avaliando também a variabilidade genética através do AFLP. Desta forma, pretende-se contribuir com o conhecimento da dinâmica dessa infecção a partir da colonização do trato genital, bem como com um possível desenvolvimento futuro de nova droga para o tratamento e manejo clínico dessa patologia, baseado nos conhecimentos tradicionais.

2 JUSTIFICATIVA

No Brasil a incidência da CVV, em mulheres no período da vida reprodutiva, varia de 25 a 42 % dependendo da localização geográfica. Em mulheres sintomáticas foi observada uma incidência de 35,5 % e estudos apontam que 20 a 25% das mulheres adultas apresentam colonização assintomática e 75 % delas, em algum momento, apresentarão algum episódio de infecção clínica em suas vidas (PEIXOTO et al, 2014).

As leveduras do gênero *Candida* fazem parte da microbiota humana normal, podendo ser encontradas na pele e nas mucosas bucal, do trato gastrointestinal e do trato urogenital desde o nascimento. O status imunológico do hospedeiro é o principal fator que determina o momento em que estas leveduras deixam de ser comensais e passem a ser patogênicas, invadindo os tecidos e causando infecção, contudo as espécies de *Candida* parecem estar relacionadas com uma maior dificuldade terapêutica e ocorrência de recorrências (CAMARGO et al, 2008).

Dessa forma, a identificação da espécie como rotina de laboratório é essencial para o entendimento da patogênese e para um maior conhecimento sobre a forma de contaminação, reservatórios de infecção e de reinfecção em diversos sítios como vulva e vagina. Além disso, as espécies de *Candida* apresentam sensibilidade variada aos atuais e novos antifúngicos em desenvolvimento, devido a esse fato, a identificação do agente é importante para o planejamento terapêutico e estudos epidemiológicos (RITCHER et al, 2005).

Assim, por acometer milhões de mulheres anualmente, determinando grande desconforto, interferindo nas relações sexuais, afetivas e prejudicando o desempenho laboral, a CVV tem sido considerada um importante problema de saúde pública mundial. Não obstante a magnitude do problema, o número de informações na literatura sobre colonização/infecção por leveduras é insatisfatório e tem recebido pouca atenção das autoridades sanitárias embora diversos dados epidemiológicos, microbiológicos e quanto á resistência as drogas antifúngicas cada vez mais observada na prática clínica permaneçam controversos. Portanto por este contexto atual, o presente estudo foi desenvolvido a partir de isolados de *Candida* spp. do fluido vaginal objetivando realizar a taxonomia polifásica e os testes de susceptibilidade a antifúngicos e aos extratos obtidos das sementes de *V. guianensis*.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 *Candida* spp.

Os fungos leveduriformes (unicelulares) do gênero *Candida* podem ser encontrados em variados ecossistemas, como solo, alimentos e água, assim como também fazem parte da microbiota de homens e animais. Do ponto de vista taxonômico, 314 espécies de *Candida* são pertencentes ao Reino Fungi, grupo *Eumycota*, filo *Deuteromycota*, classe *Blastomycetes* e Família *Cryptococcaceae*, embora algumas espécies estejam agrupadas na subdivisão *Ascomycotina*. A *C. albicans* é a mais frequentemente isolada em humanos saudáveis, sendo considerada a principal espécie patogênica oportunista; entretanto, nas últimas décadas, tem sido observado um significativo aumento de outras espécies, conhecidas como não-*albicans*, implicadas tanto na colonização como em processos infecciosos humanos, como: *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. norvegensis*, *C. rugosa*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. ciferrii* e *C. haemulonii*. (GIOLO et al, 2009).

As leveduras do gênero *Candida* são micro-organismos eucarióticos, possuem parede celular rígida composta basicamente por quitina que não permite a realização da fagocitose. Degradam proteínas e carboidratos para a obtenção de carbono e nitrogênio, elementos essenciais para o seu desenvolvimento. Devido a sua capacidade adaptativa, as leveduras podem se desenvolver tanto na presença de oxigênio quanto em anaerobiose. Na maioria das vezes se reproduzem de maneira assexuada, por brotamento dos conídios, entretanto, algumas espécies se multiplicam sexualmente pela fusão de núcleos e produção de artrosporos e basidiósporos (FORBES et al, 2002; PEIXOTO et al, 2014).

Quanto aos aspectos microbiológicos este gênero cresce em meio de cultura ágar Sabouraud, na temperatura de 20 °C a 38 °C, em pH ácido com a faixa ideal entre 2,5 a 7,5; com características das colônias de aspecto liso ou rugoso, cremosas, úmidas e de coloração branco-amarelada. Microscopicamente apresentam o formato esférico, ovóide ou alongado e medem de 3 a 5 µm de diâmetro.

É um organismo dimórfico, pois se apresenta sob a forma leveduriforme (blastoconídios) no estado saprofítico e na forma filamentosa (pseudo-hifas) nos processos patogênicos. Contudo, é considerado por alguns autores como um fungo pleomórfico por se apresentar também na forma de clamidósporos (esporos de resistência, arredondados com parede celular espessa) que crescem sob condições subótimas, como em meios de cultura pobres, com baixo teor de glicose ou baixa tensão de oxigênio, (ALVARES et al, 2007; CAVALCANTE et al, 2005).

Em seres humanos, a *Candida* sp. está presente em uma coexistência não nociva, como comensal ou saprófita. No entanto, em situações que normalmente levam a ruptura do equilíbrio biológico pode haver um aumento na multiplicação das leveduras que passam a invadir os tecidos ocasionando infecções ou doenças denominadas candidíases ou candidoses (MAHMOUDI et al., 2012). As manifestações clínicas causadas pela *Candida* são diversas, que podem variar desde uma infecção localizada até uma doença disseminada e potencialmente fatal, sendo classificadas, de acordo com a localização da infecção em cutânea, mucocutânea e sistêmica (PEIXOTO et al, 2014).

3.2 Colonização do Trato Genital pela *Candida* sp. e Fatores Predisponentes ao Desenvolvimento da Infecção por *Candida* sp.

A presença de *Candida* spp. na mucosa vaginal na ausência de sinais e sintomas de doença indica que há colonização assintomática. Estudos indicam que cerca de 20 a 30 % das mulheres saudáveis são portadoras assintomáticas de leveduras (ACHKAR & FRIES, 2010; GUZEL et al, 2011). Essa colonização pode ocorrer a partir de várias fontes, como por propagação local do períneo, introdução digital e por via sexual; contudo, a principal fonte de leveduras vaginais é o trato gastrointestinal, onde, através de um processo chamado transmissão endógena são veiculadas para a vagina por auto-inoculação, adaptando-se e passando a se desenvolver no ambiente vaginal. Através da ação de enzimas como proteases e hidrolases, as leveduras que chegam à vagina penetram no seu epitélio superficial, ali permanecendo albergadas e podendo causar distúrbios imediatos ou constituir reservatório para infecções ou reinfecções posteriores (BARBEDO & SGARBI, 2010).

White et al (2007) sugerem que durante a colonização a população de micro-organismos resulta de um equilíbrio entre sistema imune do hospedeiro e a capacidade dos micro-organismos em se multiplicarem. Um fator importante na manutenção do equilíbrio da resposta inflamatória são os receptores “*toll-like*”, proteínas transmembrânicas com função imunológica, envolvidas no reconhecimento de patógenos microbianos e geração de sinais para a produção de outras proteínas e de citocinas pro-inflamatórias. A microbiota normal pode estimular esses receptores e essas interações são importantes para a regulação da resposta inflamatória. O outro fator relacionado às leveduras envolve a capacidade das mesmas em controlar o crescimento de sua população através da expressão de reguladores que parecem ser fatores que podem auxiliar na manutenção do equilíbrio entre a colonização e o desenvolvimento da doença (MOREIRA, 2012).

A relação de equilíbrio entre *Candida* spp. e o hospedeiro é propiciada pela manutenção da integridade das barreiras teciduais, pela relação harmônica entre a microbiota autóctone e o funcionamento adequado do sistema imunológico humano. Em contrapartida, o fungo, por sua parte, expressa de forma equilibrada a sua capacidade de aderência e de produção de enzimas e toxinas. Os micro-organismos expressam mecanismos que permitem a colonização ou infecção no hospedeiro e neste contexto, muitos patógenos incluindo *Candida*, expressam uma série de estratégias específicas para se estabelecer, colonizar, causar a doença e superar as defesas de hospedeiros susceptíveis (SANTANA et al, 2013).

Várias são as situações que levam a ruptura desse equilíbrio biológico e predispõem a infecção, como: fatores genéticos, alterações fisiológicas (pH) e mecânicas locais (ex. traumas e anomalias), presença de patologias associadas (ex. diabetes mellitus, neutropenia por leucemia ou doença granulomatosa crônica), uso de medicamentos (ex. antibióticos, contraceptivos) e, principalmente, frente a deficiência imunológica, seja hereditária (ex. agamaglobulinemia ligada ao cromossomo X), infecciosa (HIV) ou iatrogênica (ex. uso de corticosteroides, imunoterápicos). Nessas situações pode haver um aumento na multiplicação das leveduras que passam a invadir os tecidos ocasionando infecções ou doenças denominadas candidíases ou candidoses (MAHMOUDI et al, 2012).

Com relação ao fator genético estudos sobre os polimorfismos *in vitro*, envolvendo a ligação da lectina à manose e, consequentemente, alterando a via da lectina na ativação do sistema complemento e a indução de vaginite em camundongas sugere que alguns indivíduos podem ter uma susceptibilidade genética para esta doença (SOBEL, 2010).

Outro fator importante é o aumento dos níveis de glicogênio que constitui o substrato nutricional dos fungos, favorecendo a invésão fúngica da mucosa vaginal, que pode ocorrer frente ao *diabetes mellitus* não controlado e à situações de hiperestrogenismo como gravidez, uso de contraceptivos orais de altas doses, terapia de reposição hormonal, assim como os ciclos menstruais regulares com picos hormonais certos de FSH, LH, estradiol e progesterona. Assim como foi observado que condições que levam a níveis baixos de estradiol, como lactação ou uso de progestogênios orais e, sobretudo, injetáveis, ocorre certa proteção contra episódios de CVV. Quanto ao uso de antibióticos, sistêmicos ou tópicos, o mecanismo pelo qual favorece o desenvolvimento da infecção por leveduras comensais parece estar associado ao desequilíbrio da microbiota bacteriana vaginal, com a diminuição particularmente dos bacilos de Döderlein, diminuindo a competição por nutrientes (ALVARES, 2013).

Outros fatores especulados são os hábitos higiênicos inadequados, sobretudo a realização da limpeza anal no sentido do ânus para a vagina, a presença de resíduos de fezes

nas roupas íntimas e o uso de roupas íntimas justas e/ou sintéticas com pouca aeração e aumento da umidade local predispondo a colonização ou infecção no hospedeiro (ALVARES, 2013).

3.3 Candidíase Vulvovaginal (CVV)

A CVV é uma infecção de vulva e vagina, causada por leveduras comensais que habitam a mucosa vaginal, descrita pela primeira vez em 1949 por Wilkinson que estabeleceu uma relação entre a existência de fungos na vagina e o aparecimento de vaginite. É um dos diagnósticos mais frequentes em ginecologia, sendo o tipo mais comum de vaginite aguda nos países tropicais; nos EUA ocupa o segundo lugar, precedido apenas pela vaginose bacteriana. A incidência de CVV varia de aproximadamente 25 % na população feminina em geral a 42 % entre mulheres adolescentes. Em um estudo comparativo, foi observada uma incidência de 35,5 % para as mulheres sintomáticas e de 15 % para as assintomáticas de um grupo controle. Estudos apontam que 20 a 25 % das mulheres adultas apresentam colonização assintomática e 75 % delas, em algum momento, apresentam algum episódio de infecção clínica em suas vidas, com a prevalência de *Candida albicans* de 70 a 90% (ALVARES et al, 2007; GIOLO et al, 2010).

Essa infecção caracteriza-se por prurido, ardor, dispareunia e pela eliminação de um corrimento vaginal em grumos, semelhante à nata de leite. Com frequência, a vulva e a vagina encontram-se edemaciadas e hiperemiadas, algumas vezes acompanhadas de ardor ao urinar e sensação de queimadura. As lesões podem-se estender por períneo, região perianal e inguinal. O corrimento, que geralmente é branco e espesso, é inodoro e, quando depositado nas vestes a seco, tem aspecto farináceo. Em casos típicos, nas paredes vaginais e no colo uterino aparecem pequenos pontos branco-amarelados. Os sintomas se intensificam no período pré-menstrual, quando a acidez vaginal aumenta (HOLANDA et al, 2007).

Apesar de *C. albicans*, ser a espécie mais frequentemente associada a candidíases, tem-se identificado outras espécies de *Candida*, principalmente de *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* como agentes etiológicos de candidíases (PANIZO et al, 2009). Mais especificamente os casos de infecções provocadas por *C. glabrata* tem aumentado significativamente, sendo importante causa de CVV nas últimas duas décadas, com patogenia semelhante a *C. albicans* pois também faz parte da microbiota normal de indivíduos saudáveis (BARBEDO & SGARBI, 2010).

A ocorrência de episódios recorrentes de CVV tem sido observada com frequência, chegando a ser observado que proximadamente 5% das mulheres chegam a apresentar três ou

mais episódios no período de 12 meses, um quadro denominado Candidíase Vulvovaginal Recorrente (CVVR). Isso se dá quando o fungo não é completamente eliminado da vagina, permanecendo em baixas concentrações, estando, sua ocorrência relacionada mais a fatores inerentes ao hospedeiro (imunológicos ou não) do que à virulência do fungo, pois, da mesma forma, não tem sido observada elevação na resistência de espécies de *Candida* na maioria desses casos, embora mulheres com recorrência têm uma prevalência discretamente mais elevada de *C. glabrata*, menos sensível às drogas imidazólicas, comumente utilizadas no tratamento das candidíases vulvovaginais em geral. Contudo, mulheres que desenvolvem CVVR sem condições predisponentes aparentes tem tornado sua patogênese objeto constante de estudos (HOLANDA et al, 2007; ALVARES et al, 2007).

3.4 Diagnóstico Laboratorial

Para o diagnóstico laboratorial de CVV na prática médica o exame colpocitológico pode servir para um simples rastreamento propedêutico dos corrimentos vaginais, no entanto, a identificação microbiológica de fungos patogênicos é realizada classicamente pelo meio de cultura e identificação das espécies por métodos fenotípicos que exploram as diferenças metabólicas existente nas mesmas. Esses exames deixam a desejar nos casos complicados que exigem a instituição de uma terapia rápida e bem direcionada que é o caso das complicações como recorrências, infecções invasivas e/ou nos casos de resistência medicamentosa, tornando imperativo o uso de metodologias mais rápidas e eficazes para definição das diferentes espécies, como no caso dos métodos moleculares, técnicas bastante utilizadas também em trabalhos de pesquisa.

3.4.1 Métodos Fenotípicos

Os métodos fenotípicos utilizados para caracterização de leveduras são aqueles que analisam a morfologia das estruturas microscópicas, o perfil bioquímico, a atividade enzimática e capacidade de assimilação e fermentação de substratos das mesmas de forma a definir o seu comportamento em diferentes condições e assim possibilitar a identificação da espécie.

São métodos convencionais, também chamados de clássicos, considerados *standart* no diagnóstico em micologia e utilizados na rotina de identificação de isolados de espécies de

Candida. O nível de identificação requerido e recursos disponíveis é que vão determinar o método a ser utilizado (CORREA et al, 2009).

O exame direto do material clínico é uma técnica simples, de baixo custo, rápida, sensível, eficaz e reprodutível, que permite a visualização do fungo e sua identificação imediata. O material coletado é colocado em uma lâmina de vidro e em seguida, é adicionado o hidróxido de potássio (KOH) a 10-20% ou soro fisiológico 0,9 %, coberto com lamínula e levado ao microscópio

para visualização. Apesar da simplicidade da técnica e leitura, o que inviabiliza no cotidiano clínico é a falta de um microscópio no consultório de ginecologia.

Em relação ao cultivo, o meio de cultura mais utilizado para isolamento de *Candida*, é o meio de cultura Ágar Sabouraud Dextrose (SDA) suplementado com cloranfenicol para evitar o crescimento de bactérias, contudo a morfologia da colônia não possibilita identificar a espécie de *Candida* (KONEMAN, 2001).

A prova do microcultivo é uma forma de identificação que consiste em semear as leveduras em meio ágar-fubá acrescido de Tween 80 e manter a lâmina em baixa tensão de oxigênio, pois nesta condição as leveduras apresentam a capacidade de produzir conídios e filamentação. A espécie é sugerida através da observação da presença e disposição ou arranjo dos blastoconídios (ocorrendo em grupos ou cachos, no início ou ao longo das pseudo-hifas, isoladas ou aos pares, nos pontos de constrição ou irregularmente distribuídos nos pseudomicélios) e pseudo-hifas. A formação de clamidoconídios redondos é indicativo da espécie *C. albicans* (FERREIRA & ÁVILA, 2001).

Os meios cromogênicos são meios de cultura que contém compostos específicos ou substratos cromógenos que são transformados pelas enzimas das leveduras produzindo pigmentos específicos para cada espécie através de indicadores de pH e fermentação. Além da coloração, a morfologia das colônias também ajuda na diferenciação entre as espécies. A utilização deste meio facilita a detecção e a identificação dessas leveduras possibilitando resultados presuntivos em menor tempo que os obtidos pelos métodos já padronizados de cultura (ARAÚJO et al., 2005).

O Auxanograma avalia a atividade bioquímica do fungo, é uma prova de assimilação de carbono e/ou nitrogênio. Uma suspensão da levedura diluída em solução salina a 0,9 % é inoculada em placa com meio de cultivo isento de carbono e após solidificação são adicionados carboidratos ou açúcares (dextrose, maltose, galactose, lactose, sacarose, rafinose, xinose, inositol, melbiose, trealose e celobiose) e fontes nitrogenadas (peptona e KNO_3) sobre o cultivo e observado a utilização destes como fonte de carbono e nitrogênio. A positividade caracteriza-

se pela formação de um halo ao redor do açúcar, desenvolvido pela assimilação específica de cada levedura confirmando assim a espécie (KONEMAN, 2001).

3.4.2 Métodos Moleculares

3.4.2.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Sequenciamento

A tecnologia da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) consiste na amplificação e multiplicação de um segmento específico de DNA com rapidez e precisão. A capacidade de sequenciar os ácidos nucleicos proporcionou um grande avanço por ter possibilitado a ampliação do conhecimento da estrutura primária dos genes e auxiliado na inferência da função das sequências já conhecidas (ALVES et al, 2010; CAMARGO et al, 2011).

Atualmente existem bancos de sequências genômicas de domínio público que possibilitam um avanço na análise dos resultados. No entanto, de acordo com Moreira (2012), nem todas as identificações desses bancos são altamente confiáveis, uma vez que pode haver pequenas alterações na sequência de nucleotídeos, o banco de dados pode “entender” que há uma espécie não conhecida, que na verdade é um erro de interpretação ocasionada pelo autor, ou podem haver sequências que não foram depositadas no banco, gerando alguns erros de identificação. Dentre esses bancos, o mais popular é o *Gen Bank*, do *National Center for Biotechnology Information* – NCBI (MOREIRA, 2012).

A maior parte do genoma haploide de *Candida* sp. consiste em DNA mitocondrial e DNA ribossômico (DNAr). No DNAr existem três regiões codificadoras relativamente conservadas que incluem as regiões 18S, 5.8S que é uma sequência altamente conservada e a região 28S. Entre a região 5.8S e a região 28S existem regiões de sequências variáveis denominadas de regiões Espaçadores Internos Transcritos, ou em inglês *Internal Transcribed Spaces*, a ITS 1 e ITS2 são regiões que permaneceram conservadas ao longo da evolução (Figura 1). A região ITS1 apresenta rápida evolução e a região ITS2 apresenta uma evolução moderadamente rápida, demonstrando baixo polimorfismo intraespecífico e alto polimorfismo interespecífico (MOREIRA, 2007). Outra abordagem no DNAr é o domínio D1 e D2 da subunidade 26S para identificação de leveduras. Com isso vários estudos estão utilizando o sequenciamento direto das regiões ITS e D1/D2 para a identificação de leveduras em gênero e espécie, verificar se há alterações entre as espécies e ainda se, as espécies estão inter-relacionadas (LIGOURI et al, 2010).

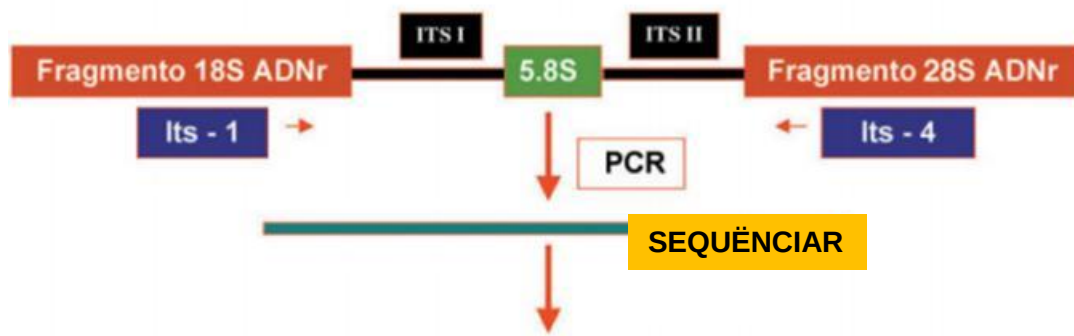


Figura 1 - Estrutura do DNA ribossômico, com os fragmentos *Internal Transcribed Spaces*, a ITS 1 e ITS2. A amplificação destas zonas do DNAr utilizando os iniciadores ITS-1 e ITS-4 e posterior sequenciamento dos fragmentos amplificados, permite diferenciar a maioria das espécies fúngicas (PEMAN et al., 2001).

Assim, mesmo que estas técnicas moleculares sejam altamente sensíveis e específicas, sua aplicabilidade limitada tem sido a necessidade de equipamento caro, não prontamente acessível para muitos laboratórios de diagnóstico.

3.4.2.2 PCR associada a Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

O AFLP é uma técnica para o DNA "*fingerprinting*", baseia-se na detecção de fragmentos de restrição genômica por amplificação por PCR e pode ser usada para DNA de qualquer origem ou complexidade. As impressões digitais são produzidas sem o conhecimento prévio de sequência usando um conjunto limitado de primers genéricos.

Os marcadores gerados pela técnica de AFLP associam o polimorfismo gerado por enzimas de restrição com a capacidade de detecção da técnica de PCR. Nesta técnica, o DNA total estudado é clivado por enzimas de restrição. Pequenas sequências de DNA (adaptadores) são acopladas às extremidades desses fragmentos de restrição, as quais se anelarão com primers específicos, durante a PCR. Os fragmentos amplificados são, então, separados por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante.

A técnica de AFLP apresenta vantagens, tais como a detecção de grande número de bandas informativas por reação, com ampla cobertura do genoma e considerável reprodutibilidade. O polimorfismo gerado por AFLP pode ser usado para estudar parentesco e a diversidade genética dentro e entre populações, para desenvolver marcadores moleculares e para o mapeamento de genes de interesse (VOS et al, 1995).

3.4.2.3 Espectrometria de massas (MS) e Matrix Associated Laser Desorption-Ionization – Time of Flight (MALDI-TOF MS)

Em inglês, MALDI-TOF (*Matrix Associated Laser Desorption-Ionization – Time of Flight*) é uma técnica que aplica a espectrometria de massa para analisar o conteúdo proteico específico de cada espécie de microrganismo.

Nesta técnica o material biológico (colônia) é colocado em uma placa com um ácido orgânico (matriz polimérica) para ser irradiado com um laser de radiação ultravioleta (UV), que resulta em vaporização da amostra e ionização de moléculas que são aspiradas num tubo de vácuo e levadas a um detector. De acordo com a molécula, o tempo de chegada ao detector (*time of flight*) é diferente. Então, é gerado um gráfico com a representação do perfil do espectro de massa dos íons que é específico para cada espécie de microrganismo (Figura 2). Esse perfil é comparado com um Banco de Dados de Espectros de Referência (BDER) e combinado a espectros idênticos ou ao espectro mais relacionado possibilitando a identificação do microrganismo contido na amostra, tudo em um tempo que pode variar de 5 a 15 minutos (CLARK et al, 2013; DINGLE & BUTLER-WU, 2013; POSTERARO et al.; 2013).

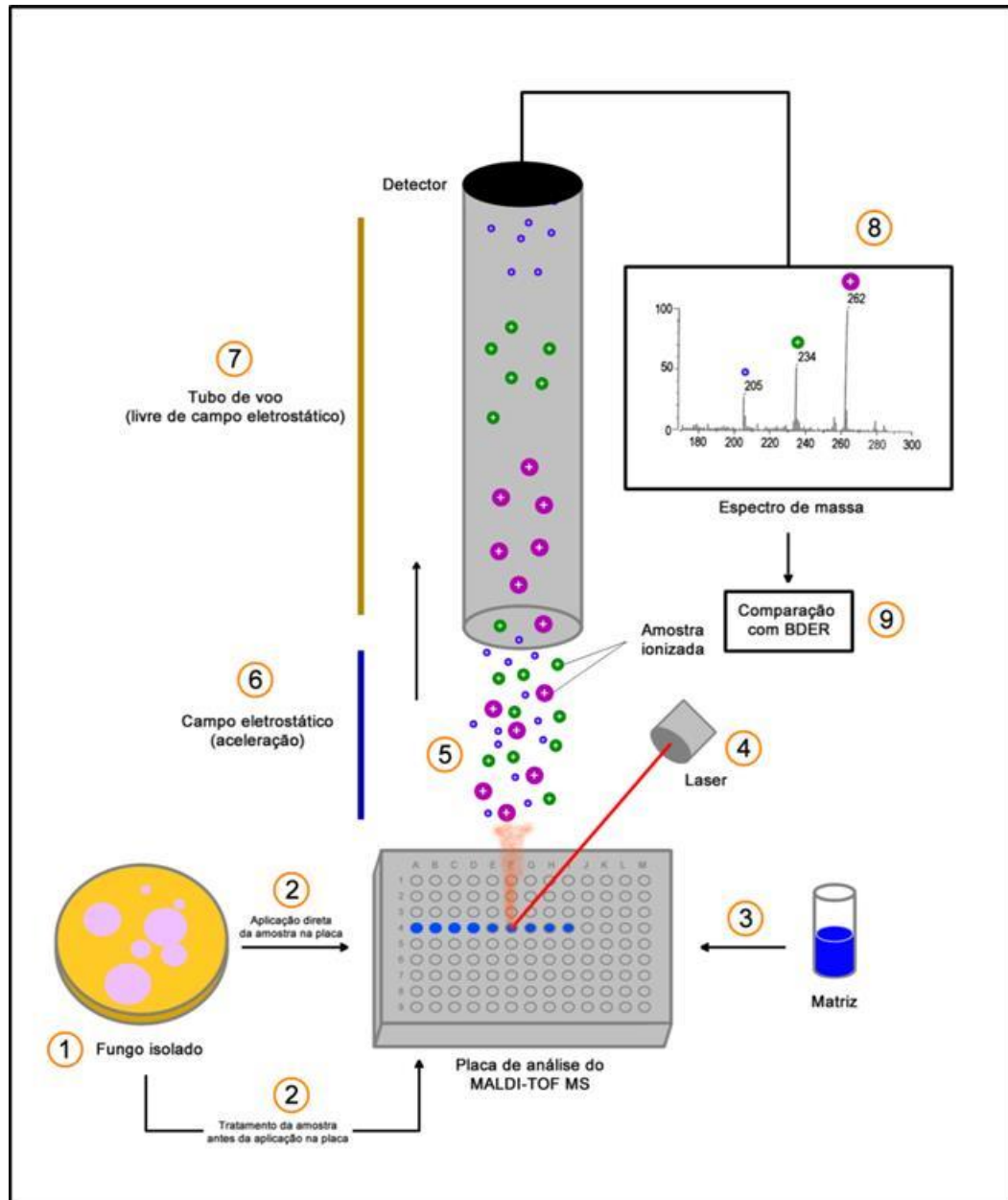


Figura 2 - Modelo esquemático de funcionamento do MALDI-TOF (COSTA, 2015)

Com o aumento do uso da técnica de MALDI-TOF, os bancos de dados proteômicos ficam cada vez mais completos, possibilitando uma melhor identificação dos micro-organismos, porém com a desvantagem desses bancos não serem públicos como os de ácidos nucleicos. Segundo Patel (2013), a utilidade dessa técnica para determinar a suscetibilidade de fungos patogênicos a agentes antifúngicos ainda não foi completamente avaliada.

3.5 Considerações sobre os Antifúngicos e Testes de Susceptibilidade

O achado ocasional de *Candida* sp. em exame colpocitológico de rotina por exemplo, pode induzir o clínico a instituir terapêutica, contudo há controvérsias sobre o tratamento de mulheres colonizadas assintomáticas, pois segundo Sobel (2007), as leveduras poderiam estar em equilíbrio com os demais micro-organismos presentes na microbiota vaginal e, ao iniciar um antifúngico tal equilíbrio seria rompido. Por outro lado, a presença de *Candida* sp. na mucosa vaginal pode ser precursora do desenvolvimento da infecção sintomática frente a qualquer fator de risco associado. A opção pelo tratamento e a escolha da melhor droga, duração e a via de uso deve levar em consideração a sintomatologia de infecção vulvovaginal, além da história ginecológica individual e o histórico de infecções passadas (MOREIRA, 2012).

O principal e maior grupo de antifúngicos comercialmente disponíveis até o presente são os azóis que atuam inibindo diversas enzimas envolvidas na síntese do ergosterol, componente da membrana celular dos fungos. Os primeiros compostos a aparecerem foram os imidazóis (cetoconazol, clotrimazol e miconazol), seguidos dos triazóis de primeira geração, fluconazol e itraconazol e, mais recentemente, a segunda geração de triazóis, o voriconazol e o posaconazol, cada um mais efetivo e com espectro de ação mais amplo que seu antecessor (ZINIT, 2013).

O principal alvo deles é a enzima 1,4- α -desmetilase do citocromo P-450 (Erg11p), que é codificada pelo gene *ERG11* e está envolvida na conversão de lanosterol em ergosterol. Atuando como inibidor competitivo do substrato leva ao esgotamento do ergosterol e ao acúmulo de esteróis precursores, incluindo os esteróis 1,4- α -metilados. Assim resultando em alterações da estrutura e da função membrana plasmática do fungo (PFALLER, 2012).

Tanto o fluconazol, como o voriconazol, apresentam boa biodisponibilidade via oral e possuem baixa incidência de efeitos adversos, sendo o primeiro, o principal antifúngico utilizado de forma oral no tratamento da CVV; é um composto metabolicamente estável, solúvel em água, com fraca ligação às proteínas plasmáticas (ALVES et al, 2010).

A sensibilidade as drogas antifúngicas varia entre as diferentes espécies de *Candida*, de forma que tanto a *C. glabrata* como a *C. krusei* apresentam menor susceptibilidade ao fluconazol, contudo tem-se observado uma alteração do perfil das leveduras em relação a colonização e a infecção, com diminuição de *C. albicans*, em geral mais sensível aos antifúngicos e aumento de *C. glabrata* e *C. krusei*, o que tem tornado mais difícil o controle da infecção. Um dos fatores para essa inversão na ocorrência das espécies de *Candida* é o uso

profilático de antifúngicos, principalmente o fluconazol, em hospitais, nos pacientes com maior risco de desenvolver infecções fúngicas invasivas (BARBEDO & SGARBI, 2010).

Embora a resistência *in vitro* aos antifúngicos ainda seja muito baixa como em pouquíssimos casos, com todo o exposto, a identificação da espécie de *Candida* juntamente com o teste de suscetibilidade aos antifúngicos e a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos mesmos é importante, não só para que o tratamento seja conduzido de maneira segura, correta e eficaz, principalmente nos casos complicados e recorrentes de CVV, como para evitar o aparecimento de cepas resistentes (ZINIT, 2013).

O método mundialmente reconhecido como de referência para antifungograma foi padronizado e recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI (anteriormente *National Committee for Clinical Laboratory Standards* - NCCLS). Em 1992, esse comitê propôs um método de referência (documento M27-P) para a avaliação da susceptibilidade aos antifúngicos em *Candida* sp. e *Cryptococcus neoformans* variedade *neoformans*. O método aprovado (documento M27- A) foi publicado em 1997 e versões atualizadas (documentos M27-A2, - A3, M27-S2, -S3) foram apresentadas entre os anos de 2002 a 2008. Esses métodos descrevem técnicas de macro e microdiluição (CLSI, 2008).

A metodologia, cujo princípio é o de diluição em caldo, também está baseada no cálculo da concentração inibitória mínima (CIM) estimado pela determinação do percentual de inibição em relação a um controle de crescimento, apresenta boa reprodutibilidade, porém, além de ser muito trabalhosa, exige grande habilidade do manipulador devido aos detalhes técnicos e dificuldade de leitura, sendo, portanto, de difícil aplicação rotineira na maioria dos laboratórios (CLSI, 2008).

Alternativamente tem sido sugerido o teste de difusão em disco por ser mais fácil e barato. O critério de leitura e a medida das zonas de inibição do crescimento das leveduras se dá da mesma maneira como é feito para bactérias. Por não utilizar variações de concentração de antifúngicos, esse método não define ponto de corte e os micro-organismos são classificados como sensíveis, dose-dependentes e resistentes (POZZATI, 2007).

3.6 Plantas Medicinais - Caminho para Novos Fármacos

Historicamente os produtos naturais, em especial as plantas são importante fonte para a descoberta de substâncias químicas úteis na síntese de drogas para uso medicinal, muitas vezes com melhor relação custo/benefício e mais eficientes que as sintetizadas, com ação biológica

eficaz, baixa toxicidade e efeitos colaterais (FUZÉR & SOUZA, 2003; SILVA et al, 2012; RODRIGO & LIMA, 2014).

As plantas produzem substâncias biológicas ou componentes orgânicos que são os metabólitos primários, essenciais para o seu crescimento e manutenção da vida, quais sejam os aminoácidos, monossacarídeos, ácidos carboxílicos, dentre outros e os metabólitos secundários que são produtos do metabolismo resultante de mecanismos de adaptação desenvolvidos em seu ciclo evolutivo, onde se inclui uma diversidade de substâncias bioativas de importância relevante nos mecanismos de defesa das plantas contra o ataque de seus predadores.

O interesse médico-científico nos metabólitos ou produtos secundários é grande pois a idéia de que a função protetora, objeto de seu desenvolvimento, à planta possa ser exercida também nos seres humanos como por exemplo a toxicidade contra os micro-organismos. Dessa forma, é incessante a busca por novos medicamentos oriundos de plantas que apresentem baixos ou nenhum efeito tóxico (RODRIGUES & LIMA, 2014).

Embora a flora brasileira possua enorme variedade de espécies, principalmente na floresta Amazônica, muitas delas já utilizadas pela população para fins medicinais, ainda são escassos os estudos científicos acerca do assunto. No entanto, é prioritária a necessidade de se buscar novos agentes antimicrobianos capazes de tratar e combater a resistência dos micro-organismos patogênicos existentes e que possam surgir frente ao uso indiscriminado dos atuais antimicrobianos (LIMA, 2001).

Assim, a exploração dos recursos vegetais pode levar à identificação de metabólitos secundários valiosos que podem servir como drogas ou conduzir ao desenvolvimento de novas substâncias terapêuticas (SILVA et al, 2012).

O conhecimento popular sobre plantas medicinais, tanto em regiões pequenas e pobres quanto em grandes cidades brasileiras, representa, na maioria das vezes, o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. Nesse contexto, as plantas medicinais comercializadas ou dispensadas são facilmente acessíveis em feiras livres, mercados públicos e também em quintais residenciais (SILVA, 2011).

O estudo de plantas orientado pela medicina popular constitui-se um dos caminhos mais utilizados na descoberta de novos agentes terapêuticos, considerando a detecção e a análise de seus princípios ativos. Considera-se como planta medicinal aquela que possui em sua composição, substâncias químicas sintetizadas biologicamente (a partir de nutrientes, água e luz), que possam provocar no organismo humano e animal, efeitos farmacológicos ou reações de cura ou abrandamento de doenças por meio de seus princípios ativos (LIMA, 2001; OMS, 1992).

A Amazônia é detentora de uma imensa biodiversidade e a maior parte encontra-se ainda sem o devido estudo, é sabido que a população local se utiliza indiscutivelmente, independente de comprovação científica, até por conta da geografia peculiar da região, a dificuldade de acesso aos medicamentos convencionais associada a ausência ou precariedade de serviços públicos de saúde em muitas comunidades isoladas da Amazônia. Por isso segundo Duarte (2006) é necessário o investimento de pesquisas dessa biodiversidade tanto pela ótica da variabilidade quanto pela frequência do uso tradicional, e em especial, aquelas de uso tradicional frequente para identificar substâncias ativas eficazes e/ou menos tóxicas de modo a potencializar o uso adequado.

Neste contexto, mesmo o Brasil possuindo uma excepcional biodiversidade, os dados em relação à pesquisa de plantas com atividade antimicrobiana são poucos, e quando comparamos com outros países, como a Suíça que apresenta apenas uma espécie vegetal endêmica, a Alemanha com 16 e ainda o México com 3.376 espécies, estes números tornam-se inexpressivos quando comparados aos 25 a 30 mil espécies endêmicas de ocorrência apenas na Amazônia (MONTEIRO et al, 2009). Portanto frente a este cenário a planta selecionada neste trabalho foi a *Vatairea guianensis*, uma planta nativa da Amazônia.

3.6.1 *Vatairea guianensis*

Planta cujo gênero é exclusivo da faixa neotrópica, maior concentração de variedade situado nas regiões florestais da Amazônia Central (BARROSO et al, 1991). A *Vatairea guianensis* é uma espécie considerada nativa da Amazônia que, particularmente ocorre em toda região banhada pelo Rio Amazonas e seus afluentes, sendo mais comum em áreas de florestas sazonalmente inundáveis como as matas de igapó e várzea, raramente encontrada em terra firme. Conhecida pelos ribeirinhos como fava bolacha, faveiro/a, fava de empigem, fava mutum e angelim do igapó (GRENAND et al, 1987).

Classificada botanicamente na divisão Magnoliophyta (Angiospermae); classe Magnoliatae (Dycotyledonae); sub-classe Rosidae; ordem Rosales; família Leguminosae; subfamília Faboideae; tribo Dalbergieae; gênero *Vatairea* e espécie *Vatairea guianensis* Aubl. (BARROSO et al., 1991).

É uma árvore vistosa de 8 a 25 metros de altura, às vezes com grandes raízes facetadas (sapopemas), casca lisa ou levemente fissurada, cerne castanho-amarelado a escuro. Possui inflorescências em panículas terminais curtas com flores violáceas. As folhas são bipinadas, com 9 a 17 folíolos em cada pina e ligeiramente pubescentes na face inferior. O fruto é do tipo

drupáceo, suborbicular, estreitamente alado na margem ventral, unispermo, de cor verde. A semente seca é descrita como exalbuminada, com superfície externa marrom clara, com casca delgada e quebradiça, odor levemente achocolatado e sabor amargo suave (Figura 3). A retirada da casca revela superfície lisa, de coloração tendendo ao preto (SILVA, 2011).



Figura 3 - *Vatairea guianensis*: Aspectos da árvore (A) e do fruto (B). Imagens cedidas por Cléia Tereza Lamarão da Silva

Informações etnofarmacológicas apontam para o uso medicinal da *Vatairea guianensis* de diversas maneiras, por populações e etnias, sobretudo para problemas dermatológicos, principalmente as infecções fúngicas ou micoses superficiais. Para este fim, na medicina tradicional amazônica utiliza-se o suco do fruto, sendo que a população do médio e baixo Amazonas utiliza as sementes maceradas ou sob a forma de tintura alcoólica além de relatos do uso popular da casca do caule e da raiz no período em que esta espécie não está em fase de frutificação (GRENAND et al, 1987; CORRÊA, 1982).

Pesquisas sobre a constituição química do gênero *Vatairea* reportam o isolamento de antraquinonas que são compostos fenólicos presentes em várias plantas medicinais, caracterizadas quimicamente como substâncias policíclicas, com mais de 20 carbonos. Por não serem bem absorvidas no trato digestivo, as antraquinonas tem sido utilizadas para atuação no intestino e na pele como laxativas, antipsoriáticas, cicatrizantes, antiinflamatória local, além de antissépticas e bactericidas (FERREIRA et al, 2004).

Outros estudos de triagem fitoquímica foram realizados com a *Vatairea guianensis*, tendo sido detectadas várias substâncias químicas, de acordo com a parte da planta avaliada, quais sejam: da casca do caule, além das antraquinonas descritas acima, foram isolados crisofanol, fisciona, emodina, triterpenos (ácido oleanólico) e a lactona do ácido

diidromacaerinico; do cerne foram isolados ácido 9-antronacrisofânico, 9-antronafisciona e 10-antronafisciona; das cascas do fruto foram isoladas duas substâncias com fórmulas moleculares $C_{15}H_{10}O_4$ m/c=254,1 e $C_{16}H_{12}O_4$ m/c=284 ; das sementes de *Vatairea guianensis*, foi detectada a presença de classes bioativas no extrato etanólico do tipo tanino, antocianinas e antocianidinas, flavonóides, xantonas, esteróides, triterpenóides, saponinas e quinonas, bem como a ausência de alcalóides (OTOBELLI et al, 2009 ; FERREIRA et al, 2004).

Poucos são, contudo, os estudos que comprovam as atividades biológicas da *Vatairea guianensis*, dentre eles destaca-se um estudo *in vitro* que comprovou ação antiparasitária de duas substâncias isoladas do extrato hexânico das cascas do fruto dessa espécie sobre a *Leishmania amazonensis* sugerindo o desenvolvimento de novas drogas com atividade leishmanicida (OTOBELLI et al, 2009).

As poucas evidências científicas sobre *V. guianensis* na literatura foi a principal razão para investigar esta espécie do ponto de vista biológico, pois não há relato na literatura do seu uso em infecção por *Candida* sp.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Investigar espécies de *Candida* oriundas de isolados clínicos de coleta vaginal através da caracterização molecular, taxonomia polifásica e descrição dos seus perfis de susceptibilidade a antifúngicos e a extratos obtidos das sementes de *Vatairea guianensis*.

4.2 Específicos

- Descrever o perfil epidemiológico e os fatores de risco das pacientes colonizadas por *Candida* spp em uma Unidade Básica de Saúde na cidade de Manaus;
- Identificar espécies de *Candida* isoladas de amostras clínicas do exsudato vaginal através de métodos morfológicos, cromogênicos e molecular;
- Analisar o perfil de proteínas ribossomais por MALDI-TOF das espécies de *Candida* isoladas de amostras clínicas do exsudato vaginal em uma Unidade Básica de Saúde na cidade de Manaus;
- Avaliar a diversidade genética de *Candida* spp. por marcadores moleculares tipo AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*);
- Determinar e avaliar o perfil de susceptibilidade dos isolados de *Candida* sp. aos antifúngicos convencionais fluconazol, itraconazol, cetoconazol e a nistatina;
- Avaliar a atividade antifúngica comparativamente dos extratos obtidos das sementes de *V. guianensis* nos isolados de *Candida* spp.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Tipo de Estudo

Trata-se de um estudo descritivo observacional, corte transversal, aplicado às mulheres durante o exame clínico ginecológico na consulta de coleta de preventivo.

5.2 Local de Estudo

As amostras foram colhidas no Setor de Coleta de Preventivo da Unidade Básica de Saúde (UBS) de Petrópolis, localizado na Zona Sul, da cidade de Manaus. A parte experimental foi desenvolvida no Laboratório de Genética e Microbiologia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA) junto ao Laboratório de Bioensaios e Micro-organismos da Amazônia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), em colaboração com o Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Micro-organismos do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar- SP).

5.3 Aspectos Éticos

O estudo obedeceu às diretrizes e normas para pesquisas envolvendo seres humanos regulamentados pela resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde. A anuência foi formalizada através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – ANEXO 01), com explicação completa e pormenorizada sobre a natureza do estudo, autorizando sua participação voluntária. Cada participante ficou com uma cópia do TCLE em seu poder, assinada pela mesma e pelo pesquisador responsável. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Estado do Amazonas sob número CAEE 47506215.2.00005016.

5.4 Sujeitos do Estudo

A amostra foi composta por 202 mulheres que por livre demanda foram a UBS de Petrópolis para coleta de colpocitologia oncótica. O calculo amostral foi baseado na população feminina de Manaus com a prevalência de colonização de *Candida* sp. no trato genital feminino. Os critérios para participação do estudo foram:

CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE:

- Pacientes que estivessem no menacme (período de vida reprodutiva entre a menarca e a menopausa);
- Pacientes que já tinham vida sexual ativa;
- Pacientes assintomáticas definida como mulheres que não apresentassem no momento da consulta quadro clínico compatível de vulvovaginite por *Candida* spp.;
- Pacientes que concordaram em participar do estudo.

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO:

- Pacientes portadoras de doenças imunológicas (AIDS, Lupus Eritematoso Sistêmico), diabetes melitus e neoplasias malignas;
- Pacientes virgos;
- Pacientes grávidas;
- Pacientes com história de uso do tratamento antifúngico nos últimos 15 dias.

5.5 Avaliação Clínica e Coleta dos Isolados

As pacientes foram submetidas a uma avaliação clínica com o preenchimento da Ficha Clínica da Mulher formulada pela Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia- FEBRASGO (Anexo 02). As amostras dos exsudatos vaginais foram colhidas através de zaragatoas com haste de madeira estéreis sendo alocadas em dois tubos distintos o primeiro imediatamente imersas em solução salina estéril (NaCl 0,9%) e o segundo em Meio Nutritivo (digestão péptica de tecido animal, extrato de levedura, extrato de carne bovina, cloreto de sódio) em tubos de ensaio estéreis lacrados. O material foi enviado no mesmo dia ao Laboratório de Genética e Microbiologia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA). As amostras colhidas foram levadas à estufa na temperatura de 28 °C por 72 horas e foram semeadas ao meio de cultivo ágar Sabourad (SB) contendo Cloranfenicol (Sigma-Aldrich) (0,15g/mL) e Tetraciclina (200mg/mL), a fim de evitar o crescimento de bactérias.

5.6 Conservação das Cepas Isoladas

Foram utilizados dois métodos de conservação, um em óleo mineral e outro em glicerol 20 %. O óleo mineral foi submetido a esterilização a 121 °C por 30 minutos por dois dias consecutivos. As culturas foram repicadas (triplicata) em tubos (15 cm de comprimento e 2 cm de diâmetro) contendo Ágar Sabouraud, e em seguida essas foram cobertas com uma camada de óleo mineral, e mantidas a temperatura ambiente de laboratório. Já as culturas conservadas em glicerol 20 %, foram crescidas por 48 horas e preparadas suspensões correspondentes as escalas de 5 a 6 de *Mc Farland* em meio de cultura líquido (Sabouraud). Posteriormente, alíquotas de 1 mL de cada suspensão foram transferidas para criotubos os quais continham 200 µL de glicerol na concentração 20 % e congelados sob temperatura de -4°C a -10°C, em congelador (Figura 04).

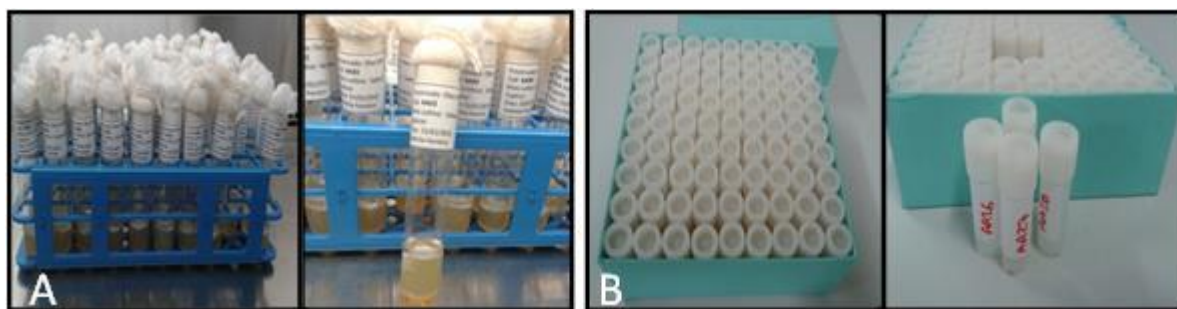


Figura 4 - Métodos de conservação das cepas isoladas (A) Óleo mineral, (B) Glicerol

5.7 Métodos Fenotípicos

5.7.1 Aspectos Macromorfológicos / Crescimento em Ágar Sabourad (SB)

A caracterização macromorfológica das colônias leveduriformes foi realizada através da observação em ágar Sabouraud dextrose. O material coletado em *swabs* da mucosa vaginal foram semeados em placas de Petri contendo ágar Sabouraud 4 % (Acumedia Manufactures, Michigan, USA) acrescido de Cloranfenicol (Sigma-Aldrich) (0,15 mg/mL) e Tetraciclina (200 µg/mL). As amostras foram processadas e incubadas a 28 °C por até 72 horas.

Após o desenvolvimento das colônias foi aplicada a técnica de esgotamento para a obtenção de colônias puras. Com o auxílio de uma alça bacteriológica foi transferida uma colônia para um tubo de vidro contendo meio ágar Sabouraud dextrose e cloranfenicol que após 24 a 48 horas foi avaliado o crescimento das leveduras.

5.7.2 Aspectos Micromorfológicos

Para avaliação dos aspectos micromorfológicos foi realizado o microcultivo em lâmina como descrito por Lacaz (2002). O meio de cultura Agar fubá acrescido de Tween 80, também denominado de Ágar *corn meal*, foi esterilizado a 121 °C por 15 minutos. Foram distribuídos 3 mL do meio ainda líquido em lâminas de microscopia, e após a solidificação as leveduras cultivadas foram semeadas em estrias na lâmina, e recobertas com lamínula estéril. Essa preparação foi mantida de 48 a 72 horas à 30 °C. Após a lâmina pronta foram realizadas leituras microscópicas em 24, 48 e 72 horas para a verificar as estruturas reprodução (filamentação, clamidoconídios).

5.7.3 Crescimento em Meio Cromogênico

Foi utilizado o meio CHROMagar® Candida (CHROMagar, Paris, França) preparado de acordo com as normas do fabricante (4.7 g / 100 mL). Após a solidificação do meio foram feitas até 06 estrias de diferentes amostras identificadas na placa, mantidas por um período de incubação de 48 a 72 horas à 30 °C, e posteriormente foi observada a coloração que as leveduras apresentaram no meio sendo assim feito a identificação presuntiva da espécie. O meio utilizado indica colônias cor verde para *C. albicans*, cor rosa com aparência rugosa para *C. krusei*, cor azul metálico para *C. tropicalis*, cor malva para *C. glabrata* e outras espécies de *Candida* sp. coloração entre branca e malva.

5.7.4 Auxanograma (Assimilação de Carboidratos)

Para a identificação das leveduras utilizando a atividade bioquímica do micro-organismo, foi aplicado o teste de assimilação de carboidrato como descrito por Sidrim e Moreira (1999) também conhecida como técnica de “pour-plate”. Foi utilizado um meio basal destituído de qualquer fonte de carbono o “Yeast Nitrogen Base” (YNB) [sulfato de amônio 5,0 g; fosfato mono potássio 1,0 g; sulfato de magnésio 7H₂O 0,5 g; ágar 20,0 g; água destilada 1000 mL]. O mesmo foi fundido e em seguida, resfriado até uma temperatura de 45-50 °C. Simultaneamente, foi preparada uma suspensão da levedura com turvação equivalente ao tubo número 5 da escala de MCFarland (15 x 10⁶ células/mL) a partir de colônias jovens, com

crescimento de 48 horas em ágar Sabouraud dextrose e cloranfenicol a 30 °C, a qual foi diluída em 2 mL de água destilada estéril. Uma alíquota de 1 mL do inóculo foi adicionada a uma placa de Petri contendo 10 mL de meio Agar YNB. Após a solidificação, pequenas quantidades de cristais dos açúcares glicose, lactose, sacarose, galactose, maltose, dextrose e rafinose foram adicionadas em posições previamente marcadas na superfície do “*pour-plate*”. As placas foram deixadas em temperatura ambiente de laboratório por 24 a 96 horas. As leituras das placas foram realizadas de acordo com a assimilação dos açúcares a cada 24 horas. As mesmas foram observadas quanto à turbidez na placa ou formação de um halo ao redor do açúcar desenvolvido pela assimilação específica de cada levedura identificando presuntivamente a espécie.

5.8 Identificação Taxonômica Molecular

5.8.1 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada via kit, ZR Fungal/Bacterial DNA MicroPrep™ Catalog No. D6007, conforme o seguinte protocolo com modificações. Foi adicionado 200 mg (peso úmido) de células leveduriformes para o tubo de *Lise ZR BashingBead*™, contendo 200 µl de tampão isotônico, e adicionado 750 µl de solução de lise. Este foi levado ao vortex em velocidade máxima por 5 minutos. Após a agitação, a amostra foi centrifugada a 12.000 g durante 2 minutos. Posteriormente, foi transferido 400 µl do sobrenadante para um tubo filtro *Zymo-Spin*™ *IV Spin*, centrifugado a 5.000 g durante 2 minutos (foi destacado a base para usar o filtro de *Spin*™ *IV Zymo-Spin*). Foi adicionado ao tubo filtro 1.200 µl tampão *binding bacteria/fungos* DNA para posteriormente, ser transferido 800 µl da mistura para uma coluna de IC *Zymo-Spin*™ em um tubo coletor e centrifugado a 14.000 g por 2 minutos, em seguida foi descartado o filtrado do tubo coletor, e realizado o processo novamente com os 800 µl da mistura restante. Foram adicionados 200 µl de tampão de pré-lavagem de DNA à coluna de IC *Zymo-Spin*™, em um novo tubo coletor e centrifugado a 8.000 g por 2 minutos. Posteriormente, foi adicionado 500 µl de tampão de lavagem de DNA de bactérias/ fungos para a coluna de IC *Zymo-Spin*™ e centrifugado a 8.000 g por 2 minutos. Foi transferido da coluna de IC *Zymo-Spin*™ para um microtubo limpo de 1,5 mL e adicionado 50 µl de tampão de eluição de DNA diretamente à coluna matriz. Esperou-se 2-3 minutos e em seguida centrifugou-se a 8.000 g durante 30 segundos para eluir o DNA.

5.8.2 Quantificação do DNA

A Quantificação de DNA foi realizada por NanoDrop (2000 C THERMO SCIENTIFIC). As concentrações e purezas de DNA foram estimadas através de análise espectrofotométrica em comprimento de onda ultravioleta ($A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$), como preconizado por Sambrook, et al. (1989). A leitura espectrofotométrica em 260nm foi usada para determinar a concentração de DNA ($1\text{OD} = 50\mu\text{g}$ de DNA dupla fita/ μL), enquanto a razão entre as absorbâncias de 260nm e 280nm foi usada para avaliar a pureza do ácido nucleico. Foram utilizadas extrações de DNA que apresentaram um grau de pureza igual ou maior a 1,6 e igual ou menor a 1,8.

5.8.3 Amplificação por PCR

As reações de amplificação foram realizadas nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C , por 4 minutos, seguido de 40 ciclos de 2 minutos de desnaturação a 94°C , 2 minutos de anelamento a 55°C e 2 minutos de elongação a 72°C e finalizando com 10 minutos a 72°C . O produto da PCR foi conferido por eletroforese em gel agarose a 1,5%, corado com solução de gel red, comparado com DNA MARCADOR (DNA ladder) de 300 pb e estimado o peso molecular, para amplificação das regiões *Its* do rDNA com os oligonucleotídeos iniciadores *Its1* e *Its2*. ($5'$ - TTCCGTAGGTGAACCTGCGG $-3'$) e ($5'$ - TCCTCCGCTTATTGATATGC $-3'$), (WHITE e col., 1990). A reação de amplificação de PCR foi realizada conforme o protocolo descrito na Tabela 1, com o volume final de 25 μL .

Tabela 1 - Cálculo da reação de amplificação do PCR para as amostras fúngicas

Reagentes	Reação (5 μL)	Concentração
Tampão 5X	5 μL	1X
MgCl ₂ 25mM	1,5 μL	2,5 mM
DNTPs 2,5 mM	1 μL	2,5 mM
Primer F 5pmoles/ μL	1,0 μL	0,2 μL
Primer R 5pmoles/ μL	1,0 μL	0,2 μL
DNA10ng/ μL	5,0 μL	---
Taq 5U/ μL	0,3 μL	--
Água miliQ	77 μL	---
		--
Total	25,0 μL	

5.8.4 Purificação da PCR por ExoSAP

A purificação da reação de PCR foi realizada através de enzimas Exonuclease 1 e Fosfatase Alcalina de Camarão. Foram utilizadas para limpar a reação de PCR de restos de iniciadores (*primers*) que foram incorporados ao DNA durante a reação da PCR. Essa reação de limpeza teve como volume final 28 µL para cada amostra: 20 µL da amostra e adicionado mais 8 µL de ExoSAP (para cada 5 µL da amostra, colocou-se 2 µL de ExoSAP). A reação ocorreu nas seguintes condições: incubação a 37 °C por 15 minutos e a inativação da ExoSAP a 80 °C por 15 minutos. A reação de sequenciamento se deu com 8 µL do Mix (*Primers*, H₂O e BigDye) adicionados a 2 µL de DNA.

5.8.5 Sequenciamento e Análise Molecular

Com o intuito de verificar a qualidade geral do sequenciamento, foi utilizado o programa Chromas 2.24 (Technelysium Ltd), que mostra de maneira gráfica a incorporação de cada base de DNA presente na sequência nucleotídica.

As sequências de nucleotídeos obtidas dos isolados foram submetidas à pesquisa no BLASTn do NCBI (National Center for Biotechnology Information – www.ncbi.nlm.nih.gov), para análise de similaridade com o banco de dados. Em seguida, as sequências que apresentaram os dez melhores valores de similaridade (scores) foram selecionadas e alinhadas utilizando o programa ClustalW (THOMPSON e col., 1994). Para a construção das árvores filogenéticas, foi utilizado o método de máxima verossimilhança, implementado no programa IQ-TREE (TRIFINOPOULOS e col., 2016). A similaridade das sequências de nucleotídeos entre os isolados foi calculada pelo programa DNASTAR (LASERGENE, 1994).

5.9 Método Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time Of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)

A identificação das leveduras pelo método de MALDI-TOF MS foi realizada a partir de colônias de *Candida* spp. com até 48 horas de crescimento, pelo sistema MALDI *Biotyper Autoflex Speed* (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Sobre os poços da placa alvo foi transferido diretamente, utilizando um palito de ponta fina estéril, uma pequena quantidade de células fúngicas retirada da colônia pura, e em seguida foram adicionadas alíquotas de 0,5µL de ácido fórmico 25% e misturados suavemente com as leveduras. Após a evaporação do meio

líquido foi adicionada 0,5µL da solução matrix CHCA constituída por uma solução ácida de mistura de solventes orgânicos (Acetonitrila 500 µL; ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico 20 mg/mL; Água miliq 500 µL; Ácido trifluoroacético (AFA) 25 µL solubilizados em aparelho ultra-sônico à 45°C). Em ordem para avaliar a qualidade e a reprodutibilidade do espectral de dados, cada isolado de levedura foi analisado em quintuplicata em dois momentos distintos.

As amostras fungicas foram secas ao ar, e durante esse processo todas as moléculas ficaram embebidas na matriz, e, em seguida, a placa (matriz polimérica) foi posicionada no espectrómetro de massa para medição automatizada. Um espectro de massa foi definido e obtido, abrangendo normalmente os picos de 2000 a 20000 Da intervalo m/z. Os espectros brutos a partir das amostras foram subsequentemente comparados com um banco de dados de espectros de referência e combinado a espectros idênticos ou ao espectro mais relacionado contido na base de dados através do programa software Biotyper, culminando assim na identificação da levedura contida na amostra.

5.10 Análise de variabilidade genética por AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*)

Os marcadores gerados pela técnica de AFLP associam o polimorfismo gerado por enzimas de restrição com a capacidade de detecção da técnica de PCR. O primeiro passo para uma boa qualidade deste marcador é ter um DNA de ótima qualidade.

A análise de AFLP consistiu essencialmente de 4 etapas:

- 1º etapa (Digestão): o DNA genômico total fúngico foi clivado com duas enzimas de restrição (EcoR1 e MSE I);
- 2º etapa (Ligação dos adaptadores): adaptadores específicos foram ligados aos terminais dos fragmentos gerados pela clivagem;
- 3º etapa (Pré-Amplificação): uma fração dos fragmentos genômicos, gerados pela clivagem, foi amplificado seletivamente via PCR utilizando primers especificamente desenhados para reconhecer sequências nos adaptadores;
- 4º etapa (Amplificação): a subpopulação de fragmentos amplificados foi separada em gel de alta resolução.

Após a amplificação final, foram adicionados 6 µL da solução-tampão de carregamento (formamida deionizada, 0,025 % de xilenocianol e 0,025 % de azul de bromofenol) e 4 µL da amostra de amplificação, e foi procedida a desnaturação das amostras a 95° C, por 5 min. Os fragmentos foram separados em gel de sequenciamento (poliacrilamida 6%), em uma corrida a

2000 V, 100 Ma 50 W durante 140 minutos. Os fragmentos amplificados foram visualizados após coloração do gel com Nitrato de Prata (AgNO_3), de acordo com o protocolo descrito por Creste et al (2001). Os tamanhos dos alelos foram estimados em comparação visual com o marcador de peso molecular de DNA de 100 pb.

5.10.1 Preparação das amostras:

Após as amostras serem extraídas e quantificadas a 10 ng/ μl , foi feito as reações das 4 etapas para obtenção das amostras amplificadas com 4 primers diferentes, para submetê-las a eletroforese vertical.

1º Etapa - Digestão

Reagentes	N. Amostras	N. Amostras
Marcar	1X	76
ÁGUA	23,5	1786
BSA (100X)	0,5	38
OPA 10X	5	380
Enzima MSE I (5U)	0,5	38
Enzima ECO RI (12U)	0,5	38
DNA (200ng/20 μL)	20	1520
Vol. final	50	3800
Vol. s/ DNA	30	2280

- 1- Em um isopor com gelo, foi preparado o mix de todos os reagentes acima, com exceção da amostra de DNA no microtubo de 1,5 mL;
- 2- Foi distribuído 30 μl do mix nos microtubos, de 0,2mL das amostras para a digestão, mais 20 μL de DNA junto ao tubo com o mix;
- 3- Em seguida foi colocado as amostras no termociclador e submetido ao programa da Digestão:

Ciclos	Etapas	Temperatura (°C)	Tempo	Programa
1	Digestão	37	3h	Digestão
	Inativação	da		
1	Enzima	70	15 min.	
1	Hold	4	indeterminado	

2º Etapa- Ligação dos Adaptadores

	Reagentes	N. Amostras	N. Amostras
Marcar		1X	76
	ÁGUA	6,67	506.92
	Adap. ECO RI	1	76
	Adap. MSE I	1	76
	10X Buffer Ligase	1	76
	T4 DNA Ligase (1U/μL)	0,33	25.08
	Vol. Final	10	760
	Conf. Vol.	10	760

- 1- Em um isopor com gelo, foi preparado o mix com todos os reagentes acima no microtubo de 0,6 mL;
- 2- Colocamos 10μl do mix em cada microtubo da amostra;
- 3- Em seguida foi colocado as amostras no termociclador e submetido ao programa da Adaptado:

Ciclos	Etapas	Tempetatura (°C)	Tempo	Programa
	Ligação dos			
1	Adaptadores	23°	3h	
1	Hold	4	indeterminado	ADAPTADO

3º Etapa - Pré-Amplificação

	Reagentes	N. Amostras	N. Amostras
Marcar		1X	76
	ÁGUA	5,2	395,2
	10X Buffer	1	76
	MgCl ₂ (25mM)	0,6	45,6
	DNTP (2,5mM)	0,4	30,4
	Primmer ECO RI+1 (25ng/μL)	0,5	38
	Primmer MSE I + 1 (25ng/μL)	0,5	38
	Taq (5U/μL)	0,3	22,8
	DNA Ligado	1,5	114
	Vol. final	10	760
	Vol. s/DNA	8,5	646

- 1- Em um isopor com gelo, foi preparado o mix com todos os reagentes acima, com exceção da amostra de DNA;
- 2- Distribuímos 8,5μl do mix nos microtubos de 0,2mL das amostras;
- 3- Colocamos 1,5μl de DNA Ligado em cada tubo contendo o mix;
- 4- Em seguida foi colocado as amostras no termociclador e submetido ao programa da Pré-Amplificação;
- 5- Após a pré-amplificação foi acrescentado 40μl de água milliq.

Ciclos	Etapas	Tempetatura (°C)	Tempo	Programa
26	Desnaturação Inicial	94	2 min.	Pré-Amplificação
26	Desnaturação	92	1 min.	
26	Anelamento	56	1 min.	
26	Extensão	72	1 min.	
1	Final da Extensão	72	5min.	
	Hold	4	indeterminado	

4º Etapa – Amplificação

a) Primer ecoAG(1)

Reagentes	N. Amostras	N. Amostras
	1X	76
ÁGUA	2,5	190
10X Buffer B	2	152
MgCl ₂ (25mM)	1,2	91,2
DNTP (10mM)	0,4	30,4
Primmer ECO RI+(AG) (25ng/μL)	1	76
Primmer MSE I + (C) (25ng/μL)	1,2	91,2
Taq (5U/μL)	0,2	15,2
DNA pré-amplificado	1,5	114
Vol. Final	10	760
Vol. s/DNA	8,5	646

- 1- Em um isopor com gelo, foi preparado o mix com todos os reagentes acima, com exceção da amostra de DNA;
- 2- Foi distribuído 8,5μl do mix nos microtubos de 0,2 mL das amostras;
- 3- Foi adicionado 1,5μl de amostra pré-amplificada em cada tubo contendo o mix;
- 4- Em seguida foi colocada as amostras no termociclador e submetido ao programa da Amplificação:

Ciclos	Etapas	Tempetatura (°C)	Tempo	Programa
1	Desnaturação Inicial	94	2 min.	Amplificação
12	Desnaturação	94	30 seg.	
12	Anelamento	65	30 seg.	
12	Extensão	72	1 min.	
23	Final da Extensão	94	30 seg.	
23	Anelamento	56	30 seg.	
23	Extensão	72	1 min.	
1	Final da Extensão	72	2 min.	
	Hold	4	indeterminado	

Observação: foi estocado à -20°C

b) Primer ecoAT (2)

Reagentes	N. Amostras	N. Amostras
	1X	76
ÁGUA	2,5	190
10X Buffer	2	152
MgCl ₂ (25mM)	1,2	91,2
DNTP (10mM)	0,4	30,4
Primmer ECO RI+(AT) (25ng/μL)	1	76
Primmer MSE I + (C) (25ng/μL)	1,2	91,2
Taq (5U/μL)	0,2	15,2
DNA pré-amplificado	1,5	114
Vol. Final	10	760
Vol. s/DNA	8,5	646

- 1- Em um isopor com gelo, foi preparado o mix com todos os reagentes acima, menos a amostra pré-amplificada no microtubo de 1,5 mL;
- 2- Foi distribuído 8,5 μl do mix nos microtubos de 0,2 mL das amostras;
- 3- Foi colocado 1,5 μl de amostra pré-amplificada em cada tubo contendo o mix;
- 4- Em seguida foi colocado as amostras no termociclador e submetido ao programa da Amplificação.

c) Primer ecoTA(3)

Reagentes	N. Amostras	N. Amostras
	1X	
ÁGUA	2,5	190
10X Buffer	2	152
MgCl ₂ (25mM)	1,2	91,2
DNTP (10mM)	0,4	30,4
Primmer ECO RI+(TA) (25ng/μL)	1	76
Primmer MSE I + (C) (25ng/μL)	1,2	91,2
Taq (5U/μL)	0,2	15,2
DNA pré-amplificado	1,5	114
Vol. Final	10	760
Vol. s/DNA	8,5	646

- 1- Em um isopor com gelo, foi preparado o mix com todos os reagentes acima, menos a amostra pré-amplificada no microtubo de 1,5 mL;
- 2- Foi distribuído 8,5μl do mix nos microtubos de 0,2 mL das amostras;
- 3- Foi colocado 1,5μl de amostra pré-amplificada em cada tubo contendo o mix;
- 4- Em seguida foi colocada as amostras no termociclador e submetido ao programa da Amplificação.

d) Primer ecoTC(4)

Reagentes	N. Amostras	N. Amostras
	1X	
ÁGUA	2,5	190
10X Buffer	2	152
MgCl ₂ (25mM)	1,2	91,2
DNTP (10mM)	0,4	30,4
Primmer ECO RI+(TC) (25ng/μL)	1	76
Primmer MSE I + (C) (25ng/μL)	1,2	91,2
Taq (5U/μL)	0,2	15,2
DNA pré-amplificado	1,5	114
Vol. Final	10	760
Vol. s/DNA	8,5	646

- 1- Em um isopor com gelo, foi preparado o mix com todos os reagentes acima, menos a amostra pré-amplificada no microtubo de 1,5 mL;
- 2- Distribuiu-se 8,5 μl do mix nos microtubos de 0,2 mL das amostras;
- 3- Colocau-se 1,5 μl de amostra pré-amplificada em cada tubo contendo o mix;
- 4- Em seguida colocou-se as amostras no termociclador e foram submetidas ao programa da Amplificação.

5.10.2 Análise do Produto da AFLP

Os produtos do AFLP foram designados como “1” para presença e “0” para ausência de bandas. Somente as bandas que apresentaram constância e nitidez nos géis foram analisadas, e com base nos dados obtidos da leitura dos géis foi construída uma matriz binária.

A partir da matriz original gerada com os dados de presença e ausência de marcadores em locos polimórficos, foi estimada a distância euclidiana entre os indivíduos. Com base no quadrado da distância euclidiana, foram calculadas as estimativas da variabilidade genética entre regiões, entre populações dentro de regiões e dentro de populações através da análise molecular da variância (AMOVA). O valor F_{st} , que representa a distância genética entre duas populações, foi utilizado para comparar a variação genética entre as sete populações avaliadas. Para testar a significância dos resultados da AMOVA, foi utilizado o método não paramétrico de permutações (EXCOFFIER et al, 1992).

A similaridade entre os indivíduos foi estimada segundo o coeficiente de Jaccard (Bonin et al, 2007) através da fórmula $S_{ij} = a/(a+b+c)$. Com base nos coeficientes de similaridade, foi construído um dendrograma, adotando como critério de agrupamento o método UPGMA (Un

weighted Pair-Group Method of Arithmetic Averages) (Dias, 1998). Foi estimado o coeficiente de correlação cofenética entre a matriz de similaridade e o dendrograma ao qual foi obtido, as análises foram realizadas com o auxílio do programa NTSYSpc versão 2.01 (Rohlf, 2001).

5.11 Análise Estatística

Os dados foram apresentados por meio de gráficos e tabelas, onde se calculou as frequências absolutas simples e relativas para os dados categóricos. Sendo que na inferência da prevalência de cândida ainda foi calculado o respectivo Intervalo de Confiança ao nível de 95 % (IC95%). Na análise da idade, como foi rejeitada a hipótese de normalidade por meio do teste de Shapiro-Wilk, foi calculada a mediana. Na análise dos dados categorizados foi calculado o Odds Ratio (OR) e aplicado o teste do qui-quadrado com correção de Yates (VIEIRA, 2004). Na análise dos diferentes métodos diagnósticos ainda foram calculados a sensibilidade, especificidade e seus respectivos Intervalos de Confiança ao nível de 95 % (IC95%).

O software utilizado na análise dos dados foi o programa Epi Info versão 7.2 para windows e o nível de significância fixado nos testes estatísticos foi de 5 %.

5.12 Avaliação biológica com extratos de *Vatairea guianensis*

5.12.1 Coleta e obtenção do material botânico

Foi coletado 4 Kg do material botânico (frutos) de *V. guianensis*, na região do Lago do Paru (60° 32' W; 3° 17' S) e no Lago do Calado (60° 34' W; 3° 16' S), situados aproximadamente a 70 km da cidade de Manaus no município de Manacapuru-AM (Figura 05). Após a obtenção do material, foram confeccionadas exsiccatas do material vegetal que foram identificadas por comparação pelo botânico Eduardo Ossamu Nagao e depositadas no Herbário da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, sob o registro nº 1916.



Figura 5: Semente e fruto de *Vatairea guianensis*.

5.12.2 Preparação do material vegetal e obtenção dos extratos

Os frutos de *V. guianensis* foram coletados em seu habitat natural e retirada as sementes, sendo posteriormente lavadas em água corrente e borrifadas com álcool a 70 %. Em seguida, o material vegetal foi seco em estufa com circulação de ar (Deleo, tipo A6 sefaf) em temperatura de 50 °C durante 3 dias consecutivos para total retirada de umidade, e submetidas à moagem em moinho de quatro facas (Modelo Willey) resultando em um pó de coloração escura (Figura 6). Assim todo material vegetal foi pulverizado e pesado.



Figura 6 - Material pós- moagem da semente de *Vatairea guianensis*.

O mesmo foi submetido à extração por maceração com solventes grau HPLC em ordem crescente de polaridade (hexano, acetato de etila e metanol), sendo utilizado 1 litro de solvente em cada etapa da extração, com remoção em intervalo de 3 dias. Logo para cada solvente foi realizada três extrações em modo estático com uma leve agitação manual durante 03 minutos, a cada 12 horas, totalizando 28 dias. O material remanescente foi desprezado.

Após 72 horas de cada extração, o solvente era separado do material vegetal com o auxílio de um funil simples e papel de filtro. Posteriormente, o solvente foi concentrado sob pressão reduzida utilizando evaporador rotatório Fisatam (modelo 801, série 1303621), utilizando de 60 a 80 rpm (rotação por minuto). Obedecendo a temperatura de ebulição de cada solvente utilizado (hexano 68 °C, acetato de etila 77,1 °C e metanol 64,7 °C). Para concentrar o material foi utilizado um balão de fundo redondo de 1litro, no qual foi acrescentado apenas 500 mL do solvente filtrado de cada vez. Em seguida, o solvente restante foi colocado em frascos pesados e levados para secar em dessecador.

Após completa secagem foi calculado o rendimento de cada extrato e, em seguida, 2 mg dos extratos foram encaminhados para a realização dos testes biológicos. O material obtido apresentou-se em forma de pasta mole de coloração escura. Essas etapas foram realizadas no Laboratório de Química Orgânica da Universidade Federal do Amazonas-UFAM.

5.12.3 Ensaio das Atividades Antimicrobiana das Cepas de *Candida* sp.

As leveduras foram reativadas em Ágar Sabouraud dextrose, e mantidas a 36 °C por 24 horas. Após reativação dos patógenos, uma colônia isolada foi transferida para um tubo de ensaio contendo 5 mL de caldo SB mantidos a 36 °C, por 24 horas, a concentração utilizada no presente estudo foi correspondente ao número 6 na escala de Mc Farland.

Os antifúngicos testados foram Cetoconazol (Pharma Nostra, Brasil), Itraconazol (Fragon), Fluconazol (Pfizer, Madrid, Spain) e Nistatina (Pharma Nostra, Brasil) de acordo com a norma pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008), onde foram avaliados segundo o perfil de suscetibilidade, de acordo com a Tabela 02.

Tabela 2 - Critérios de leitura, segundo CLSI (2008), para a avaliação da sensibilidade para os antifúngicos Cetoconazol, Fluconazol, Itraconazol e Nistatina

Antifúngico	Sensível	S-DD= Sensível Dose-dependente	Resistente	Concentração Plasmática
Cetoconazol	≤ 4,0 µg/mL	8,0-16 µg/mL	≥32,0 µg/mL	3 – 4,5 µg/mL
Fluconazol	≤ 8,0 µg/mL	16 - 32 µg/mL	≤64,0 µg/mL	4,0 - 8,0 µg/mL
Itraconazol	≤0.125 µg/mL	0,25 – 0,5µg/mL	≥1,0 µg/mL	1,0 – 2,3 µg/mL
Nistatina	≤ 4,0 µg/mL	8,0 - 32 µg/mL	≥64,0 µg/mL	2,0 – 3,0 µg/mL

5.12.3.1 Teste de Sensibilidade

Os antibióticos foram preparados a uma concentração de 10 mg/mL (solução mãe) e posteriormente foram diluídos nas concentrações respectivas de cada antibiótico listados na tabela abaixo:

Tabela 3 - Descrição dos antifúngicos nas concentrações da solução e de sensibilidade

Antifúngico	Concentração da solução	Concentração de sensibilidade
Itraconazol	0,003 mg/mL = 0,30 µg/mL	0,0015 mg/mL = 0,15 µg/mL
Nistatina	0,004 mg/mL = 4 µg/mL	0,002 mg/mL = 2 µg/mL
Cetoconazol	0,008 mg/mL = 8 µg/mL	0,004 mg/mL = 4 µg/mL
Fluconazol	0,016 mg/mL = 16 µg/mL	0,008 mg/mL = 8 µg/mL

Os extratos foram pesados e solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) a 10 % mais água destilada autoclavada 90 % (solução mãe) e depois diluídas concentração de 16 µg/mL, 8 µg/mL, 4 µg/mL e 0,30 µg/mL, de acordo com as concentrações de sensibilidade dos antifúngicos testados, indicadas por CLSI (2008) sendo Itraconazol (C= 0,15 µg/mL), Nistatina (C= 2 µg/mL), Cetoconazol (C= 4 µg/mL) e Fluconazol (C= 8 µg/mL).

5.12.3.1.1 Preparo dos controles

O controle positivo foi realizado acrescentando 100 µL de meio Sabourad (SB) dobrado e 100 µL de extrato contra a cepa controle *Candida albicans* (CFAM 1342) disponibilizada pela Coleção de Fungos da Amazônia (CFAM) do Instituto de Pesquisas Leônidas e Maria Deane da Fundação Oswaldo Cruz/Amazonas (FIOCRUZ/AM). O controle negativo foi realizado com a substituição dos extratos por água destilada esterilizada.

5.12.3.3.1.2 Determinação da atividade antimicrobiana – Ensaio em Placas de Microdiluição

A avaliação da atividade antifúngica dos extratos hidroetanólico (EXTRATO 01), hexânico (EXTRATO 02) e metanólico (EXTRATO 03) de *Vatairea guianensis* foi feita pela técnica de microdiluição em caldo preconizado pelo *Clinical and laboratory Standards for*

Clinical Laboratory Standards (CLSI,2008) e a avaliação da dosagem inibitória mínima (MID), quando apresentaram atividade fungicida ou fungistática determinando a menor concentração de cada extrato bruto capaz de inibir o crescimento dos micro-organismos indicadores.

Os ensaios para determinação da atividade antimicrobiana foram realizados em placas de ELISA, na qual foram adicionadas 100 μ L do meio de cultura SB, cuja concentração estava dobrada, 100 μ L do extrato na maior concentração dentre os antibióticos respectivas dos antibióticos (16 μ g/mL) e 10 μ L da suspensão de células do patógeno testado, de acordo com a metodologia descrita por Souza, 2006. A temperatura de incubação do teste foi de 35 °C por 24 horas.



Figura 7 - Ensaio quantitativo para determinação da atividade antimicrobiana

A quantidade de 100 μ L de amostra preparada foi introduzida em triplicata nos primeiros poços correspondentes a A1, A2 e A3 da placa de Elisa e assim sucessivamente.

Tabela 4 - Esquema das amostras nos poços na placa de Elisa

Concentração	
A ○○○	0,008 mg/mL = 8 μ g/mL

No dia seguinte foi adicionado 10 μ L do revelador NBT (Nitrozul de Tetrazólio) a 1% nos poços com inóculo. Quando houve crescimento microbiano, o revelador NBT transformou a solução para a cor rosa.

Esse ensaio biológico foi realizado novamente, porém com as amostras que apresentaram atividades fungicida ou fungistático através de diluições sucessivas (MID) para a determinação da dosagem mínima inibitória.

Tabela 5 - Esquema das amostras nos poços na placa de Elisa para a determinação da dosagem inibitória mínima (MID)

Poços	Concentração
A ○○○	0,008 mg/mL = 8 µg/mL
B ○○○	0,004 mg/mL = 4 µg/mL
C ○○○	0,002 mg/mL = 2 µg/mL
D ○○○	0,00015 mg/mL = 0,15 µ g/mL

5.12.3.2 Teste de Resistência

Os antibióticos foram preparados a uma concentração de 10 mg/mL (solução mãe) e posteriormente foram diluídos nas concentrações respectivas de cada antibiótico listados abaixo na Tabela 6:

Tabela 6 - Descrição dos antifúngicos nas concentrações da solução e de resistência

Antibiótico	Concentração da solução	Concentração de resistência
Itraconazol	0,002mg/mL = 2 µg/mL	0,001mg/mL = 1 µ g/mL
Nistatina	0,064 mg/mL = 64 µ g/mL	0,032 mg/mL = 32 µ g/mL
Cetoconazol	0,064 mg/mL = 64 µ g/mL	0,032 mg/mL = 32 µ g/mL
Fluconazol	0,128 mg/mL = 128 µ g/mL	0,064 mg/mL = 64 µ g/mL

5.12.3.2.1Preparo das amostras

Os antibióticos foram diluídos nas concentrações dobradas (Itraconazol C= 2 µg/mL , Nistatina C= 64 µg/mL, Cetoconazol C= 64 µg/mL e Fluconazol C= 128 µg/mL) e os extratos foram pesados e solubilizados em 10 % de dimetilsulfóxido (DMSO) e 90 % de água destilada autoclavada (solução mãe) e depois as amostras foram diluídas na maior concentração dentre os antibióticos testados (concentração dobradas: 128 µg/mL).

5.12.3.2.2 Preparo dos controles

O controle positivo foi realizado acrescentando 100 µL de meio SB dobrado e 100 µL de extrato contra a cepa controle *Candida albicans* (CC 001) da coleção Cefar Diagnóstica (CCCD). O controle negativo foi realizado com a substituição dos extratos por água destilada estéril.

5.12.3.2.3 Determinação da atividade antimicrobiana – Ensaio em Placas de Microdiluição

Os ensaios para determinação da atividade antimicrobiana foram realizados em placas de Elisa, na qual foram adicionadas 100 µL do meio de cultura SB, cuja concentração estava dobrada, 100 µL do extrato na maior concentração dentre os antibióticos (128 µg/mL) e 10 µL da suspensão de células do patógeno testado, de acordo com a metodologia descrita por Souza, (2009).

A quantidade de 100 µL de amostra preparada foi introduzida em triplicata nos primeiros poços correspondentes a A1, A2 e A3 da placa de Elisa e assim sucessivamente.

Tabela 7 - Esquema das amostras nos poços na placa de Elisa

Poços	Concentração
A ○○○	0,064 mg/mL = 64µg/mL

No dia seguinte foi colocado 10 µL do revelador NBT (nitroazul de tetrazólio) a 1% nos poços com inóculo. Quando houve crescimento microbiano, o revelador NBT transformou a solução para a cor azul.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Caracterização das Amostras e Fatores de Risco

6.1.1 Isolados clínicos

Neste trabalho foram coletadas 202 amostras biológicas de exsudatos vaginais de pacientes assintomáticas, ou seja, não apresentavam queixa clínica ou achados no exame físico compatível com CVV. Destas, 37,1 % (N=75) foi possível isolar leveduras do gênero *Candida* (Figura 8).

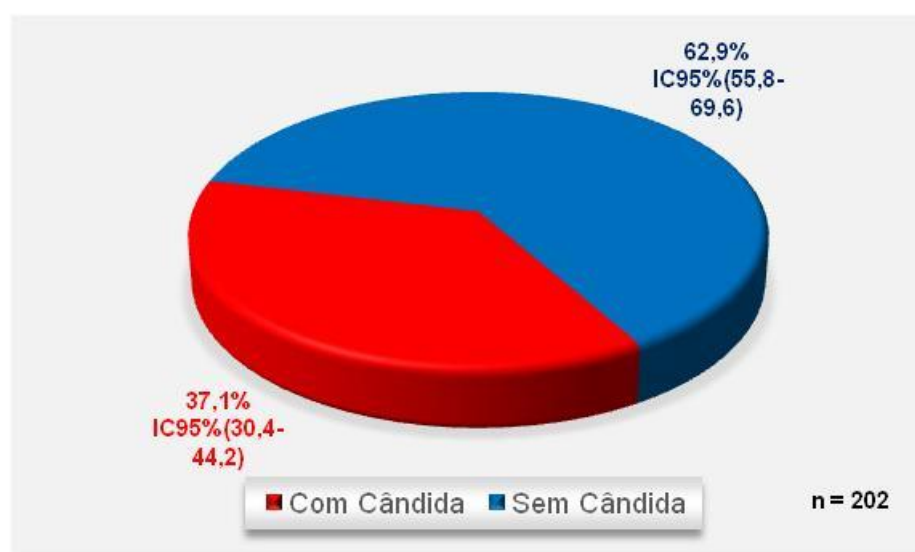


Figura 8 - Distribuição segundo a prevalência de colonização de *Candida* spp. em isolados de exsudato vaginal nas mulheres amostradas, Manaus - AM

Zisova et al. (2016) estudando mulheres grávidas no primeiro trimestre encontrou 20% de taxa de colonização assintomática, apesar da gravidez configurar importante fator de risco. Os resultados de Rosa & Rumel (2004) indicam a prevalência de 19,3 % de *Candida* spp. na mucosa vaginal em mulheres sem queixas clínicas. Segundo estudo realizado por Camargo et al. (2008) de 88 amostras coletadas em pacientes assintomáticas 18,18 % (N= 16) foram positivas para *Candida* spp. Correa et al. (2009) identificou *Candida* spp em 8% de mulheres assintomáticas. Em estudo desenvolvido por Gunther et al. (2014), em 669 pacientes assintomáticas, foi encontrado 11,8 % (N=79) de positividade para *Candida* spp.

Nesta pesquisa a prevalência encontrada foi bem superior às encontradas em outros estudos possivelmente devido a forma de plaqueamento, pois quando foram coletados seguindo a literatura como orienta LACAZ et al. (2002), o índice de positividade ficou em torno de 11 a 15 %. Porém, quando as amostras colhidas foram primeiramente mantidas em caldo nutriente ou solução salina e depois levadas à estufa na temperatura de 28 °C, mantidas por 72 horas, e depois semeadas no meio de cultivo Ágar Sabourad Dextrose o índice de positividade aumentou

para de 37 %. Quando negativas as amostras foram mantidas em estufa por mais 12 horas, confirmando-se a negatividade.

Provavelmente esses micro-organismos encontravam-se injuriados, definidos como aqueles que sobreviveram a um estresse, mas que perderam parte de suas características/habilidades distintivas, e, dessa forma, demandam mais tempo para se multiplicar, contudo, em condições favoráveis, eles têm capacidade de reparar o dano e em seguida crescer no mesmo ritmo que as células normais, inclusive de modo acelerado, atingindo populações grandes o suficiente para causarem infecções (MACHADO & BORGES, 2013).

A restauração de micro-organismos injuriados para um estado não injuriado é reconhecida como um processo de recuperação ou reparação, e segundo Everis (2001) independentemente do método utilizado, a quantidade de células reparadas depende do Ph, quantidade de água do meio de cultura e da temperatura de incubação, provavelmente condições que foram nesta pesquisa propiciadas para o achado.

Outra característica que pode ter contribuído para esse achado e como descrito por Malanga (2005), que regiões de clima quente propiciam a infecção, pois fatores locais tais como, aumento da temperatura, umidade e traumas da mucosa local podem levar ao surgimento da infecção pelo fungo. Li et al. (2014) estudando os fatores de risco para infecção por *Candida* spp. do trato genital nos trópicos, observaram um aumento da susceptibilidade à infecção relativo ao ambiente abafado e úmido, favorecendo o crescimento de espécies de *Candida*. Sá et al. (2014) encontraram 32,86 % da presença do fungo por meio de cultura em esfregaço cérvico-vaginal, admitiram que a prevalência elevada de *Candida* spp. no estudo se deve as condições climáticas e fatores socioambientais, que foram favoráveis ao desenvolvimento da doença nessa região, corroborando com o achado deste estudo. Portanto, as considerações de temperatura e umidade da região são propícias ao desenvolvimento fúngico, pois a temperatura média em Manaus é de 27,6 °C e a taxa média de umidade ao ano é de 80 % (AGEITEIC/EMBRAPA, 2015).

6.1.2 Perfil Sociodemográfico das Pacientes

De acordo com a Tabela 06 estão distribuídos os dados sócio-demográficos das pacientes que participaram da pesquisa. A faixa etária da amostra variou de 18 a 40 anos, todas estavam no período de menacme, com média de idade 27 anos (Figura 9). O período de menacme foi escolhido porque a CVV é relatada principalmente em mulheres que estão em idade reprodutiva. Segundo a literatura a faixa etária mais acometida é de 20 a 40 anos, associa-se a esse fato a atividade ovariana máxima com produção de estrogênio, o que favorece o

crescimento de *Candida* e sua aderência às células epiteliais vaginais (MAHMOUDI et al., 2012; BANKAR et al., 2012).

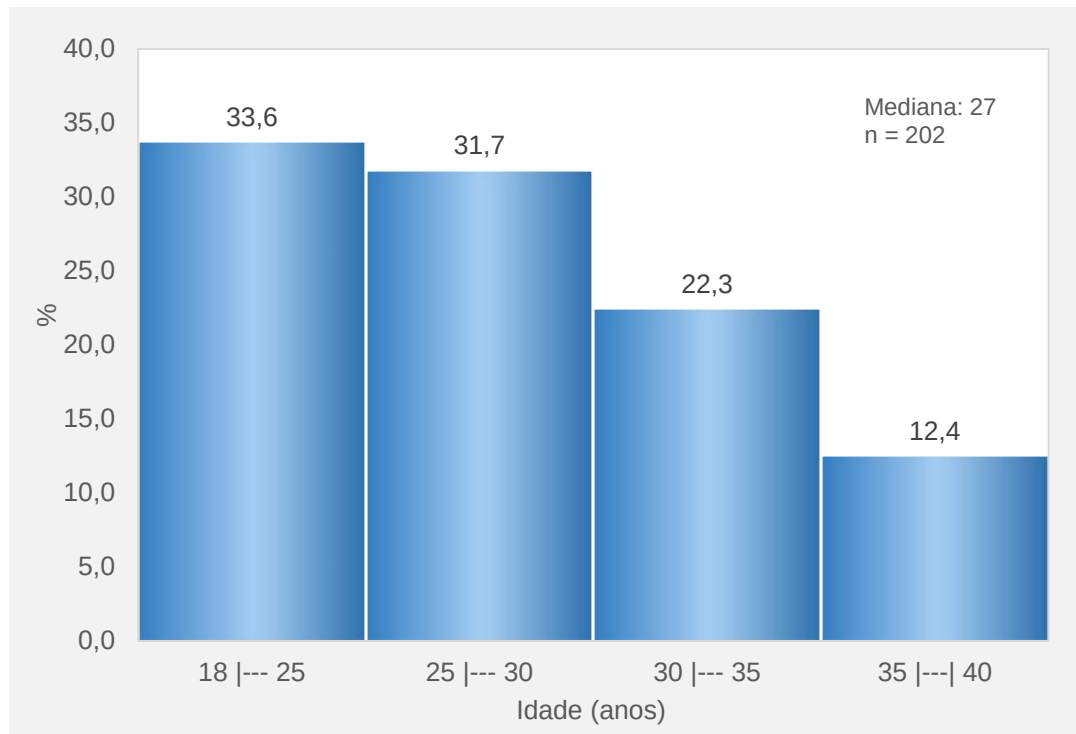


Figura 9 - Distribuição da faixa etária das mulheres amostradas, Manaus - AM

A cor/raça parda contribuiu com 58,9 % (N= 119), branca 28,7 % (N= 58) e negra 12,4 % (N=25). Quanto a cor/raça, embora não se tenha elementos concretos que indique a razão do maior isolamento de *Candida* sp. em mulheres da raça negra, Sá et al. (2014) isolaram o fungo em 66,4% de mulheres com cor escura, pois relatam que a acidez adequada ao mecanismo de defesa do ambiente vaginal é obtida pela ação dos lactobacilos produtores de peróxido, dificultando o crescimento de patógenos. Álvares et al (2007) admitiram que a ocorrência de algumas espécies de lactobacilus parece ser menos frequente em mulheres de raça negra, tornando-as, portanto, mais suscetíveis a estes patógenos. A discussão de cor/raça nos sujeitos do estudo fica comprometida porque apenas 4.1% da população do Amazonas, no último censo em 2010, tenha se autodeclarado da cor preta sem contar que segundo o IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) a população negra (afrodescendente) é definida como sendo a soma dos auto-declarados de cor preta e parda, o que no caso do Amazonas reflete uma inexatidão devido ao fato da evidente origem índio-descendente da maioria dos “pardos” locais (IBGE, 2015).

Mulheres casadas e com união estável contribuíram com 61,9 % (N= 125). A baixa escolaridade foi representada por 50,5 % (N= 102) com ensino fundamental, não houve representação de não alfabetizadas. 60,9% (N= 123) apresentavam o ciclo menstrual regular e

51% (N=103) faziam uso de anticoncepção hormonal. Apenas 12,9 % (N=26) apresentaram CVV recorrente (Tabela 8).

Tabela 8 - Distribuição segundo os dados sociodemográficos, ciclo menstrual, uso de roupas específicas, álcool, antibiótico, relação sexual nos últimos 30 dias e uso de anticoncepcional das mulheres amostradas, Manaus - AM

Variáveis (n = 202)	f _i	%
Idade		
18 --- 25	68	33,6
25 --- 30	64	31,7
30 --- 35	45	22,3
35 -- 40	25	12,4
Estado civil		
Casada	125	61,9
Solteira	77	38,1
Cor/Raça		
Parda	119	58,9
Branca	58	28,7
Negra	25	12,4
Escolaridade		
Fundamental	102	50,5
Médio	67	33,2
Superior	33	16,3
Ciclo menstrual		
Regular	123	60,9
Irregular	79	39,1
CVVR		
Nenhum episódio	55	27,2
Um	83	41,1
Dois	38	18,8
Três	26	12,9
Uso de roupa de Lycra ou renda	119	58,9
Uso de álcool	103	51,0
Uso de antibiótico	41	20,3
Relação sexual nos últimos 30 dias	161	79,7
Uso de anticoncepcional	103	51,0

f_i = frequência absoluta simples.

6.1.3 Fatores de Risco para CVV em Pacientes Colonizadas por *Candida* spp.

No presente estudo foi relacionado os fatores de risco mencionados pelos autores para a CVV, como: idade, estado civil, cor/raça, ciclo menstrual, uso de roupas justas e/ou sintéticas, anticoncepção hormonal, uso de álcool, uso de antibióticos e atividade sexual. Os fatores de risco e sua associação com a presença de *Candida* spp. na cultura do exsudato vaginal estão apresentados na Tabela 9, e em regressão logística na Tabela 10.

A idade mostrou associação significativa ($p < 0,05$) de mulheres com idade superior ou igual a 35 anos, que apresentaram 2,88 vezes maiores chances de serem colonizadas por *Candida* spp. (Tabelas 9). Li et al. (2014) avaliando a idade como fator de risco para desenvolver CVV evidenciaram associação significativa de pacientes com idade superior a 35 anos e a presença de CVV ($p = 0,003$), estabelecendo relação causal com o pico de estradiol nessa faixa etária. Álvares (2007) relata que altos níveis de produção de hormônios femininos, especialmente a progesterona, aumentam a disponibilidade de glicogênio no ambiente vaginal, o qual serve como excelente fonte de carbono para o crescimento e a germinação das leveduras. Raramente isola-se *Candida* spp. na pré-menarca, fato que, associado à baixa prevalência CVV na menopausa, enfatiza a dependência hormonal da infecção. Olowe et al. (2014) encontraram um risco de CVV em pacientes com faixa etária entre 32 a 35 anos, justificaram através da acidez, subsequente aos picos hormonais de FSH, LH, estradiol e progesterona que são determinantes da ovulação e formação do corpo lúteo, contribuiria para invasão tecidual de *Candida* spp.

Não houve associação significativa entre o estado civil e relação sexual nos últimos 30 dias com a colonização assintomática de *Candida* spp. Na amostra 79,7 % ($N = 161$) das pacientes relataram ser sexualmente ativas, definida como atividade sexual nos últimos 30 dias antes da consulta para coleta de preventivo, destas 37,3 % ($N = 60$) apresentaram cultura positiva para *Candida* spp. Sá et al. (2007) encontraram 32,7 % da amostra de mulheres com união estável, seguido de mulheres casadas 30,8% que corresponderam aos grupos com as maiores prevalências de fungo no cultivo do material cervical. Barbedo & Sgarbi (2010) relataram que a atividade sexual é um fator facilitador para desenvolver a CVV, pois está relacionada com o trauma direto que a penetração peniana ocasiona na vulva e parede vaginal, originando soluções de continuidade que facilitam a infecção por espécies de *Candida* em pacientes colonizadas. Porém na amostra das pacientes colonizadas nenhuma relatou episódio de CVV após relação sexual, não estabelecendo relação causal.

Neste estudo 53,7 % das pacientes colonizadas com *Candida* spp. relataram que estavam em uso de antibióticos (ATB) ou haviam feito uso nos últimos 30 dias, e houve uma associação significativa ($p= 0,023$), onde elas apresentaram 2,36 chances maiores de desenvolver CVV (Tabela 9). Olowe et al. (2014) relataram que a incidência das infecções fúngicas aumentaram muito nos últimos tempos, especialmente com o uso generalizado de (ATB) de amplo espectro e tratamento imunossupressor, em seu estudo houve uma significativa associação entre uso de antibióticos e CVV ($p = 0,035$). Outros estudos mostram que o uso de ATB é apontado como responsável por aumentar a taxa de colonização vaginal por *Candida* sp. de 10 a 30 %, pois essas drogas agem diminuindo a população bacteriana que geralmente compete com as leveduras da microbiota vaginal, particularmente dos bacilos de Döderlein, considerados os "guardiões da genitália feminina", diminuindo a competição por nutrientes, evidenciando a suscetibilidade à CVV em pacientes submetidas à antibioticoterapia, tendo um papel de importante fator de risco (GIOLO et al., 2010; DALAZAN, 2011; BEZERRA et al., 2015).

Foi questionado às pacientes se já haviam apresentado nos últimos 06 meses algum episódio de CVV e 12,9 % (N= 12) referiram 03 ou mais episódios. Quando a paciente apresenta a repetição de três ou mais episódios sintomáticos ao ano são definidas com CVV recorrentes. Segundo Fidel (2006) 10 a 40 % das mulheres acometidas com CVV tornam-se recorrentes, portanto valor semelhante ao encontrado neste trabalho. Quanto a positividade na cultura de *Candida* spp. e os episódios de CVV houve importante associação ($p<0,001$), com 4,92 razão de chances de apresentar CVVR pacientes colonizadas por *Candida* spp.

O significado de *Candida* spp. presente na vagina de mulheres assintomáticas entre episódios de recorrência não está bem claro. O achado desses organismos, durante períodos livres de sintomas, poderia indicar um tratamento prévio inadequado por uso insuficiente de antifúngicos ou mesmo à resistência dos fungos aos fármacos. Entre 10 a 33 % dos casos de recorrência descritos na literatura a etiologia é atribuída a espécies não albicans, neste trabalho o achado foi superior, pois 46 % (N= 7) das pacientes com CVVR a espécie mais comumente encontrada foi a *C. parapsilosis*.

Em relação ao método contraceptivo hormonal foi observado que 53 % (N= 40) eram usuárias. Alguns trabalhos ressaltam o uso do contraceptivo hormonal como importante fator de risco para vulvovaginites clínicas (ANDRIOLLI et al., 2009; DAN et al., 2006), pois o uso de anticoncepcionais hormonais fornecem condições nutritivas que favorecem o estabelecimento do fungo na mucosa vaginal, como o estado hiperestrogênico que aumenta a acidez vaginal, pois o nível elevado de estrogênio contribui para um aumento no conteúdo de glicogênio vaginal, importante fonte de carbono para o desenvolvimento de *Candida* spp

(BANKAR et al., 2012). Outros pesquisadores, porém, não identificaram relação entre o uso de contraceptivos orais com a presença de vulvovaginites causadas por *Candida* spp. (SA et al., 2014; ZISOVA et al., 2016). No presente estudo, não ficou evidenciada interferência entre métodos contraceptivos adotados e a ocorrência da infecção associada. Todavia, a diferenciação na dosagem de estrógeno do ACO não foi avaliada nesta pesquisa.

Em desacordo com os dados da literatura, não houve associação de colonização assintomática com estado civil, cor/raça, escolaridade, ciclo menstrual, uso de álcool e relação sexual nos últimos 30 dias. A não observação destes fatores de risco provavelmente se deve à casuística, uma vez que praticamente há unanimidade entre os autores que os associam à CVV (ROSA & RUMEL, 2004; DOU et. al., 2014; SHI et al., 2015).

Tabela 9 - Distribuição segundo os dados sociodemográficos, ciclo menstrual, uso de roupas específicas, anticoncepcional, antibiótico e relação sexual nos últimos 30 dias em relação a prevalência de *Candida* nas mulheres amostradas, Manaus - AM

Variáveis	Candida spp				Total	OR	p*
	Sim (n=75)		Não (n=127)				
	f _i	%	f _i	%			
Idade						2,92	0,021
≥ 35 anos	15	60,0	10	40,0	25		
< 35 anos	60	33,9	117	66,1	177		
Estado civil						1,84	0,068
Casada	53	42,4	72	57,6	125		
Solteira	22	28,6	55	71,4	77		
Cor/Raça						0,95	0,999
Negra	9	36,0	16	64,0	25		
Branca/Parda	66	37,3	111	62,7	177		
Escolaridade						0,72	0,326
Fundamental	34	33,3	68	66,7	102		
Médio/Superior	41	41,0	59	59,0	100		
Ciclo menstrual						2,38	0,008
Regular	55	44,7	68	55,3	123		
Irregular	20	25,3	59	74,7	79		
CVVR						4,92	<0,001
Um ou mais	67	45,6	80	54,4	147		
Nenhum episódio	8	14,6	47	85,4	55		
Uso de roupa de lycra ou renda						1,84	0,062
Sim	51	42,9	68	57,1	119		
Não	24	28,9	59	71,1	83		
Uso de álcool						1,78	0,068
Sim	45	43,7	58	56,3	103		
Não	30	30,3	69	69,7	99		
Uso de antibiótico						2,36	0,023
Sim	22	53,7	19	46,3	41		
Não	53	32,9	108	67,1	161		
Relação sexual nos últimos 30 dias						1,03	0,999
Sim	60	37,3	101	62,7	161		
Não	15	36,6	26	63,4	41		
Uso de anticoncepcional						1,78	0,068
Sim	45	43,7	58	56,3	103		
Não	30	30,3	69	69,7	99		

f_i = frequência absoluta simples; OR = *Odds Ratio*; * Teste do qui-quadrado com correção de Yates.
 Valor de p em negrito itálico indica associação estatisticamente significativa ao nível de 5%.

As pacientes que faziam uso diário de peças íntimas de renda/lycra associada a calça justa de fibra sintética apresentaram 2,34 vezes maiores chances de serem colonizadas por *Candida* spp (Tabela 10). Nascimento (2013) relata que o uso de roupa íntima de material sintético propicia o surgimento da infecção pelo fungo devido pouca aeração nos órgãos genitais, aumentando a umidade e o calor, condições propícias para a proliferação fúngica. Holanda et al. (2007) evidenciaram que entre as pacientes assintomáticas com cultura positiva para *Candida* spp. houve uma associação relevante com o uso de roupas justas e/ou sintéticas ($p=0,02$). Andriolle et al. (2009) afirmaram que fatores extrínsecos, como tipo de roupa íntima ($p<0,05$) e uso constante de calça jeans ($p<0,05$), quando analisados de acordo com a localização geográfica (clima quente e úmido) das mulheres que compuseram o estudo, exibiram associação significativa sugerindo possível interferência de tais aspectos na frequência e distribuição de CVV, dados que corroboraram com o achado desta pesquisa.

Tabela 10 - Regressão Logística dos dados sociodemográficos, ciclo menstrual, uso de roupas específicas, álcool, antibiótico e relação sexual nos últimos 30 dias em relação a prevalência de *Candida* nas mulheres amostradas, Manaus – AM

Variáveis	OR	IC95%	Z	p
Idade ($\geq 35 / < 35$)	2,8885	1,1160 7,4761	2,1861	0,0288
Uso de antibiótico (Sim/Não)	1,9524	0,8733 4,3650	1,6299	0,1031
Ciclo menstrual (Sim/Não)	2,0451	0,6408 6,5268	1,2083	0,2269
CVVR ($\geq 1 / < 1$)	4,0119	1,6775 9,5950	3,1227	0,0018
Escolaridade (Fundamental/Médio e Superior)	0,5896	0,3026 1,1487	1,5526	0,1205
Estado Civil (Casada/Solteira)	1,9831	0,9622 4,0873	1,8555	0,0635
Uso de anticoncepcional (Sim / Não)	0,9885	0,3174 3,0785	0,0200	0,9841
Uso de roupa de lycra ou renda (Sim / Não)	2,3439	1,1901 4,6164	2,4632	0,0138
Raça/Cor (Negra/Parda ou Branca)	0,9480	0,3532 2,5440	0,1061	0,9155
Relação sexual nos últimos 30 dias (Sim / Não)	1,0682	0,4718 2,4187	0,1582	0,8743

Intervalo de Confiança ao nível de 95% para o OR; Z = Estatística de Teste e $p < 0,05$ indica as variáveis significativas ao modelo.

6.2 Identificação dos isolados clínicos do gênero *Candida*

6.2.1 Identificação dos isolados clínicos do gênero *Candida* pelos métodos fenotípicos

As características fenotípicas das leveduras são frequentemente utilizadas em laboratório para a identificação destes organismos ao nível de espécies e subespécies, há na literatura ampla variedade de métodos utilizados para a determinação de *Candida* spp. cada método apresenta vantagens e desvantagens (OLIVEIRA, 2014). Diante dos resultados obtidos a avaliação dos aspectos macro morfológicos foi feito a partir do crescimento em Ágar Sabourad Dextrose. Dos 202 exsudatos vaginais colhidos 37 % (N=75) foi possível identificar amostras do gênero *Candida*. As culturas positivas para *Candida* spp. apresentaram coloração branca variando a branco-amarelada, aparência lisa, algumas frondosas, brilhante, úmidas e cremosas, com odor característico (Figura 10). A maioria das espécies, incluindo *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. rugosa*, *C. dubliniensis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae* e *C. guilliermondii* apresentam a mesmas características macromorfológicas, ou seja, a diferenciação entre as espécies neste meio de cultura Ágar Sabouraud Dextrose raramente é possível.

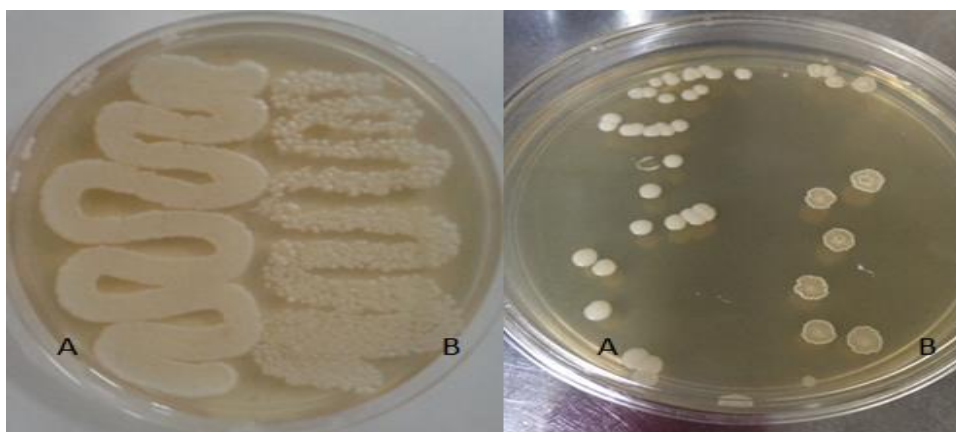


Figura 10 - Placa de Petri com meio Ágar Sabourad Dextrose positiva para *Candida* sp.

Na avaliação dos aspectos micromorfológicos foi realizado microcultivo em meio de cultura Agar fubá acrescido de TWEEN 80, crescimento em meio cromogênico e o auxanograma.

As leveduras, no microcultivo, foram semeadas em meio Ágar fubá acrescido de TWEEN 80 para a produção de clamidoconídeos, estrutura morfológica sugestiva da espécie *C. albicans*. A espécie *C. albicans* foi a mais prevalente em 62,7 % (N= 47), pois os clamidoconídeos apresentaram-se redondos e terminais característicos (Figura 11), e 38 % (N= 28) das amostras apresentaram as espécies não-*albicans*. Apesar da literatura destacar a *C.*

albicans como o agente fúngico mais prevalente entre as infecções, o método apresenta limitação por não apresentar especificidade para as espécies diferentes de *albicans*.

Percentual de espécie de *Candida albicans* e não-*albicans* identificadas pelo método Ágar Fubá

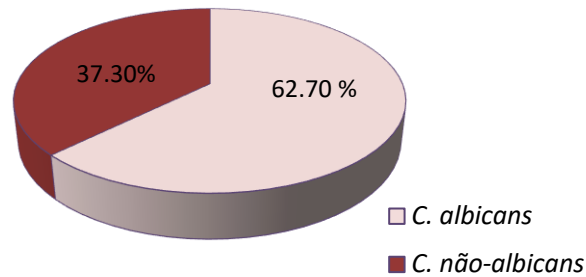


Figura 11 - Micromorfologia em Ágar-fubá (1000x) de *Candida albicans*

CHROMagar *Candida* é um meio cromogênico que permite a identificação presuntiva das leveduras por conter vários substratos enzimáticos que, hidrolizados pelas hexoaminidases correspondentes, permitem a identificação da levedura de acordo com a pigmentação exibida pela colônia em um tempo de 24 a 48 horas. O meio utilizado indica colônias verde-claras para *C. albicans*, rosa rugosa para *C. krusei*, azul metálico para *C. tropicalis*, lilás para *C. glabrata* e rosa lisa para *C. parapsilosis*. Segundo Oliveira (2006) o meio CHROMagar *Candida* deve ser utilizado para diferenciar, de forma rápida, algumas espécies de *Candida* a partir de amostras clínicas como meio de triagem, contudo vale ressaltar que esse meio de cultura específico é caro, e de difícil acesso no Amazonas. Dentre os 75 isolados de *Candida* spp. que foram cultivados em CHROMagar 61 % (N= 46) revelou *C. albicans* como a espécie mais comum, seguida de 9 % (N= 4) de *C. parapsilosis*, 8 % (N= 6) *C. tropicallis*, 4,5 % (N= 3), *C. krusei*, 4,5 % (N= 3) de *C. glabrata* e 13 % (N= 10) isolados que produziram colônias brancas, portanto não puderam ser identificados (Figura 12).

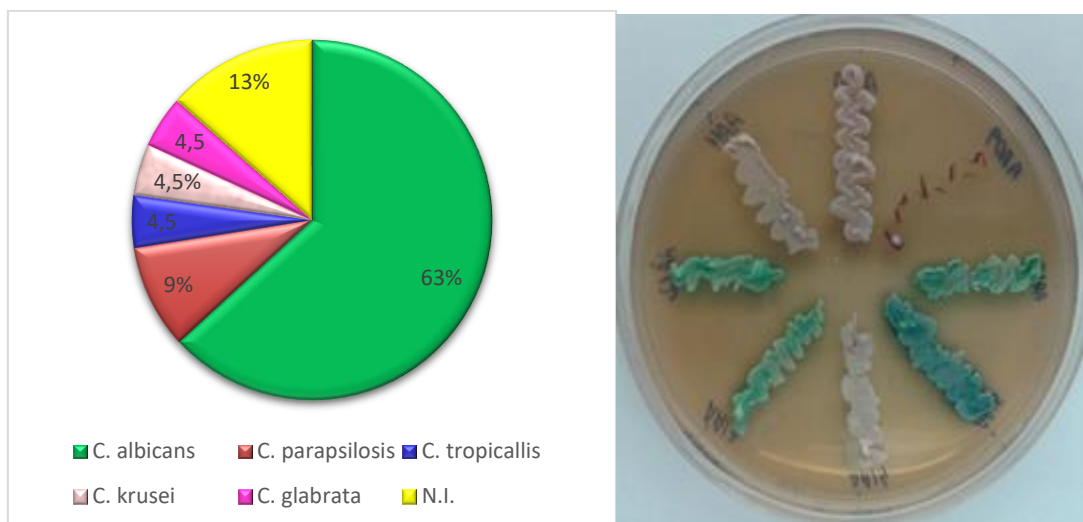


Figura 12 Distribuição das espécies de *Candida* em meio cromogênico para identificação presuntiva destas leveduras em amostras isoladas do exsudato vaginal

Cardenes et al. (2004) avaliaram quatro meios cromogênicos comerciais utilizados para identificação de espécies do gênero *Candida*, entre eles o CHROMagar *Candida*, obtiveram especificidade e sensibilidade maior que 92 % para identificação de *C. albicans*. Entretanto, esses autores conseguiram identificar apenas 5,6 % de isolados *C. não-albicans* nesse meio de cultura, diferindo do resultado desta pesquisa onde 25,3 % (N= 19) das amostras foram identificadas como espécies *C. não-albicans*. Uma das vantagens do meio cromogênico é a caracterização de duas ou mais espécies de *Candida* na mesma placa de isolamento, na amostra estudada não houve infecção mista.

A prova de assimilação de carbono, o auxanograma, determina a capacidade das diferentes espécies de leveduras desenvolverem-se a partir de diferentes substratos. A positividade caracteriza-se pela presença de um halo ao redor do açúcar assimilado. Nesse estudo foram utilizados os seguintes açúcares: glicose, galactose, maltose, rafinose, sacarose e lactose. O achado na amostra foi 59 % (N= 44) de *C. albicans*; 7 % (N=05) de *C. tropicalis*; 5 % (N= 04) *C. lusitaniae*; 5 % (N= 04) *C. parapsilosis*; 5 % (N= 04) de *C. rugosa*, 4 % (N= 03) *C. krusei*, 3 % (N= 02) *C. guilliermondii* e 12 % (N= 09) não foi possível identificar pelo método. Fernandes Correia (2016) afirma que as provas bioquímicas, como o auxanograma, apontam identificações errôneas relacionadas ao crescimento lento ou ao metabolismo das leveduras, e esses equívocos são mais frequentes entre as espécies *C. tropicalis*, *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* assim como ocorre com leveduras pouco frequentes, como *Wickerhamomyces anomalus* (*Pichia*), *C. kefir*, *Cryptococcus unigutulatus*, entre outras.

Assim devido a esses resultados errôneos e a necessidade de expertise técnica para sua realização, que nem sempre apresenta 100% de acurácia, ha necessidade de confirmar com outros métodos de identificação.

6.4.2 Identificação dos isolados clínicos por métodos moleculares

Atualmente, novas opções de identificação de leveduras, como a utilização de métodos moleculares têm sido descritas para superar as limitações dos métodos tradicionais, que utilizam longos períodos para identificação, por não apresentarem a precisão e curacidade necessárias, além de dependerem de recursos humanos altamente especializados e difícil de encontrar, assim com os avanços de estudos em taxonomia molecular tem sido possível a descoberta de novas espécies causando infecções. Portanto a fim de confirmar a caracterização fenotípica e determinar as espécies de *Candida* isoladas que não foram identificadas pelas análises fenotípicas, foi realizada a identificação molecular por PCR e sequenciamento das regiões *Its 1* e *Its 2* do rDNA e MALDI-TOF, além de realizar fingerprinting do DNA genômico por AFLP.

Pelo sequenciamento das regiões *Its 1* e *Its 2* do rDNA foram identificadas sete diferentes espécies do gênero *Candida*. 64 % (N= 48) das amostras foram identificadas como *C. albicans*; 20 % (N= 15) de *C. parapsilosis*; 5,3 % (N= 04) *C. glabrata*; 4 % (N= 03) *C. tropicalis*; 4 % (N= 03) *C. haemolinus*; 1,3 % (N= 01) de *C. krusei* e 1,3 % (N= 01) *C. lusitanae* (Figura 13).

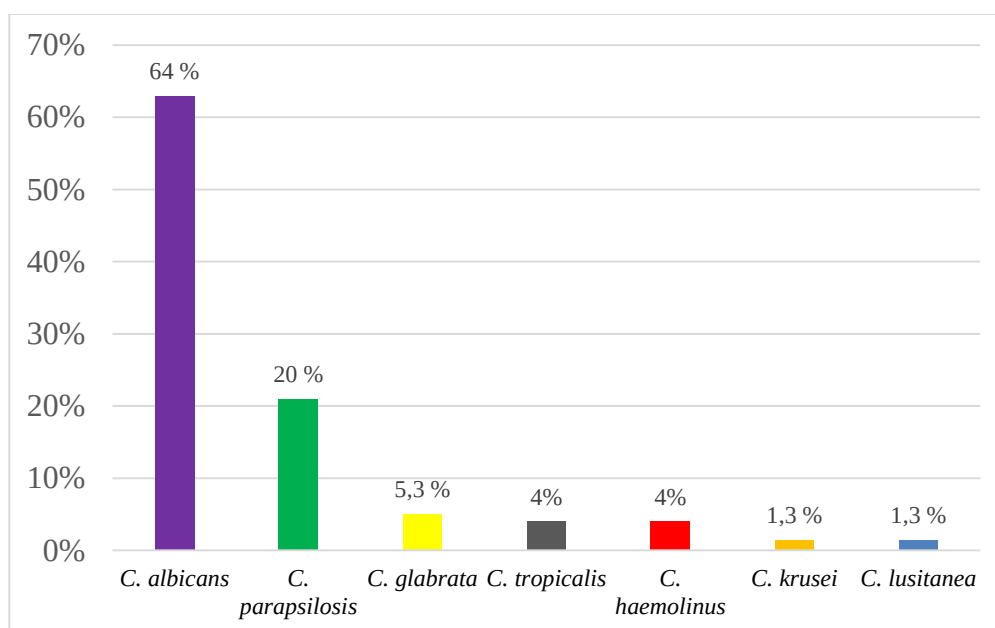


Figura 13 - Distribuição das espécies de *Candida* identificadas pelas regiões *Its 1* e *Its 2* do rDNA isoladas do exsudato vaginal.

Na identificação por MALDI TOF MS 42 % (N= 32) das amostras foi identificada como *C. albicans*; 19 % (N= 14) de *C. parapsilosis*; 3 % (N= 02) *C. tropicalis*; 3 % (N= 02) *C. glabrata*; 1 % (N= 01) de *C. krusei*; 1 % (N= 01) *C. zeylanoides* e 31 % (N= 23) não foi possível identificar pelo método (Figura 14). Segundo Posteraro (2013) em muitos laboratórios clínicos, a identificação de leveduras ainda depende de métodos fenotípicos e moleculares que são trabalhosos, demorados e muitas vezes ineficazes, por isso tem sido proposto em muitos laboratórios de microbiologia clínica, na Europa, o uso deste como padrão-ouro para a identificação de fungos devido a sua superioridade em muitas tarefas. Nesta pesquisa, foi concluído que o tempo hábil para identificação de espécies de *Candida* pelo MALDI-TOF é bem inferior quando comparado as outras metodologias fenotípicas e e moleculares aqui utilizadas.

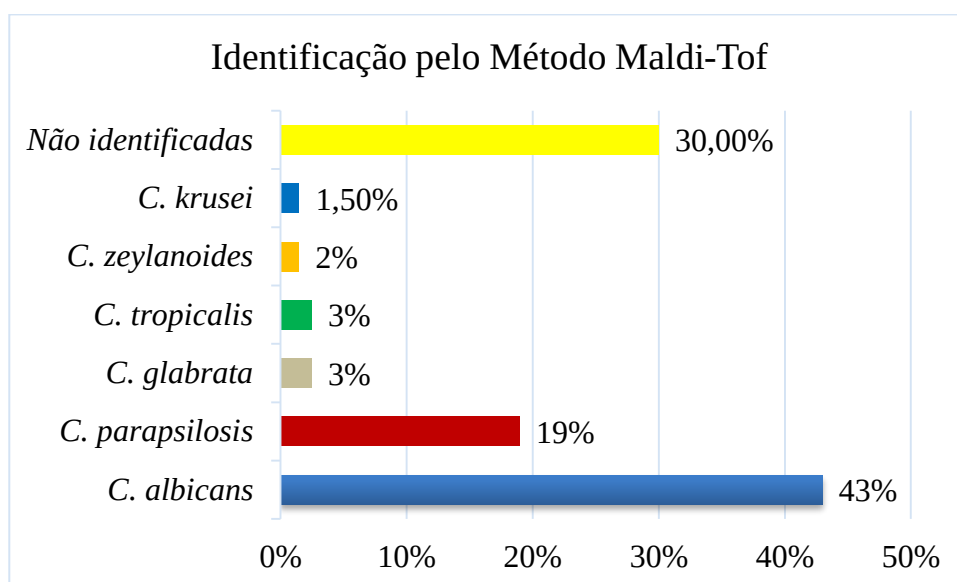


Figura 14 - Distribuição das espécies de *Candida* identificadas pelo método de MALDI-TOF isoladas do exsudato vaginal de mulheres assintomáticas na cidade de Manaus

6.5 Comparação entre os Métodos Diagnósticos

Dentre os métodos fenotípicos e bioquímico a *C. albicans* foi a mais prevalente em torno de 60 %, achado semelhante a outros estudos com pacientes colonizadas (CORRÊA et al, 2009; SPOLIDORIO et al 2009; MIMICA et al 2009). A taxa de concordância entre os métodos para *C. albicans* foi em torno 96 %, e diferiram entre as espécies não *albicans* (Tabela 12). As explicações para tais discordâncias podem estar relacionadas às limitações apresentadas por estes métodos ou a características inerentes às leveduras, como citado particularmente a cada método.

Assim os métodos de identificação de leveduras baseado em caracterização fenotípica e bioquímica apresentam alta sensibilidade quanto a espécie *albicans*, porém apresentam algumas deficiências quanto as espécies não *albicans*, já que alguns grupos de leveduras apresentam poucas variações morfológicas. Além disso consomem tempo desde o isolamento até o diagnóstico definitivo, principalmente no caso de espécies pouco frequentes.

Tabela 11 - Distribuição da frequência e comparacao dos diferentes métodos fenotipicos para identificação das espécies de *Candida* isoladas do exsudato vaginal, Manaus - AM

Espécies (n = 75)	Método					
	Ágar-Fuba		Auxonograma		Chromoagar	
	f _i	%	f _i	%	f _i	%
<i>C. albicans</i>	47	62,7	44	58,7	46	61,3
<i>C. glabrata</i>	-	-	-	-	3	4,0
<i>C. guilliermondii</i>	-	-	2	2,7	-	-
<i>C. hemolinus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>C. krusei</i>	-	-	3	4,0	3	4,0
<i>C. lusitaniae</i>	-	-	4	5,3	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	-	-	4	5,3	7	9,3
<i>C. rugosa</i>	-	-	4	5,3	-	-
<i>C. tropicallis</i>	-	-	5	6,7	6	8,0
<i>C. zeylanoides</i>	-	-	-	-	-	-
Não identificada	28	37,3	9	12,0	10	13,4
Total	75	100,0	75	100,0	75	100,0

A sensibilidade e a especificidade dos métodos clássicos (agar-fuba, auxonograma, CRHOMagar) e do MALDI-TOF foi calculado a partir da comparação com a identificação molecular, e foi feita por grupos de *C. albicans* e não-*albicans*, por conta que não houve representatividade numérica de cada espécie identificada (Tabela 12).

Dentre os métodos fenotípicos, o Ágar-fubá apresentou alta sensibilidade e especificidade, porém o método apresenta limitação porque não é capaz de identificar espécies não-*albicans*, alcançando 95,7 % de positividade para as amostras de *C. albicans* (Tabela 12). O auxonograma apresentou 86,4 % de especificidade, provavelmente devido ao metabolismo fúngico lento, que interfere na assimilação desses açúcares apontando identificações errôneas, além disso sua metodologia é dispendiosa de tempo e de difícil execução.

Tabela 12 - Distribuição segundo a sensibilidade e especificidade dos diferentes métodos de identificação do gênero *Candida* em relação ao método molecular, Manaus - AM

Variáveis	Molecular				Total	S (IC95 %)	E (IC95 %)
	<i>C. albicans</i>		<i>Ñ albicans</i>				
	f _i	%	f _i	%			
Ágar-Fuba						93,8 %	92,6 %
<i>C. albicans</i>	45	95,7	2	4,3	47	(83,2-97,9)	(76,6-97,9)
<i>Ñ albicans</i>	3	10,7	25	89,3	28		
Auxo						93,2 %	86,4 %
<i>C. albicans</i>	41	93,2	3	6,8	44	(81,8-97,6)	(66,7-95,2)
<i>Ñ albicans</i>	3	13,6	19	86,4	22		
Chromoagar						93,5 %	84,2 %
<i>C. albicans</i>	43	93,5	3	6,5	46	(82,5-97,8)	(62,4-94,5)
<i>Ñ albicans</i>	3	15,8	16	84,2	19		
Maldi-Tof						85,7 %	88,2 %
<i>C. albicans</i>	30	93,8	2	6,2	32	(70,6-93,7)	(65,7-96,7)
<i>Ñ albicans</i>	5	25,0	15	75,0	20		

f_i = frequência absoluta simples; S = Sensibilidade; E = Especificidade; IC95% = Intervalo de Confiança ao nível de 95%.

O meio CHROMagar *Candida* tem sido utilizado para diferenciar, de forma relativamente rápida, algumas espécies de *Candida* a partir de amostras clínicas (DO CARMO et al., 2006). Nesta pesquisa a sensibilidade foi de 93,5 %, achado semelhante a Cardenes et al. (2004), que mostraram sensibilidade maior que 92 % para identificação de *C. albicans*, porém com baixa especificidade em espécies raras emergentes.

Segundo Odds et al (1994) o CHROMagar *Candida* apresenta alta especificidade e sensibilidade, excedendo 99 %, para três das principais espécies de *Candida*: *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*. Nesta pesquisa quando foi avaliado por espécie resultou taxas de concordância bem menor (Tabela 12), provavelmente devido as variações fenotípicas intraespécies que possam ocorrer, somado ao fato que é um método observador dependente com variação de cor e do aspecto das colônias. Cooke et al. (2002) ao compararem vários meios cromogênicos, inclusive o CHROMagar *Candida*, obtiveram variações nas colorações das colônias entre isolados da mesma espécie, ocorrendo efeito semelhante ao encontrado neste estudo.

A identificação presuntiva de *C. glabrata* nesse meio permanece controversa, alguns autores consideram o uso de CHROMagar apropriado para sua detecção (HOSPENTHAL et al., 2002), enquanto outros não o recomendam (ODDS & BERNAERTS, 1994; COOKE et al.,

2002). Nesta pesquisa houve uma taxa de concordância com a identificação para *C. glabrata* de 75 % (Tabela 13).

Tabela 13 - Relação de concordância entre os métodos Molecular e CHROMagar de isolados clínicos do gênero *Candida*

Método Molecular	CHROMagar	Morfologia e pigmentação das colônias em CHROMagar	Concordância (%)
<i>C. albicans</i> (48)	<i>C. albicans</i> (46)	Verde	95,8
<i>C. parapsilosis</i> (15)	<i>C. parapsilosis</i> (7)	Rosa, lisa	46,6
<i>C. glabrata</i> (4)	<i>C. glabrata</i> (3)	Lilás	75
<i>C. tropicalis</i> (3)	<i>C. tropicalis</i> (6)	Azul metálico	50
<i>C. krusei</i> (1)	<i>C. krusei</i> (3)	Rosa, rugosa	33,3

No entanto, a taxa de desenvolvimento da cor característica de espécies de *Candida* pode sofrer influência da temperatura de incubação. Por exemplo, *C. albicans*, a 37°C durante 48 horas de incubação, apresenta colônias esverdeadas e, se alterarmos a faixa de temperatura para o intervalo de 25 a 30 °C, apresentará coloração rosa. Além disso, falta consenso para a identificação de outras espécies de *Candida*, diferentes de *C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis*, que são identificadas por este método (CÁRDENES et al., 2002; ESTRADA-BARRAZA et al., 2011). Alguns autores também relatam, que *C. tropicalis* representa a principal fonte de falsa identificação para este meio de cultura, devido a sua ampla faixa de variação de cores (CÁRDENES et al., 2002; ESTRADA-BARRAZA et al., 2011), achado encontrado nesta pesquisa, pois o método superestimou esta espécie em 50 % (Tabela 13).

A figura 15 descreve a distribuição por espécies de *Candida* entre os métodos de identificação auxonograma, CHROMagar e molecular nos isolados do exsudato vaginal, dando uma visão geral.

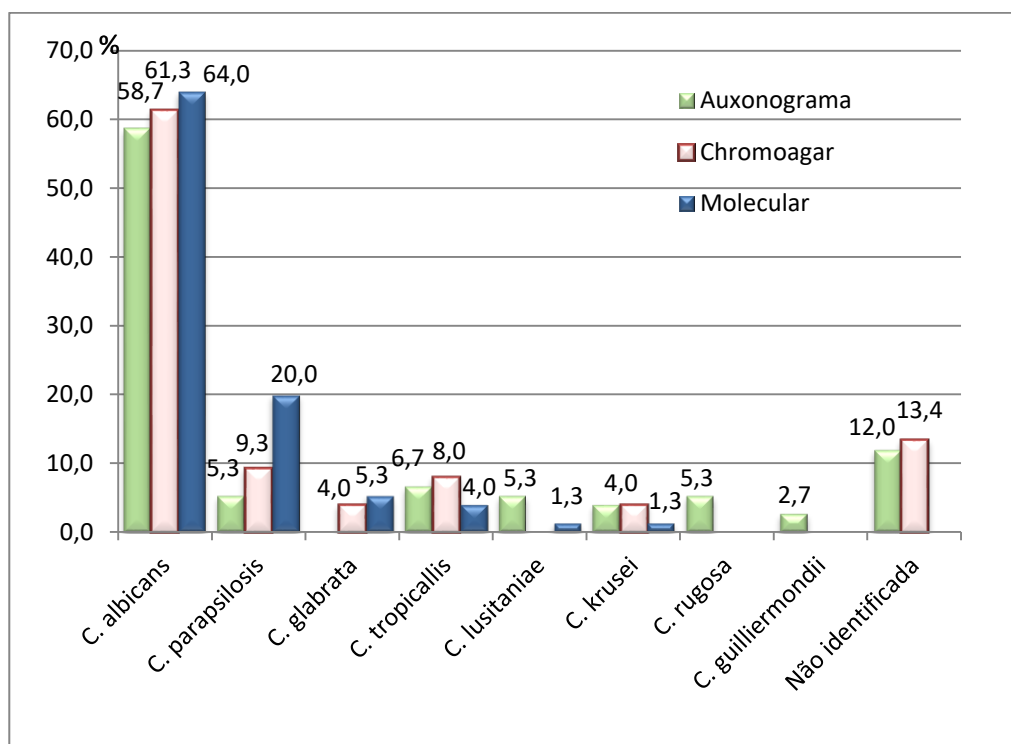


Figura 15 - Distribuição por espécie de *Candida* entre os métodos de identificação auxonograma, CHROMagar e molecular nos isolados do exsudato vaginal em mulheres amostradas, Manaus- AM

O MALDI-TOF, como descrito por Santos (2011), é uma técnica poderosa e confiável para identificação bacteriana, e mais recentemente utilizada para detectar e identificar os isolados clínicos de *Candida* spp., inclusive possibilita a discriminação de espécies estreitamente relacionadas. A identificação dos isolados clínicos, por espectrometria de massas MALDI-TOF foi realizada a fim de confrontar sua acurácia frente à caracterização molecular das leveduras do gênero *Candida*.

A acurácia da espectrometria de massa MALDI-TOF frente aos métodos moleculares para a identificação de *Candida krusei* foi de 100 %. Porém, o banco de dados não foi suficientemente extensivo para fornecer a identificação das espécies *C. haemolinus* e *C. lusitanea*, provavelmente devido a uma completa falta de dados relacionados a estas leveduras no banco de dados do aparelho (Figura 16)

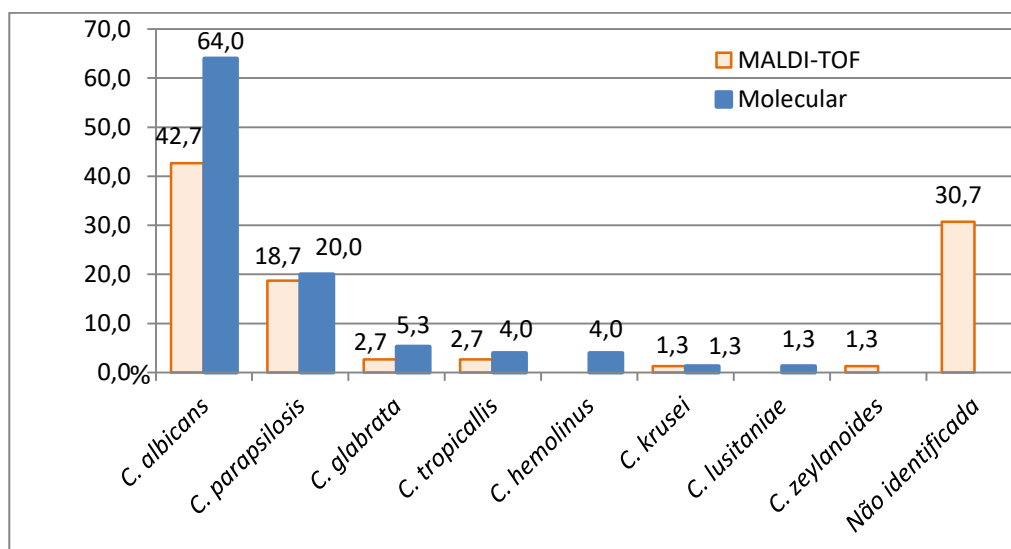


Figura 16 - Distribuição por espécie de *Candida* entre os métodos de identificação MALDI-TOF e molecular nos isolados do exsudato vaginal em mulheres amostradas, Manaus- AM

A sensibilidade e especificidade do MALDI - TOF foi acima de 85 %, mesmo com 30,7 % de não identificados, quando comparados aos outros métodos. Este evento foi atribuído a ausência de um completo banco de dados, que segundo Lima-Neto et al. (2014), em breve, com o crescente uso da técnica os bancos de dados proteômicos ficaram cada vez mais completos tornando a técnica mais usual, inclusive superando as limitações dos outros métodos na identificação de espécies raras e emergentes.

Dentre os 05 métodos diagnósticos realizados 41% (N=31) das amostras foi concordante entre si (Figura 15), destes 84% (N=26) foram identificadas como *Candida albicans* e 16% (N=5) de outras espécies assim distribuídas: *C. parapsilosis* (N= 02); *C. tropicalis* (N= 02) e *C. krusei* (N= 01) (Figura 17).

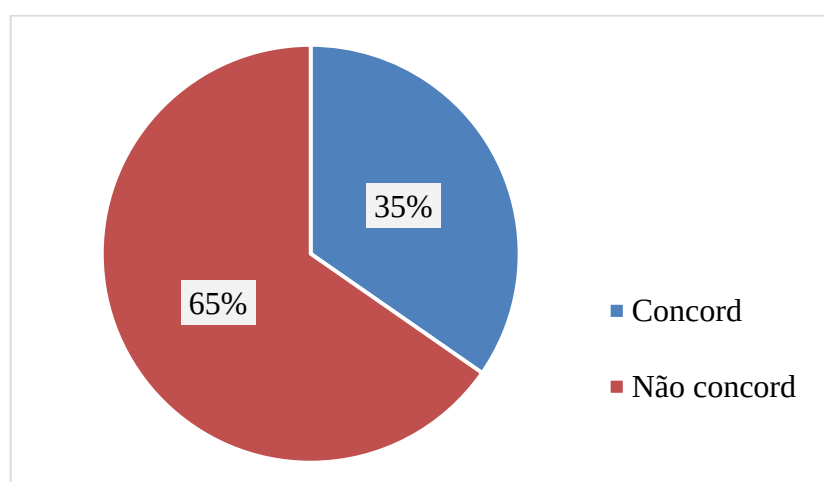


Figura 17 - Distribuição das amostras de *Candida* spp. cuja a identificação da espécie foi concordante em 05 técnicas diagnósticas diferentes

Cerca de 64 % das leveduras, identificadas na mucosa vaginal, foram *C. albicans*, que esteve amplamente distribuída em nossa amostragem, como comensal. Entretanto, recentemente, as espécies de *Candida* não *albicans* vêm mudando este panorama clínico, neste trabalho a porcentagem foi expressiva, 36 % da amostra, pois a maioria dos estudos apresentam uma distribuição da ocorrência destas espécies entre 10 a 30 % dos casos de colonização (ANDRIOLLI et al., 2009; MUKASA et al., 2015; FORNARI et al., 2016).

As espécies não *albicans* mais comumente encontradas neste trabalho foram *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*, achado concordante com outros estudos, que as identificam na última década, como espécies emergentes ocorrendo em mulheres adultas sem sintomatologia (RAGUNATHAN et al., 2014; HIGASHI et al., 2015).

O ranque de prevalência destas espécies é variável, pois no Brasil apresentam um perfil de prevalência que muda de região para região. No Estado do Rio de Janeiro *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. famata*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. lambica* (NEUFELD et al., 2015). No Estado de Minas Gerais (Uberlândia), a espécie de *C. parapsilosis* foi mais prevalente que *C. albicans*, seguido de *C. tropicalis* e outras (MENEZES et al., 2015). No Estado do Maranhão, em São Luís, a prevalência encontrada foi de *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. norvegensis* (MAGALHÃES et al., 2015).

Assim a relevância do reconhecimento correto e rápido das espécies tem valor epidemiológico, entretanto mais importante ainda quando aplicado à terapêutica, devido a presença de resistência inerente ou adquirida aos antifúngicos de variadas espécies (HIGASHI et al., 2015).

6.6 *C. haemulonii*- primeiro isolamento no exsudato vaginal no Brasil

Nesta pesquisa foi identificado 4 % (N= 3) de *C. haemulonii*, uma espécie extremamente rara que faz parte do complexo de espécies *haemulonii*, formado pela *C. haemulonii*, *C. duobushaemulonii*. nov. e *C. haemulonii* var. vulnera.. Esta levedura merece atenção especial porque é considerada multirresistente a anfotericina B e aos azóis. Os métodos clássicos e comerciais de identificação das leveduras não são confiáveis para identificar esta rara e emergente espécie (CENDEJAS-BUENO et al., 2012). A identificação em nível de espécie foi alcançada somente após o sequenciamento das regiões *Its* 1-2 (RAMOS et al. 2015). Nesta pesquisa o dendograma construído a partir das sequências do *rDNA* agrupam 100 % os três isolados, cuja a identidade foi de 99 % para todas as cepas (Figura 18).

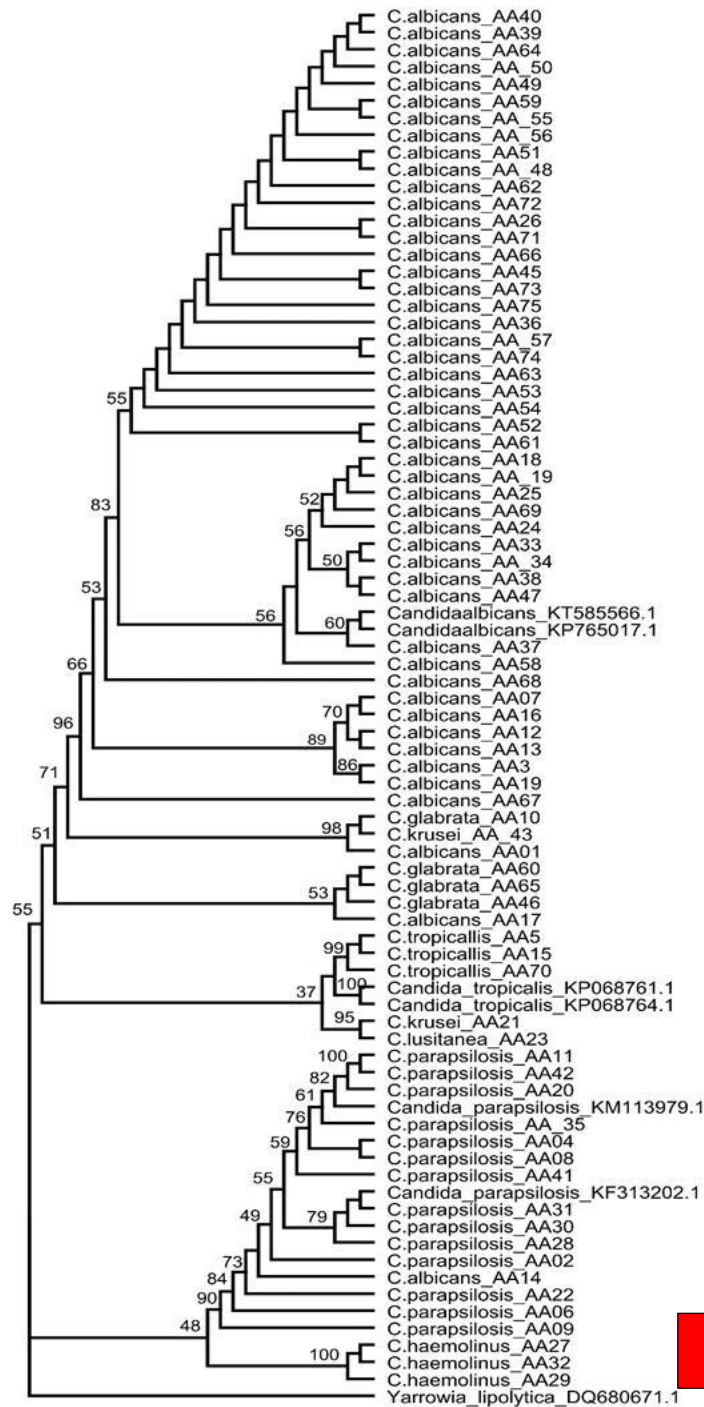


Figura 18 - Dendrograma gerado pelo programa IQ-TREE pelo método de máxima verossimilhança referente as cepas de *Candida* spp. isolados do exsudato vaginal

O primeiro isolamento humano de *C. haemulonii* ocorreu em 1984 a partir do sangue de um paciente com insuficiência renal. Desde então, raros casos de infecções humanas com *C. haemulonii* foram relatados em todo o mundo, incluindo o cateter venoso central relacionadas com candidemia em pacientes da Argentina, Coreia e China; em recém-nascidos pré-termo

recebendo nutrição parenteral no Kuwait e um paciente de 37 anos com osteomielite do hálux esquerdo na França. No Brasil o primeiro relato de caso foi em 2012 numa paciente com câncer de ovário, isolada do cateter venoso central (ALMEIDA et al., 2016).

Ramos et al. (2015) analisando quatro hospitais brasileiros, entre 2005 e 2013, identificou 12 isolados clínicos de *C. haemulonii*. Recentemente, Almeida Jr. et al (2016) mostrou que entre 14.642 culturas positivas de leveduras colhidas, de cinco hospitais de São Paulo (Brasil), 40 (0,3 %) isolados foram identificados como espécie de complexo de *C. haemulonii*. Nestes estudos, diferente do achado desta pesquisa, nenhum isolado foi de origem do exsudato vaginal, tornando esta pesquisa a primeira identificação de *C. haemulonii* em isolados do exsudato vaginal em mulheres assintomáticas.

6.7 Variabilidade Genética das espécies de *Candida* por AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*)

Na análise de polimorfismo por AFLP foi utilizado um primer (EcoAT+MseI C) para gerar os dados, o mesmo apresentou 107 bandas sendo 100% polimórficas (Figura 19).

O dendograma apresentou duas divisões, a primeira com apenas um componente o indivíduo AA61, identificado como *C. albicans*, que possivelmente se comportou dessa forma devido falha no *primer* escolhido, pois não conseguiu acessar as informações contidas no seu DNA (Figura 20).

Já a segunda divisão agrupa o restante dos indivíduos, é possível observar o agrupamento dos indivíduos da espécie *C. albicans* em pelo menos 5 clados, rearranjados em diversos subclados indicando a possibilidade de variabilidade genética entre esses espécimes.

Também é possível verificar o agrupamento de indivíduos de outra espécie como o AA46 e AA65 (*C. glabrata*) com cerca de 60% de similaridade seguido pelo AA10 com 40% de similaridade com os outros dois, já o terceiro indivíduo dessa espécie AA60, rearranja-se com outro grupo AA57 e AA58 de espécie (*C. albicans*).

O agrupamento de todos os indivíduos e a forma como o grupo se estrutura formando diversos clados e subclados, indica variabilidade genética, apesar do coeficiente cofenético ser de 92,2%.

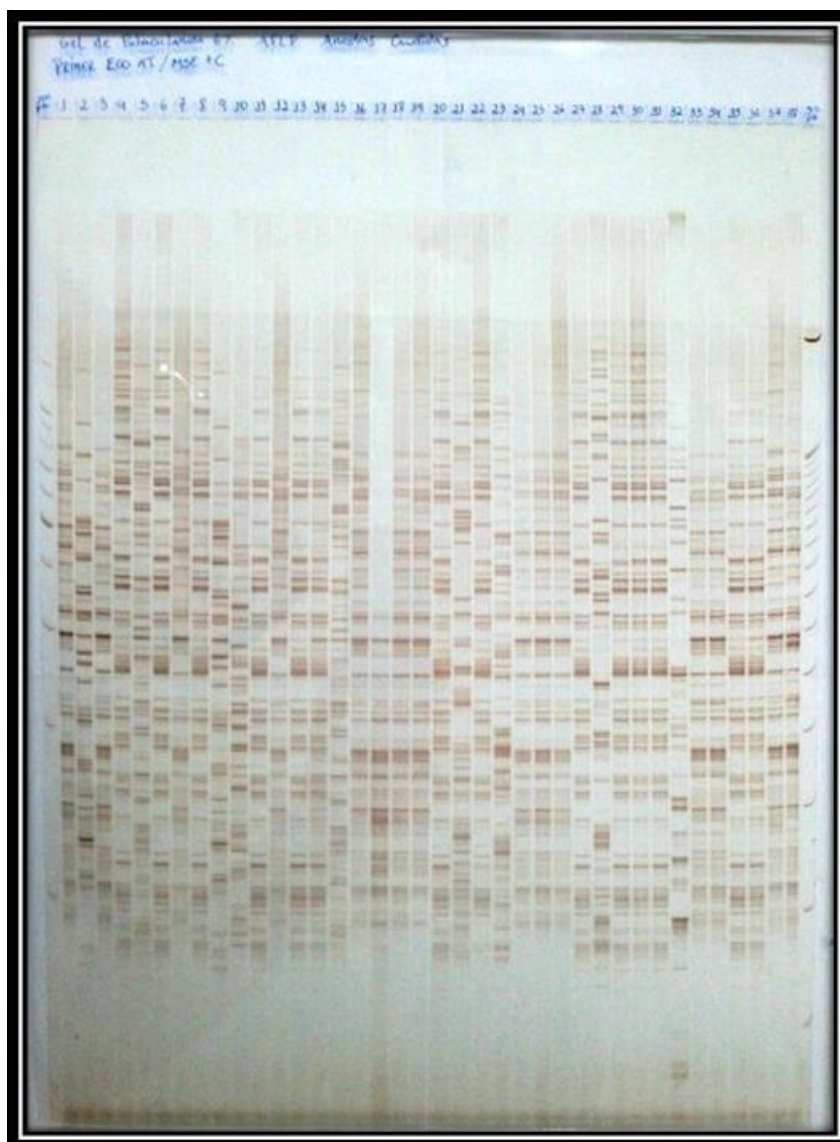


Figura 19 - Placa de AFLP em gel de poliacilamida a 6% das amostras de *Candida* spp dos isolados

6.8 Perfil de Susceptibilidade e de Resistência dos isolados clínicos aos agentes antifúngicos convencionais

O perfil de susceptibilidade, dos isolados do exsudato vaginal, frente aos antifúngicos foi determinado para os 75 isolados clínicos de *Candida* spp. 100 % das amostras distribuídas entre as 07 espécies identificadas *C. albicans* (48), *C. parapsilosis* (15), *C. tropicalis* (3), *C. glabrata* (4), *C. krusei* (1), *C. lusitanea* (1) e *C. haemolinus* (3), não apresentaram sensibilidade a nenhum dos antifúngicos convencionais (Anexo 03).

O perfil de resistência, dos isolados do exsudato vaginal, frente ao itraconazol (1 µg/ml), nistatina (32 µg/ml), fluconazol (64 µg/ml) e o cetoconazol (32 µg/ml) foi determinado para os 75 isolados clínicos de *Candida* spp (Anexo 04). O perfil de resistência as drogas das cepas que apresentaram sensibilidade estão distribuídas na tabela 14.

Quanto ao perfil de resistência ao Itraconazol apenas uma cepa a *C. glabrata* se mostrou sensível. E duas cepas a *C. haemolinus* e a *C. parapsilosis* tiveram seu crescimento inibido, os outros isolados apresentaram perfil de resistência na dose realizada. Quanto a Nistatina todas as 75 amostras apresentaram resistência.

Em relação ao fluconazol, tiveram crescimento inibido 04 cepas de *C. parapsilosis*, 02 cepas de *C. haemolinus* e 01 cepa de *C. albicans*, todas as outras amostras (N= 68) apresentaram resistência. Quanto ao cetoconazol tiveram crescimento inibido 02 cepas de *C. albicans* e 01 de *C. haemolinus*, e foi sensível 01 cepa de *C. parapsilosis* (Tabela 14).

Tabela 14 - Distribuição das cepas de *Candida* sp. que apresentaram sensibilidade aos antifúngicos itraconazol, nistatina, fluconazol e cetoconazol

Espécies	Itraconazol (C=1µg/mL)	Nistatina (C=32µg/mL)	Fluconazol (C=64µg/mL)	Cetoconazol (C=32µg/mL)
<i>C. glabrata</i> (AA10)	S	R	R	R
<i>C. haemolinus</i> (AA27)	CI	R	CI	R
<i>C. parapsilosis</i> (AA28)	CI	R	R	R
<i>C. haemolinus</i> (AA29)	R	R	CI	CI
<i>C. parapsilosis</i> (AA31)	R	R	CI	S
<i>C. parapsilosis</i> (AA35)	R	R	CI	R
<i>C. albicans</i> (AA36)	R	R	CI	R
<i>C. parapsilosis</i> (AA41)	R	R	CI	R
<i>C. parapsilosis</i> (AA42)	R	R	CI	R
<i>C. albicans</i> (AA58)	R	R	R	CI
<i>C. albicans</i> (AA64)	R	R	R	CI

S= cepa sensível; R= cepa resistente; CI= crescimento inibido

Hou et al. (2016) estudaram a susceptibilidade aos antifúngicos de 31 isolados, de 14 hospitais da China, de *C. haemolinus* e encontraram uma concentração inibitória mínima (CIM) $\geq 128 \mu\text{g/mL}$ ao fluconazol. Ramos et al. (2015) estudando 12 isolados clínicos de *C. haemolinus*, no Brasil, todos foram resistentes ao fluconazol (CIM $\geq 64 \text{ mg/L}$). Cendejas-Bueno

et al. (2012) descrevem o complexo da *C. haemolinus* como uma nova espécie que apresenta um perfil antifúngico multirresistente, incluindo uma alta CIM para compostos de anfotericina B e uma resistência cruzada aos azólicos. Nesta pesquisa foi observado que as cepas *C. haemolinus*, de origem do isolado vaginal, apresentaram sensibilidade aos azóis, na cepa identificada em uma cepa (AA27) tiveram efeito fungistático com o fluconazol e o itraconazol, e a outra cepa (AA29) com fluconazol e itraconazol (Tabela 14). Vale ressaltar nas literaturas citadas não há registro de cepas de *C. haemolinus* isoladas de exsudato vaginal e sim de origens diversas (sangue, lavado bronco-alveolar, unha, urina, ulcera (HOU et al., 2016; RAMOS et al., 2015; ALMEIDA JR et al., 2012; FORNARI et al., 2016) com este comportamento de multirresistência.

Fornari et al. (2016) avaliando a suscetibilidade de espécies de *Candida* isoladas da vagina, em pacientes assintomáticas, encontraram todos os isolados de *C. albicans* sensível dose-dependente (SDD) para nistatina (8µg/mL), sensível ao itraconazol (0,0625 µg/mL), fluconazol (0,125 µg/mL) e ao cetoconazol (0,0625 µg/mL), e 03 isolados de *C. glabrata* resistentes ao itraconazol (4,0 µg/mL), SDD ao fluconazol (4,0 - 16 µg/mL), a nistatina (8,0 µg/mL) e ao cetoconazol (1,0 – 4,0 µg/mL). Achados bem diferentes desta pesquisa que das 48 cepas de *C. albicans* apenas 02 cepas tiveram seu crescimento inibido (fungistático), pelo cetoconazol em concentração de resistência (32 µg/mL).

Assim nesta pesquisa 85 % das espécies de *Candida* apresentaram resistência aos antifúngicos convencionais fluconazol, nistatina, itraconazol e cetoconazol. Todos utilizados no tratamento da CVV, na concentração de resistência estabelecida pelo CLSI (2008). Este perfil de resistência é relatado em vários estudos (CHANG et al., 2013; DA COSTA et al., 2014; ZHANG et al., 2015). No entanto, sofre variações de acordo com a região geográfica, o que desde o plaqueamento das amostras foi sugerido, nesta pesquisa, que condições climáticas e hábitos locais são importantes fatores de risco que corroboram com este achado.

Além disso, a resistência adquirida por espécies de *Candida* frequentemente está associada ao uso de terapia profiláticas, que contribui de forma direta com o aumento de espécies de *Candida* não *albicans*, que são naturalmente menos sensíveis aos antifúngicos e também possuem maior capacidade de desenvolver resistência cruzada, principalmente aos agentes azólicos, nesta pesquisa foi questionado apenas uso de antifúngico nos últimos 30 dias. A resistência cruzada, tem sido principal causa de falha terapêutica de infecções fúngicas, e é definida como a resistência de micro-organismos a várias drogas que compartilham alvos terapêuticos em comum (DALAZEN, 2011).

6.9 Atividade antifúngica de extratos brutos de *Vaitarea guianensis*

No médio e baixo Amazonas a população utiliza as sementes de *V. guianensis* contra diversos tipos de micoses superficiais, sob a forma de tintura alcoólica ou por aplicação direta na pele de suas sementes maceradas, ou na forma de chá para banho de assento a partir da maceração do fruto para as infecções de vulva e vagina. A literatura relata também que as cascas do caule e das raízes são utilizadas pela população contra fungos, no período em que esta espécie não está em fase de frutificação (OTOBELLI, 2009; SOSA, 2006).

A avaliação da atividade antifúngica dos extratos de acetato de etila (EXTRATO 01), hexânico (EXTRATO 02) e metanólico (EXTRATO 03) de *V. guianensis* foi feita, dos isolados do exsudato vaginal, para os 75 isolados clínicos de *Candida* spp. obtidos nesta pesquisa. Entre as cepas que foram testadas, apenas quatro apresentaram crescimento inibido por pelo menos um dos extratos, de acordo com a tabela 15.

Tabela 15 - Descrição da atividade fungistática dos extratos de *V. guianensis* sob as cepas de *Candida* sp. isoladas do exsudato vaginal.

Espécies	EXTRATO 1	EXTRATO 2	EXTRATO 3
<i>C. parapsilosis</i> (AA21)	F	F	F
<i>C. albicans</i> (AA19)	F	R	R
<i>C. albicans</i> (AA72)	R	R	F
<i>C. parapsilosis</i> (AA28)	F	F	R

F= atividade fungistática R= cepas resistentes

A partir dos resultados citados acima, foi realizada a CIM dos extratos, onde apenas a cepa 21 teve o crescimento inibido pela presença de todos os extratos na concentração de 8 µg/mL, sendo extrato 1 (hidroetanólico) mais eficiente, pois a atividade fungistática permaneceu em todas as condições.

O desenvolvimento de um agente antifúngico é um desafio porque há poucos alvos potenciais de ação que não sejam compartilhados pelo fungo e a espécie humana. O antifúngico ideal deve ter um amplo espectro de atividade, ter ação fungicida, ao invés de fungistática, estar disponível em diferentes formulações, causar poucas interações medicamentosas, ser seguro em doses eficazes, ter baixo custo-efetivo e ser estável à resistência microbiana. Nesta pesquisa os extratos dos frutos de *V. guianensis* não apresentaram atividade fungicida, mesmo inúmeros trabalhos (FORMIGA et al, 1975; SOSA, 2006; SILVA, 2011), de composição química do fruto desta planta, mostrarem o isolamento do crisofanol 3 e fisciona 4, duas antraquinonas, com registros na literatura de atividades antifúngica, anticancerígenas e (SOSA, 2006; SILVA, 2011). Segundo Martins et al. (2015) o fato de uma planta de determinado gênero conter

compostos químicos específicos e com valor medicinal, não significa que todas as outras espécies de plantas do mesmo gênero têm o mesmo valor. Outros estudos também mostram que plantas da mesma espécie, com diferentes origens, podem ter consideráveis diferenças na composição química e possivelmente diferentes eficácia e potência em sua bioatividade.

7 CONCLUSÃO

1. A taxa de colonização de *Candida* sp. em isolados do exsudato vaginal foi de 37%, resultado superior ao encontrado em literatura, possivelmente decorrente da metodologia de isolamento e condições climáticas e socio-culturais.
2. Dentre os fatores de risco pesquisados houve associação significativa de mulheres colonizadas com *Candida* apresentando idade igual ou superior a 35 anos, em uso de antibiótico, em uso de roupa de lycra/renda diariamente e episódios de Candidíase Vulvovaginal Recorrente.
3. A *C. albicans* foi a espécie prevalente nesta amostragem, seguida de outras espécies não *albicans*: *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicallis*, *C. haemolius*, *C. krusei* e *C. lusitaniae*. Ressaltando a importância do estudo de prevalência de espécies de *Candida* não *albicans* que não são detectadas rotineiramente nos exames clínicos.
4. *C. haemulonii*, uma espécie emergente e rara, foi pela primeira vez identificada em isolados do exsudato vaginal de mulheres assintomáticas em Manaus/AM/Brasil.
5. São necessárias combinações entre métodos clássicos e também a realização de provas complementares para a identificação fenotípica de *Candida* spp., contudo não se consegue a determinação específica de novas espécies.
6. Os métodos moleculares disponíveis confirmam que o uso de métodos não moleculares para o diagnóstico clínico devem ser cautelosos, pois possuem baixa acurácia na determinação de espécies *Candida* não *albicans* e na identificação de novas espécies.
7. MALDI-TOF se mostrou como uma excelente ferramenta para a identificação de espécies de *Candida*, pois associa simplicidade da técnica, procedimentos parcialmente automatizados e principalmente a rapidez do resultado microbiológico, a limitação deste método esta na ausência de um completo banco de dados.
8. A grande maioria amostras de *Candida* sp., isoladas do exsudato vaginal, apresentaram resistência aos antifúngicos fluconazol, itraconazol, cetoconazol e a nistatina.
9. A *C. haemulonii*, uma espécie descrita na literatura como multiresistente a anfotericina B e aos azóis, quando isolada do exsudato vaginal apresentou seu crescimento inibido com as concentrações de resistência do itraconazol, fluconazol e cetoconazol.

10. Os extratos hexânico, acetato de etila e metanólico das sementes de *Vaitarea guianensis* apresentaram apenas atividade fungistática em 04 isolados de *Candida* sp. do exsudato vaginal.

8 REFERÊNCIAS

- Achkar, J. M. & Bettina, C. F. Candida infections of the genitourinary tract. **Clin Microbiol Rev** 23.2: 253-273, 2010.
- Almeida Jr, J. N. D., Motta, A. L., Rossi, F., Abdala, E., Pierrotti, L. C., Kono, A. S. G., ... & Del Negro, G. M. B.). First report of a clinical isolate of *Candida haemulonii* in Brazil. **Clinics**, 67(10), 1229-1231. 2012.
- Alvares, C. A.; Svidzinski, T. I. E.; Consolaro, M. E. L. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, 43(5): 319-327, 2007.
- Alves, I. A.; Camargo, F. P.; Goulart, L. S. Identificação por PCR e sensibilidade a antifúngicos de isolados clínicos vaginais de *Candida* sp. **Rev Soc Bras Med Trop**;43(5): 575-9, 2010.
- Andrioli, J. L, Oliveira, G. S. A.; Barreto, C. S., Sousa, Zeira, C. H.; Cazorla, I. M., et al. Frequency of yeasts in vaginal fluid of women with and without clinical suspicion of vulvovaginal candidiasis. **Rev Bras Ginecol Obstet**.;31(6):300-4 2009.
- Antunes, R. M. P.; Lima, E. O.; Pereira, M. S. V.; Camará, C. A.; Arruda, T. A.; Catão, R. M. R.; Barbosa, T. P.; Nunes, X. P.; Dias, C. S.; Silva, T. M. S. Atividade antimicrobiana “in vitro” e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. **Rev Bras Farmacogn**. 16(4): 517-524, 2006.
- Araújo, C. A.; Miranda, K. C.; Passos, X. P.; Souza, L. H.; Lemos, J. A.; Khrais, C. H. A. K.; Costa, K. L.; Rodrigues Silva, M. R.; Fernandes, O. F. L. Identificação através de ChroMagar *Candida*. **Rev Patol Trop**. 34 (1): 37-42. 2005.
- Arraes, A. C. P. **Deteção da diversidade molecular de *Candida* sp. isoladas de UTI neonatal**. 2012. 109f. Dissertacao (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012.
- Bankar, S. M.; Powar, R. M.; Patil, S. A.; Kalthur, S. G. Prevalence of non-albican candida infection in Maharashtrian women with leucorrhea. **Ann Trop Med Public Health**;5(2):119-23, 2012.
- Barbedo, L. S. & Sgarbi, D. B. G. Candidíase. **DTS: J Bras Doenças Sex Transm** 22:22-38, 2010.
- Barroso, G. M.; Peixoto, A. I.; Ichaso, C. I. F.; Costa, C. G.; Guimarães, E. F.; Lima, H. C. Sistemática de angiospermas do Brasil. Belo Horizont: Imprensa Universitária. 377p. 1991. v.2
- Behera, B., Singh, R. I.; Xess, I.; Mathur, P.; Hasan, F.; Misra, M. C. *Candida rugosa*: a possible emerging cause of candidaemia in trauma patients. **Infection** 38, 387–393, 2010.
- Berquó, Elza Salvatori. **Bioestatística**. São Paulo: EPU, 1980.

Bonin, A.; Ehrich, D.; Manel, S. Statistical analysis of amplified fragment length polymorphism data: a toolbox for molecular ecologists and evolutionists. **Molecular ecology**, v. 16, n. 18, p. 3737-3758, 2007.

Calixto, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guiderlines for herbal medicines (Phytotherapics). **Bras J Med Biol Res.** 33: 179-189, 2000.

Camargo, F. P.; Alves, I. A.; Parlow, M. S.; Goulart, L. S. Isolamento de *Candida sp.* da Mucosa Vaginal de Mulheres Atendidas em um Serviço de Ginecologia do Município de Santo Ângelo – RS. **NewsLab**, ed. 87, 2008.

Camargo, G. S.; Pereira, D. C.; Vaz, C. B.; Faria, A. G.; Fogaça, R.; Fuentefria, A. M.; Avaliação da susceptibilidade aos antifúngicos de isolados clínicos de *Candida* vulvovaginal e oral. **Rev. HCPA.** v. 31, 2011.

Cárdenes, C. D., Carrillo-Muñoz, A. J., Arias, A., Rodríguez-Alvarez, C., Torres-Lana, A., Sierra, A., & Arévalo, M. P. Comparative evaluation of four commercial tests for presumptive identification of *Candida albicans*. **J Microbiol Methods**, 59(2), 293-297. 2004.

Cassagne, C. et al. Evaluation of four pretreatment procedures for MALDI-TOF MS yeast identification in the routine clinical laboratory. **Med Mycol.** 51(4): 371-7, ISSN 1369-3786. 2013.

Cavalcante, V.L.N.; Miranda, A.T.; Portugal, G.M.P. Rastreamento de candidose vaginal durante a prevenção do câncer cérvico-uterino. **DST – J Bras Doenças Sex Transm.** 17(1): 44-48, 2005.

Cendejas-Bueno, E., Kolečka, A., Alastruey-Izquierdo, A., Theelen, B., Groenewald, M., Kostrzewa, M., ... & Boekhout, T. (2012). Reclassification of the *Candida haemulonii* complex as *Candida haemulonii* (C. *haemulonii* group I), *C. duobushaemulonii* sp. nov. (C. *haemulonii* group II), and *C. haemulonii* var. *vulnera* var. nov.: three multiresistant human pathogenic yeasts. **J Clin Microbiol**, 50(11), 3641-3651.

Chang, T. P.; Ho, M. W.; Yang, Y. L.; Lo, P. C.; Lin, P. S., Wang, A. H., & Lo, H. J. Distribution and drug susceptibilities of *Candida* species causing candidemia from a medical center in central Taiwan. **J Infect Chemother**, 19(6), 1065-1071. 2013.

Clark, A. E. et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. **Clin Microbiol Rev.** 26(3): 547-603, 2013. ISSN 0893-8512.

Cliff, P. R.; Sandoe, J. A.; Heritage, J.; Barton, R. C. Use of multilocus sequence typing for the investigation of colonisation by *Candida albicans* in intensive care unit patients. **J Hosp Infect.** 69: 24-32, 2008.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts.** Third informational supplement M-27S3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa., 2008.

Cooke, V. M., Miles, R. J., Price, R. G., Midgley, G., Khamri, W., & Richardson, A. C. New chromogenic agar medium for the identification of *Candida* spp. **Applied Envir Microbiol**, 68(7), 3622-3627. 2002.

Corrêa, P. R.; David, P. R. S.; Peres, N. P.; Cunha, K. C.; Almeida, M. T. G. Caracterização fenotípica de leveduras isoladas da mucosa vaginal em mulheres adultas. **Rev Bras Ginecol Obstet**. 31(4):177-81, 2009.

CORREIA, A. F. **Avaliação da atividade antifúngica de extratos de plantas do cerrado brasileiro sobre isolados clínicos de *Candida* SPP**. 2016. 95 f., il. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)—Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

Costa, A. F. **Novas abordagens no diagnóstico laboratorial de micoses: o sistema MALDI-TOF MS**. 2015. 83f. Trabalho de Conclusão do Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

Costa, K.R.C. **Aspectos fenotípicos e moleculares de adesão e atividade enzimática de *Candida* sp isoladas de pacientes com sinais clínicos de candidíase oral**. 2009. Tese (Doutorado em Biociências Aplicadas à Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Creste, S.; Neto, A. Tulmann; Figueira, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 19, n. 4, p. 299-306, 2001.

Da Costa, V. G., Quesada, R. M. B., Abe, A. T. S., Furlaneto-Maia, L., & Furlaneto, M. C. Nosocomial bloodstream *Candida* infections in a tertiary-care hospital in South Brazil: a 4-year survey. *Mycopathologia*, 178(3-4), 243-250. 2014.

Dalazen, D., Zanrosso, D., Wanderley, L., Silva, N. L. D., & Fuentefria, A. M. Comparison of susceptibility profile among clinical isolates of oral and vulvovaginal *Candida* spp. in southern Brazil. *J Bras Patol Med Lab*, 47(1), 33-38. 2011.

DIAS, L.A.S. Análises multidimensionais. In: ALFENAS, A.C. (Ed.). Eletroforese de isoenzimas e proteínas afi ns: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa: UFV,., p.405-473. 1998.

Dingle, T. C.; Butler-Wu, S. M. Maldi-tof mass spectrometry for microorganism identification. *Clin Lab Med*, 33(3): 589-609,. ISSN 0272-2712. 2013.

Do Carmo Oliveira, N., Rampazzo, R. D. C. P., Minari, M. C., Corrêa, P. R. C., Carneiro, M., Svidzinski, T. I. E., ... & Yamada-Ogatta, S. F. Utilização de um meio cromogênico e da técnica de semi-nested PCR para identificação de espécies de *Candida*. *Semina: Ciênc Biol Saúde*, 27(2), 125-132.2006.

Duarte, M.C.T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. Construindo a história dos produtos naturais, Multiciência, out, 2006.

Embrapa.http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/especies_arboreas_brasileiras/arvore/CONT000fuvfsv3x02wyiv80166sqfi5balq6.html- consultado: 22/05/2016.

Estrada-Barraza, D., Martínez, A. D., Flores-Padilla, L., Mendoza-De Elias, R., & Sánchez-Vargas, L. O. Comparación entre métodos convencionales, ChromAgar Candida® y el método de la PCR para la identificación de especies de Candida en aislamientos clínicos. **Rev Iberoam Micol**, 28(1), 36-42. 2011.

Everis, I. Injured bacteria in foods. *Nutrition and Food Science*. 31(2): 84-87, 2001.
EXCOFFIER, Laurent; SMOUSE, Peter E.; QUATTRO, Joseph M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v. 131, n. 2, p. 479-491, 1992.

Ferreira, A. W. & Ávila, S. L. M. **Diagnóstico laboratorial**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 443p, 2001.

Ferreira, G. C.; Gomes, J. I.; Hopkins, M. J. G. Estudo anatômico das espécies de leguminosae comercializadas no Estado do Pará como angelim. **Acta Amazonica**, Manaus-AM, v. 34, p. 37-398, 2004.

Fidel, P. L. Jr. History and update on host defense against vaginal candidiasis. **Am J Reprod Immunol**. 57(1):2-12, 2006.

Fontana, R. Frequência de leveduras em fluido vaginal de mulheres com e sem suspeita clínica de candidíase vulvovaginal. **Rev Bras Ginecol Obstet**, 31(6), 300-4. 2009.

Forbes, B.A., Sahm, D. F., Weisfeld, A. S. Bailey & Scott's **Diagnostic Microbiology**. Mosby, 2002.

Formiga, M.D.; Gottlieb, O.R.; Mendes, P. M.; Koketsu, M.; Almeida, M.E.L.; Pereira, M.O.S.; Magalhães, M.T. Constituintes of Brazilian Leguminosae. **Phytochemistry**, v.14,n.3, p.828, 1975.

Fornari, G., Vicente, V. A., Gomes, R. R., Muro, M. D., Pinheiro, R. L., Ferrari, C., ... & Queiroz-Telles, F. Susceptibility and molecular characterization of Candida species from patients with vulvovaginitis. **Braz J Microbiol**, 47(2), 373-380. 2016.

Fornari, G., Vicente, V. A., Gomes, R. R., Muro, M. D., Pinheiro, R. L., Ferrari, C., ... & Queiroz-Telles, F. Susceptibility and molecular characterization of Candida species from patients with vulvovaginitis. **Braz J Microbiol**, 47(2), 373-380. 2016.

Fuzér, L.; Souza, I. IBAMA dá início a núcleo de plantas medicinais. **Bionotícias**, Rio de Janeiro, n. 57, p.6-7, jan./fev. 2003.

Galle, L. C., & Gianinni, M. J. S. M. Prevalência e susceptibilidade de leveduras vaginais. **J Bras Patol Med Lab**, 40(4), 229-36. 2004.

Garcia, A. L. & Siqueira, A. M. Isolamento, identificação e sorotipagem de candida albicans a partir de secreção vaginal. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, São Paulo. 30(4): 270-273, Aug. 1988.

Garvey, E. P., Hoekstra, W. J., Schotzinger, R. J., Sobel, J. D., Lilly, E. A., & Fidel, P. L. Efficacy of the clinical agent VT-1161 against fluconazole-sensitive and-resistant Candida

albicans in a murine model of vaginal candidiasis. **Antimicrob Agents Chemother**, 59(9), 5567-5573. 2015.

Gary, P. M.; David, C. C.; Derek, J. S. *Candida albicans* versus *Candida dubliniensis*: Why Is *C. albicans* More Pathogenic? **Int J Microbiol**, 2012.

Giolo, M. P. & Svidzinski, T. I. E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnostico laboratorial da candidemia. **J Bras Patol Med Lab**. 46(3): 225-234, 2010.

Gow, N. R. Multiple mating strategies. *Nature*. 494: 45-46, 2013.

Grenand, P.; Moretti, C.; Jacquemin, H. **Pharmacopées traditionnelles em Guyane**. Creoles, Palikur, Wayãpi. Paris: Institut François de Recherche Scientifique pour le Developpement en Coopération, ORSTOM, 186p, 1987.

Gunther, L. S. A., Martins, H. P. R., Gimenes, F., Abreu, A. L. P. D., Consolaro, M. E. L.; Svidzinski, T. I. E. Prevalence of *Candida albicans* and non-*albicans* isolates from vaginal secretions: comparative evaluation of colonization, vaginal candidiasis and recurrent vaginal candidiasis in diabetic and non-diabetic women. **Sao Paulo Med J**, 132(2): 116-120, 2014.

Guzel, A. B. & Ilkit, Macit. The epidemiology, pathogenesis, and diagnosis of vulvovaginal candidosis: a mycological perspective. **Crit Rev Microbiol**, 37(3): 250-261, 2011.

Haefner, H. K. Current evaluation and management of vulvovaginitis. **Clin Obstet Gynecol**. 42(2):184-95, 1999.

Hedayati, M. T., Taheri, Z., Galinimoghadam, T., Aghili, S. R., Cherati, J. Y., & Mosayebi, E. Isolation of different species of candida in patients with vulvovaginal candidiasis from Sari, Iran. **Jundishapur J Microbiol**, 8(4) 2015.

Higashi, C. M., Takashima, F. H., Rechenchoski, D. Z., Stipp-Abe, A. T., Vespero, E. C., Quesada, R. M. B., & Pelisson, M. Comparação do sistema de identificação automatizado Vitek 2 e PCR-ITS para caracterização das espécies dos isolados clínicos de *Candida* spp. **Semina: Ciênc Biol Saúde**, 36(1Supl), 233-242. 2015.

Holanda, A. A. R.; Fernandes, A. C.S.; Bezerra, C. M.; Ferreira, M. A. F.; Holanda, M. R. R.; Holanda, J. C. P.; Milan, E. P. Candidíase vulvovaginal: sintomatologia, fatores de risco e colonização anal concomitante. **Rev Bras Ginecol Obstet.**; 29(1):3-9, 2007.

Hospenthal, D. R., Murray, C. K., Beckius, M. L., Green, J. A., & Dooley, D. P. Persistence of pigment production by yeast isolates grown on CHROMagar *Candida* medium. **J Clin Microbiol**, 40(12), 4768-4770. 2002.

Hou, X., Xiao, M., Chen, S. C., Wang, H., Cheng, J. W., Chen, X. X., ... & Xu, Y. C. *Candida haemulonii* species complex: identification and antifungal susceptibility profiles of clinical isolates from a multi-center study in China. **J Clin Microbiol**, JCM-01492. 2016.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE.
http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/estimativa2015/estimativa_tcu.shtm.
Pesquisado em 22/05/2016.

Jones, T.; Federspiel, N. A.; Chibana, H.; Dungan, J.; Kalman, S.; Magee, B. B.; Newport, G.; Thorsetenson, Y. R.; Agabian, N.; Magee, P. T.; Davis, R. W.; Scherer, S. The diploid genome sequence of *Candida albicans*. **PNAS**. 101: 7329-7334, 2004.

Khan, M. S. A, et al. Virulence and Pathogenicity of Fungal Pathogens with Special Reference to *Candida albicans*. Combating Fungal Infections. In: AHMAD, I., ET AL. **Combating Fungal Infection: problems and remedy**. Berlin: Springer, p.21 – 45, 2010.

Koneman, E. W. Micologia. In: Koneman, E. W. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 5. ed. São Paulo: MEDSI; 995-1078, 2001.

Lacaz, C.S.; Porto, E.; Martins, J. E. C.; Heins-Vaccari, E. M.; Takahashi De Melo, N. – **Tratado de Micologia médica**. 9. ed. São Paulo, Sarvier, 2002. 1104p. ilustr. ISBN 85-7378-123-8.

Lamarão Silva, C. T. **Avaliação biológica dos extratos obtidos das sementes de *Vatairea guianensis*(Aublet)**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Pará, 2011.

Lasergene. **User's guide: a manual for the Lasergene System: biocomputing software for windows**. Madson, 253p. 1994.

Li, D., Li, Q., Liu, C., Lin, M., Li, X., Xiao, X., & Zhou, H. Efficacy and safety of probiotics in the treatment of *Candida* associated stomatitis. **Mycoses**, 57(3), 141-146. 2014.

Liguori, Giorgio et al. Comparison between multiplex PCR and phenotypic systems for *Candida* spp. identification. **The New Microbiol**, 33(1): 63, 2010.

Lima, E. O. **Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica: Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, p. 479-499, 2001.

Lima-Neto, R., Santos, C., Lima, N., Sampaio, P., Pais, C., & Neves, R. P. Application of MALDI-TOF MS for requalification of a *Candida* clinical isolates culture collection. **Braz J Microbiol**, 45(2), 515-522, 2014.

Linhares, I. M., Witkin, S. S., Miranda, S. D., Fonseca, A. M., Pinotti, J. A., & Ledger, W. J. Differentiation between women with vulvovaginal symptoms who are positive or negative for *Candida* species by culture. **Infect Dis Obstet Gynecol**, 9(4), 221-225, 2001.

López, C., Giro, L., Ramos, L., Ramadán, S., & Bulacio, L. Comparación de diferentes métodos para la identificación de especies del género *Candida*. **Rev Argent Microbiol**, 37, 16-21. 2005.

Machado, T.F. & Borges, M. F. **Injúria microbiana em alimentos**. Embrapa Agroindústria Tropical, 2013.

Magalhães, Y. C., Bomfim, M. R. Q., Melônio, L. C., Ribeiro, P., Cosme, L. M., Rhoden, C. R., & Marques, S. G. Clinical significance of the isolation of *Candida* species from hospitalized patients. **Braz J Microbiol**, 46(1), 117-123. 2015.

Mahmoudi, R. M.; Zafarghandi, A. S.; Amel, Z. M.; Tavallaee M.; Mirdamadi, Y. Identification of *Candida* species associated with vulvovaginal candidiasis by multiplex PCR. **Infect Dis Obstet Gynecol.** 2012;2012:872169.

Malanga, M.A. Saúde da mulher: vulvovaginite. **Avimed Saúde**, abr, 2005.

Martins N, B. L., Henriques M, Silva S. Activity of phenolic compounds from plant origin against *Candida*. **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 648-670, 2015.

Menezes, R. D. P., Ferreira, J. C., Moreira, T. D. A., Malvino, L. D. S., Araujo, L. B. D., Röder, D. V. D. D. B., ... & Pedroso, R. D. S. Frequency of *Candida* species in a tertiary care hospital in Triângulo Mineiro, Minas Gerais State, Brazil. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, 57(3), 185-191. 2015.

Mímica, L. M. J., Ueda, S. M. Y., Martino, M. D. V., Navarini, A., & Martini, I. J. Diagnóstico de infecção por *Candida*: avaliação de testes de identificação de espécies e caracterização do perfil de suscetibilidade. **J Bras Patol Med Lab**, 45(1), 17-23. 2009.

Monteiro, J.; Macedo, E.M.S.;Silva, M. G. V. **Extração seletiva de crisofanol em *Vatairea macrocarpa* Ducke**. 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2009.

Moreira, D. **Perfil fenotípico, diferenciação molecular, produção de enzimas e sensibilidade aos antifúngicos de amostras de leveduras isoladas em três grupos amostrais**: mulheres assintomáticas, com candidíase vulvovaginal primária e recorrente. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2012.

Morschhäuser, J. Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi. **Fungal Genetics and Biology** 47:94–106. 2010.

Mukasa, K. J., Herbert, I., Daniel, A., Sserunkuma, K. L., Joel, B., & Frederick, B. Antifungal Susceptibility Patterns of Vulvovaginal *Candida* species among Women Attending Antenatal Clinic at Mbarara Regional Referral Hospital, South Western Uganda. **British Microbiol Res J**, 5(4), 322. 2015

Nascimento, L. A. Mulheres de Moçambique: impressões subversivas no romance Niketche de Paulina Chiziane. **Rev Athena**, ano, 1. 2013.

National Committee For Clinical Laboratory Standards. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, Approved Standard M27-A2**. 2nd ed., 2002.

Neufeld, P. M. **Caracterização taxonômica e susceptibilidade a antifúngicos de leveduras isoladas de infecção hospitalar**. 2009. 254 f. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária)- Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2009.

Neufeld, P. M. et al. Nosocomial candidiasis in Rio de Janeiro State: Distribution and fluconazole susceptibility profile. **Braz J Microbiol**, v. 46, n. 2, p. 477-484. 90. 2015.

Odds, F. C., & Bernaerts, R. I. A. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. **J Clin Microbiol**, 32(8), 1923-1929.1994.

Oliveira, C., N., Rampazzo, R. D. C. P., Minari, M. C., Corrêa, P. R. C., Carneiro, M., Svidzinski, T. I. E., & Yamada-Ogatta, S. F. Utilização de um meio cromogênico e da técnica de semi-nested PCR para identificação de espécies de *Candida*. **Semina: Cienc Biol Saúde**, 27(2), 125-132. 2006.

Oliveira, H. V. C. **Desenvolvimento de marcadores moleculares para identificação de isolados clínicos de *Candida spp*** - Manaus: UFAM, 2007. 100 f.; il. color. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) — Universidade Federal do Amazonas, 2007.

Oliveira, J. C. **Diagnóstico micologia por imagens**. Rio de Janeiro, 104 págs. 2014.

Olowe, O., Makanjuola, O., Olowe, R., & Adekanle, D. Prevalence of vulvovaginal candidiasis, trichomoniasis and bacterial vaginosis among pregnant women receiving antenatal care in Southwestern Nigeria. **Eur J Microbiol Immunol**, 4(4), 193-197. 2014.

Oms – Organização Mundial da Saúde. **Quality control methods for medicinal plant materials**. 88p,1992.

Otobelli, et al., Estudo fitoquímico e atividade e atividade leishmanicida de *Vatairea guianensis* Aubl (Fabaceae). XXI Congresso Brasileiro de Parasitologia, II Encontro de Parasitologia do Mercosul, Sociedade Brasileira de Parasitologia, **Rev Patol Trop**, v.38,supl.2, jul-set..2009.

Otobelli, Ivonei et al. Estudo químico de duas plantas medicinais da amazônia: *Philodendron scabrum* k. Krause (araceae) e *Vatairea guianensis* aubl. (fabaceae). **Acta Amaz.** 41(3), 2011.

Panizo, M. M.; Revia´Kina, V.; Dolande, M.; Selgrad, S. *Candida spp. in vitro* susceptibility profile to four antifungal agents. Resistance surveillance study in Venezuelan strains. **MedMycol** 47:137–43, 2009.

Patel, R., Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in clinical microbiology. **Clin. Infect. Dis.** 57,564-572, 2013.

Peixoto, J; Rocha, M.G.; Nascimento, R. T. O.; Moreira, V. V.; Kashiwabara, T. B. C. *Candidíase* - uma revisão de literatura. **BJSCR**, 8(2): 75-82, 2014.

Pemán, J.; Martín-Manzuelos, E.; Rubio-Calvo, M. C. Guía práctica de Identificación y Diagnóstico en micología clínica. Bilbao: **Rev Iberoam Micol**, 2001.

Pereira, C. A., Domingues, N., Araújo, M. I. D. S. A., Junqueira, J. C., Back-Brito, G. N., & Jorge, A. O. C. Production of virulence factors in *Candida* strains isolated from patients with denture stomatitis and control individuals. **Diag Microbiology Infect Dis**, 85(1), 66-72. 2016. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.01.014. 2016.

Pfaller M. A.; Diekema, D. J.; Colombo, A. L.; et al. *Candida rugosa*, an Emerging Fungal Pathogen with Resistance to Azoles: Geographic and Temporal Trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program. **J Clin Microbiol**. 44(10):3578-3582. 2006.

Pfaller, M. A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. **Am J Med**, v. 125, n. 1 Suppl, p. S3-13, Jan. 2012.

Posteraro, B. et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based method for discrimination between molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **J Clin Microbiol**, 50(7): 2472-6, 2012.

Posteraro, B., De Carolis, E., Vella, A., & Sanguinetti, M. MALDI-TOF mass spectrometry in the clinical mycology laboratory: identification of fungi and beyond. **Expert Rev Proteom**, 10(2), 151-164. 2013.

Pozzatti, P. **Susceptibilidade de *Candida* spp. sensíveis e resistentes ao fluconazol frente a óleos essenciais extraídos de condimentos**. Dissertação de Mestrado. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2007.

Ragunathan, L., Poongothai, G. K., Sinazer, A. R., Kannaiyan, K., Gurumurthy, H., Jaget, N., & Kuthalaramalingam, S. Phenotypic characterization and antifungal susceptibility pattern to fluconazole in *Candida* species isolated from vulvovaginal candidiasis in a tertiary care hospital. **JCDR**, 8(5), DC01. 2014.

Ragunathan, L., Poongothai, G. K., Sinazer, A. R., Kannaiyan, K., Gurumurthy, H., Jaget, N., & Kuthalaramalingam, S. Phenotypic characterization and antifungal susceptibility pattern to fluconazole in *Candida* species isolated from vulvovaginal candidiasis in a tertiary care hospital. **JCDR**, 8(5), DC01. 2014.

Ragunathan, L., Poongothai, G. K., Sinazer, A. R., Kannaiyan, K., Gurumurthy, H., Jaget, N., & Kuthalaramalingam, S. Phenotypic characterization and antifungal susceptibility pattern to fluconazole in *Candida* species isolated from vulvovaginal candidiasis in a tertiary care hospital. **JCDR**, 8(5), DC01. 2014.

Ramos, L. S., Figueiredo-Carvalho, M. H. G., Barbedo, L. S., Ziccardi, M., Chaves, A. L., Zancopé-Oliveira, R. M., ... & Santos, A. L. *Candida haemulonii* complex: species identification and antifungal susceptibility profiles of clinical isolates from Brazil. **J Antimicrobiol Chemother**, 70(1), 111-115. 2015.

Ribeiro, E. L. **Leveduras de *Candida* isoladas da boca de crianças com Síndrome de Down: aspectos feno-genotípicos, relação intrafamiliar e perfil de imunoglobulinas**. 2008. 129 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

Richter, S. S., Galask, R. P., Messer, S. A., Hollis, R. J., Diekema, D. J., & Pfaller, M. A. Antifungal susceptibilities of *Candida* species causing vulvovaginitis and epidemiology of recurrent cases. **J Clin Microbiol**, 43(5), 2155-2162, 2005.

Rodrigues, D. V. & Lima, R.A. Estudo Fitoquímico e o Efeito do Extrato Etanólico das Folhas de *Solanum Grandiflorum* Ruiz sobre *Candida albicans* in vitro. **Rev Saúde Pesq**, 7(2): 183-189, 2014.

Rodrigues, M. T.; Gonçalves, A. C.; Alvim, M. C.; Castellano Filho, D. S.; Zimmermann, J. B.; Silva, V. L.; Diniz, C. G. Associação entre cultura de secreção vaginal, características sociodemográficas e manifestações clínicas de pacientes com diagnóstico de candidíase vulvovaginal. **Rev Bras Ginecol Obstet.**; 35(12):554-61,2013.

Rohlf, F. J. Comparative methods for the analysis of continuous variables: geometric interpretations. **Evolution**, 55(11), 2143-2160. 2001.

Rosa, M. I. & Rumel, D. Fatores associados à candidíase vulvovaginal: estudo exploratório. **Rev Bras Ginecol Obstet.**; 26(1):65-70. 2004.

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

Sá, M. C. N., Sousa, H. R. D., Amaro, C. S. O., Pinheiro, D. N., Oliveira, M. M. M. D., & Pinheiro, M. D. C. N. (2014). Isolamento de *Candida* no esfregaço cérvico-vaginal de mulheres não gestantes residentes em área ribeirinha do Estado do Maranhão, Brasil. **Rev Pan-Amazônica Saúde**, 5(1), 25-34. 2012.

Santana, D. P.; Ribeiro, E. L.; Menezes, A. C. S.; Naves, P. L. **Rev. Ciênc. Méd. Biol.**, Salvador, 12(2):.229-233, 2013.

Santos C, Lima N, Sampaio P, Pais. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight intact cell mass spectrometry (MALDI-TOF-ICMS) to detect emerging pathogenic *Candida* species. **Diagn Microbial Infect Dis** 71:304-308. 2011.

Shi, X. Y., Yang, Y. P., Zhang, Y., Li, W., Wang, J. D., Huang, W. M., & Fan, Y. M. Molecular identification and antifungal susceptibility of 186 *Candida* isolates from vulvovaginal candidiasis in southern China. **Journal of medical microbiology**, 64(4), 390-393. 2015.

Sidrim, J. J. C. & Moreira, J. L. B. **Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. cap. 09. 77-88, 1999.

Silva, C. T. L. **Avaliação biológica dos extratos obtidos das sementes de *Vatairea guianensis* (Aublet)**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em ciências Farmacêuticas, área de concentração Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, 2011.

Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D. W., & Azeredo, J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiol Rev**, 36(2), 288-305. 2012.

Silva, Z. D. L. **Ocorrência, diagnóstico molecular e resistência a antifúngicos de *Candida* sp. de infecções vaginais em Portugal e Cabo Verde**. Tese para obtenção de Doutor pela Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa. Portugal, 2013.

Sobel, J. D. Vulvovaginal candidosis. *Lancet.*; 369(9577), 2010.

Sobel, Jack D. Vulvovaginal candidosis. **The Lancet** 369.9577. 1961-1971. 2007.

Sosa, K.G.; Villareal,N.A.; Peña,P.L.; Peña, L.M.R. Crysophanol, uma antraquinona antimicrobiana do extrato de raiz de *Colubrina greggii*. **J.Mex.Chem.Soc**, v.50, n.2,p.76-78. 2006.

Souza, P. C.; Filho, A. S.; Souza, E. D.; Mello, M.; Pereira, W.; Svidizinski, M. E. Lopes-Consolaro. Prevalence of *Candida* sp. in the cervical–vaginal cytology stained by Harris–Shorr. **Arch Gynecol Obstet** v. 279, p. 625–629, 2009.

Spolidorio, D. M. P.; Boriollo, M. F. G.; Estrela, C.; Spolidorio, L. C. Diferentes métodos fenotípicos para isolamento e identificação de espécies de *Candida*. **Robrac**, 18(45), 2009.

Stoppa, M. A.; Casemiro, L. A., Vinholis, A.H.V.; Cunha, W.R.; Martins, C.H. Estudo comparativo entre as metodologias preconizadas pelo CLSI e pelo EUCAST para avaliação da atividade antifúngica. **Quim. Nova**, 32(2): 498-502, 2009.

Thompson, Julie D.; Higgins, Desmond G.; Gibson, Toby J. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res**, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.

Trifinopoulos, J., Nguyen, L. T., von Haeseler, A., & Minh, B. Q. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. **Nucl Acids Res**, gkw256. 2016.

Trost, A., Graf, B., Eucker, J., Sezer, O., Possinger, K., Göbel, U. B., & Adam, T. Identification of clinically relevant yeasts by PCR/RFLP. **J Microbiol Methods**, 56(2), 201-211. 2004.

Valle, G. C.; Rende J. C.; Okura, M. H. Estudo da incidência do gênero *Candida* em Hospital Público Universitário. **NewsLab**. 101: 202-222, 2010.

Vieira, Sonia – Bioestatística, Tópicos Avançados – Rio de Janeiro. 2.ed. – RJ: Elsevier, 2004.

Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, and M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucl Acids Res**. 23:4407–4414.

White, T. J.; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand D, Sninsky J, White T (eds.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**: 1990; p.315-322.

X.P. Liu, S.R. Fan, Y.T. Peng, H.P. Zhang. Species distribution and susceptibility of *Candida* isolates from patient with vulvovaginal candidiasis in Southern China from 2003 to 2012. **J Med Mycol**, v.24, n.2, p.106-111, 2012.

Zhang, L., Zhou, S., Pan, A., Li, J., & Liu, B. Surveillance of antifungal susceptibilities in clinical isolates of *Candida* species at 36 hospitals in China from 2009 to 2013. **Int J Infect Dis**, 33, 1-4. 2015.

Zisova, L. G., Chokoeva, A. A., Amaliev, G. I., Petleshkova, P. V., Miteva-Katrandzhieva, T. M., Krasteva, M. B., ... & Ivanova, Z. V. Vulvovaginal Candidiasis in Pregnant Women and its Importance for *Candida* Colonization of Newborns. **Folia Medica**, 58(2), 108-114, 2016.

Zita, D. L. **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, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, 2013.

ANEXOS

ANEXO 01- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezada Colaboradora,

Você está sendo convidada a participar da pesquisa “Caracterização Molecular, Taxonomia Polifásica, Susceptibilidade a Antifúngicos e Extratos das Sementes de *Vatairea guianensis* em Isolados Clínicos de *Candida* sp. na cidade de Manaus”, sob a responsabilidade da Dra. Andreia Ferreira de Souza, que irá investigar a presença do fungo chamado de *Candida* sp. na secreção vaginal, este fungo pode causar coceira, corrimento tipo leite “coalhado” e sinais de inflamação na vagina e na vulva, com dificuldade de tratar por resistência aos medicamentos atuais. Portanto o objetivo é avaliar a presença desse fungo na vagina e se apresenta resistência aos medicamentos atuais durante o tratamento.

PARTICIPAÇÃO NA PESQUISA: Ao participar desta pesquisa você será submetida à coleta de secreção vaginal durante o exame ginecológico na coleta para o exame preventivo.

1.0 RISCOS E DESCONFORTOS: O procedimento utilizado, coleta de secreção vaginal, poderá trazer algum desconforto como incomodo durante a coleta, que será realizada como uma coleta de preventivo (Papanicolau). O tipo de procedimento apresenta um risco mínimo, que será reduzido pelo cuidado na coleta.

2.0 BENEFÍCIOS: Os benefícios esperados com o estudo são:

- conhecer os tipos mais comuns de fungos que possam causar a infecção vulvovaginal, para que futuramente possamos estabelecer medidas de atenção e prevenção;
- oferecer a paciente à oportunidade de diagnóstico precoce;
- conhecer os fatores de risco e o perfil da paciente de nossa cidade portadora dessa infecção, para que possamos identificar durante o atendimento ginecológico pacientes de potencial risco para a infecção;
- conhecer o perfil de susceptibilidade de *Candida* spp. Aos remédios antifúngicos.

4.0 FORMAS DE ASSISTÊNCIA: Se você precisar de algum (TRATAMENTO, ORIENTAÇÃO, ENCAMINHAMENTO ETC.) por se sentir prejudicado por causa da pesquisa, ou se o pesquisador descobrir que você tem alguma coisa que precise de tratamento, você será encaminhado(a) pela Dra. Andreia Ferreira de Souza, para o Serviço de Ginecologia no Ambulatório Universitário Araújo Lima, Avenida Aripuanã, nº4 – Praça 14 de Janeiro – Hospital Universitário Getúlio Vargas (HUGV) – Manaus/AM. Contatos: (92) 3305-4807

5. CONFIDENCIALIDADE: Todas as informações que a Sra. nos fornecer ou que sejam conseguidas por exames, avaliações e entre outros serão utilizadas somente para esta pesquisa. Seus DADOS PESSOAIS, DADOS DE EXAMES LABORATORIAIS, AVALIAÇÕES

FÍSICAS ficarão em segredo e o seu nome não aparecerá em lugar nenhum, nem quando os resultados forem apresentados.

6. ESCLARECIMENTOS: Se tiver alguma dúvida a respeito da pesquisa e/ou dos métodos utilizados na mesma, pode procurar a qualquer momento o pesquisador responsável.

Nome do pesquisador responsável: ANDREIA FERREIRA DE SOUZA
Endereço: av. carvalho leal, 1777
Telefone para contato: 38784350

7. RESSARCIMENTO DAS DESPESAS: Caso a Sra. aceite participar da pesquisa, não receberá nenhuma compensação financeira.

8. CONCORDÂNCIA NA PARTICIPAÇÃO: Se o(a) Sr.(a) estiver de acordo em participar deverá preencher e assinar o Termo de Consentimento Pós-esclarecido que se segue, e receberá uma cópia deste Termo.

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, o Sr.(a) _____, portador(a) da cédula de identidade _____, declara que, após leitura minuciosa do TCLE, teve oportunidade de fazer perguntas, esclarecer dúvidas que foram devidamente explicadas pelos pesquisadores, ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido e, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, firma seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO em participar voluntariamente desta pesquisa.

E, por estar de acordo, assina o presente termo.

Manaus, _____ de _____ de _____.

Assinatura do participante / ou representante legal

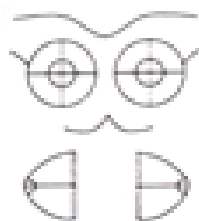
Assinatura do Pesquisador

ANEXO 2- FICHA CLÍNICA DA MULHER

FICHA CLINICA DA MULHER					
Data: / /		Prontuário:		Profissão:	
Nome:					
Endereço:					
Cidade:		UF:		CEP:	
Idade:	☐ < 15 ☐ Nenhuma	☐ 15 - 35 ☐ 1º Grau	☐ > 35 ☐ 2º Grau	☐ Superior	
Escolaridade:				☐ Solteira (com união estável)	
Estado Civil/União:	☐ Casada ☐ Outra:	☐ Solteira (sem união estável)		☐ Solteira (com união estável)	
Cor/Raça Natural:	☐ Branca	☐ Negra	☐ Parda	☐ Indígena	☐ Asiática
Queixa:					
HPMA:					
HDA: Cardiovascular: Gastrointestinal: Urinário: Respiratório:					
AIF:	Cardiovascular: Câncer: Outros:	Endócrino/Metabólico: Infecção:			
AP:	Clinicos: Cirurgias: Tabagismo: Medicações: antibiótico Outros: antifúngico	Etílico:			
AM:	Menarca: Dismenorréia: Menopausa: natural () cirúrgica ()	ciclos:	DUM: TPM:		
			Última RS:		
AS:	1ª Coito: Libido: Anticoncepção:	Nº parceiros: Orgasmos:			
Obs: uso roupas íntimas/tendão/fardamento: diário (S) (N) ou qual frequência?					
AG:	Comimento: Candidíase vulvovaginal:	Cirurgia:			
AO:	G: P:	A: Último:	PNL:	PC: Peso RN (maior):	PF:
	1º parto: Amamentação:				
Exame					
Peso:	Alt:	PA:	IMC:		
Ap. cardiovascular:		Ap. respiratório:			
MMI:		Outros:			

Abdome:

MAMAS



Insp. Estática

Insp. Dinâmica

Palpação:

Expressão:

Axilas:

OGI: TOQUE



Vaginar

Colo:

Útero:

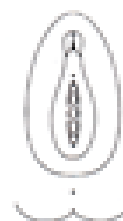
AN. D:

NA. E:

Paramétricos:

Retor:

OGE



Pilificação:

Lábios:

Clitoris:

Uretra:

Gl. Bartholin:

Himen:

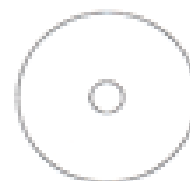
Procidência PVA:

PVP:

Períneo:

Fenda urin:

ESPECULAR



Vaginar

Colo:

Cont. vaginal:

ANEXO 3- Teste de suscetibilidade com antifúngicos convencionais nas cepas de *Candida* sp. isolados do exsudato vaginal na concentração de sensibilidade, segundo ICSL (2008).

Linhagens	Itraconazol (C= 0,15 µg/mL)	Nistatina (C= 2 µg/mL)	Fluconazol (C= 8 µg/mL)	Cetoconazol (C= 4 µg/mL)
AA01	R	R	R	R
AA02	R	R	R	R
AA03	R	R	R	R
AA04	R	R	R	R
AA05	R	R	R	R
AA06	R	R	R	R
AA07	R	R	R	R
AA08	R	R	R	R
AA09	R	R	R	R
AA10	R	R	R	R
AA11	R	R	R	R
AA12	R	R	R	R
AA13	R	R	R	R
AA14	R	R	R	R
AA15	R	R	R	R
AA16	R	R	R	R
AA17	R	R	R	R
AA18	R	R	R	R
AA19	R	R	R	R
AA20	R	R	R	R
AA21	R	R	R	R
AA22	R	R	R	R
AA23	R	R	R	R
AA24	R	R	R	R
AA25	R	R	R	R
AA26	R	R	R	R
AA27	R	R	R	R
AA28	R	R	R	R
AA29	R	R	R	R
AA30	R	R	R	R
AA31	R	R	R	R
AA32	R	R	R	R
AA33	R	R	R	R
AA34	R	R	R	R
AA35	R	R	R	R
AA36	R	R	R	R
AA37	R	R	R	R

AA38	R	R	R	R
AA39	R	R	R	R
AA40	R	R	R	R
AA41	R	R	R	R
AA42	R	R	R	R
AA43	R	R	R	R
AA44	R	R	R	R
AA45	R	R	R	R
AA46	R	R	R	R
AA47	R	R	R	R
AA48	R	R	R	R
AA49	R	R	R	R
AA50	R	R	R	R
AA51	R	R	R	R
AA52	R	R	R	R
AA53	R	R	R	R
AA54	R	R	R	R
AA55	R	R	R	R
AA56	R	R	R	R
AA57	R	R	R	R
AA59	R	R	R	R
AA60	R	R	R	R
AA61	R	R	R	R
AA62	R	R	R	R
AA63	R	R	R	R
AA64	R	R	R	R
AA65	R	R	R	R
AA66	R	R	R	R
AA67	R	R	R	R
AA68	R	R	R	R
AA69	R	R	R	R
AA70	R	R	R	R
AA71	R	R	R	R
AA72	R	R	R	R
AA73	R	R	R	R
AA74	R	R	R	R
AA75	R	R	R	R
AA76	R	R	R	R
Controle +	R	R	R	R
Controle -	R	R	R	R

ANEXO 4- Tabela XX: Teste de suscetibilidade com antifúngicos convencionais nas cepas de *Candida* sp. isolados do exsudato vaginal na concentração de resistência, segundo ICSL (2008).

	Itraconazol	Nistatina	Fluconazol	Cetoconazol
Linhagens	(C= 1 µg/mL)	(C= 32 µg/mL)	(C= 64 µg/mL)	(C= 32 µg/mL)
AA01	R	R	R	R
AA02	R	R	R	R
AA03	R	R	R	R
AA04	R	R	R	R
AA05	R	R	R	R
AA06	R	R	R	R
AA07	R	R	R	R
AA08	R	R	R	R
AA09	R	R	R	R
AA10	S	R	R	R
AA11	R	R	R	R
AA12	R	R	R	R
AA13	R	R	R	R
AA14	R	R	R	R
AA15	R	R	R	R
AA16	R	R	R	R
AA17	R	R	R	R
AA18	R	R	R	R
AA19	R	R	R	R
AA20	R	R	R	R
AA21	R	R	R	R
AA22	R	R	R	R
AA23	R	R	R	R
AA24	R	R	R	R
AA25	R	R	R	R
AA26	R	R	R	R
AA27	CI	R	CI	R
AA28	CI	R	R	R
AA29	R	R	CI	CI
AA30	R	R	R	R
AA31	R	R	CI	S
AA32	R	R	R	R
AA33	R	R	R	R
AA34	R	R	R	R
AA35	R	R	CI	R
AA36	R	R	CI	R
AA37	R	R	R	R

AA38	R	R	R	R
AA39	R	R	R	R
AA40	R	R	R	R
AA41	R	R	CI	R
AA42	R	R	CI	R
AA43	R	R	R	R
AA44	R	R	R	R
AA45	R	R	R	R
AA46	R	R	R	R
AA47	R	R	R	R
AA48	R	R	R	R
AA49	R	R	R	R
AA50	R	R	R	R
AA51	R	R	R	R
AA52	R	R	R	R
AA53	R	R	R	R
AA54	R	R	R	R
AA55	R	R	R	R
AA56	R	R	R	R
AA57	R	R	R	R
AA58	R	R	R	CI
AA59	R	R	R	R
AA60	R	R	R	R
AA61	R	R	R	R
AA62	R	R	R	R
AA63	R	R	R	R
AA64	R	R	R	CI
AA65	R	R	R	R
AA66	R	R	R	R
AA67	R	R	R	R
AA68	R	R	R	R
AA69	R	R	R	R
AA70	R	R	R	R
AA71	R	R	R	R
AA72	R	R	R	R
AA73	R	R	R	R
AA74	R	R	R	R
Controle +	R	CI	R	R
Controle -	R	R	R	R

Quadro 1: R= Cepas resistentes; S= Cepas sensíveis; CI= Cepas com crescimento inibido

TABELA GERAL DOS MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO

ANEXO 5- Descrição do resultado da identificação pelos 05 diferentes métodos utilizados nos isolados de *Candida* sp.

COD.	AGAR-FUBA	AUXONOGRAMA	CHROMOAGAR	MALDI-TOF	MOLECULA R
AA01	ALBICANS	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> (1.701)	<i>C. albicans</i>
AA02	NÃO ALBICANS	<i>C. lusitaniae</i>	<i>C. parapsilosis</i>	N.I.	<i>C. parapsilosis</i>
AA03	ALBICANS	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> (1.964)	<i>C. albicans</i>
AA04	NÃO ALBICANS	<i>C. lusitaniae</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i> (1.887)	<i>C. parapsilosis</i>
AA05	NÃO ALBICANS	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i> (AZUL)	<i>C. tropicalis</i> (1.818)	<i>C. tropicalis</i>
AA06	NÃO ALBICANS	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i> (1.963)	<i>C. parapsilosis</i>
AA07	ALBICANS	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	N.I.	<i>C. albicans</i>
AA08	NÃO ALBICANS	<i>C. lusitaniae</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i> (1.968)	<i>C. parapsilosis</i>
AA09	NÃO ALBICANS	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	N.I.	<i>C. parapsilosis</i>
AA10	NÃO ALBICANS	INDEFINIDA	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i> (1.873)	<i>C. glabrata</i>
AA11	NÃO ALBICANS	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i> (1.861)	<i>C. parapsilosis</i>
AA12	ALBICANS	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> (1.779)	<i>C. albicans</i>
AA13	NÃO ALBICANS	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i> (1.993)	<i>C. parapsilosis</i>
AA14	ALBICANS	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> (1.892)	<i>C. albicans</i>
AA15	NÃO ALBICANS	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i> (1.990)	<i>C. tropicalis</i>
AA16	ALBICANS	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> (1.752)	<i>C. albicans</i>
AA17	ALBICANS	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> (1.846)	<i>C. albicans</i>
AA18	ALBICANS	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> (1.765)	<i>C. albicans</i>
AA19	ALBICANS	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> (1.714)	<i>C. albicans</i>
AA20	NÃO ALBICANS	INDEFINIDO	INDEFINIDO	N.I.	<i>C. parapsilosis</i>
AA21	NÃO ALBICANS	INDEFINIDO	INDEFINIDO	<i>C. albicans</i> (1.707)	<i>C. parapsilosis</i>
AA22	NÃO ALBICANS	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i> (1.932)	<i>C. parapsilosis</i>
AA23	NÃO ALBICANS	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>	N.I.	<i>C. lusitanea</i>
AA24	ALBICANS	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	N.I.	<i>C. albicans</i>
AA25	ALBICANS	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	N.I.	<i>C. albicans</i>
AA26	ALBICANS	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i> (1.987)	<i>C. albicans</i>
AA27	NÃO ALBICANS	<i>C. rugosa</i>	INDEFINIDO	<i>C. parapsilosis</i> (1.913)	<i>C. haemolius</i>
AA28	NÃO ALBICANS	<i>C. parapsilosis</i>	INDEFINIDO	N.I.	<i>C. parapsilosis</i>
AA29	NÃO ALBICANS	<i>C. rugosa</i>	INDEFINIDO	<i>C. parapsilosis</i> (1.737)	<i>C. haemolius</i>
AA30	NÃO ALBICANS	<i>C. guilliermondii</i>	INDEFINIDO	N.I.	<i>C. parapsilosis</i>

AA31	NÃO ALBICANS	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. parapsilosis</i> (2.013)	<i>C. parapsilosis</i>
AA32	NÃO ALBICANS	<i>C. tropicallis</i>	<i>C. tropicallis</i>	N.I.	<i>C. haemolinus</i>
AA33	NÃO ALBICANS	<i>C. guilliermondii</i>	INDEFINIDO	<i>C. albicans</i> (1.804)	<i>C. albicans</i>
AA34	ALBICANS	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i> (1.797)	<i>C. albicans</i>
AA35	NÃO ALBICANS	<i>C. rugosa</i>	INDEFINIDO	N.I.	<i>C. parapsilosis</i>
AA36	ALBICANS	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. zeylanoides</i> (1.827)	<i>C. albicans</i>
AA37	ALBICANS	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> (1.705)	<i>C. albicans</i>
AA38	NÃO ALBICANS	<i>C. tropicallis</i>	<i>C. tropicallis</i>	<i>C. albicans</i> (1.739)	<i>C. albicans</i>
AA39	ALBICANS	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> (1.803)	<i>C. albicans</i>
AA40	ALBICANS	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i> (1.892)	<i>C. albicans</i>
AA41	NÃO ALBICANS	<i>C. lusitaniae</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i> (2.004)	<i>C. parapsilosis</i>
AA42	NÃO ALBICANS	<i>C. rugosa</i>	INDEFINIDO	<i>C. parapsilosis</i> (1.970)	<i>C. parapsilosis</i>
AA43	NÃO ALBICANS	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i> teleo] (1.956)	<i>C. krusei</i>
AA44	NÃO ALBICANS	INDEFINIDO	INDEFINIDO	N.I.	TRICHOSPOR ON JAPONICUM
AA45	ALBICANS	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> (1.832)	<i>C. albicans</i>
AA46	NÃO ALBICANS	INDEFINIDO	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i> (1.789)	<i>c. glabrata</i>
AA47	ALBICANS	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> (1.798)	<i>C. albicans</i>
AA48	ALBICANS	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> (1.785)	<i>C. albicans</i>
AA49	ALBICANS	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> (1.740)	<i>C. albicans</i>
AA50	ALBICANS	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	N.I.	<i>C. albicans</i>
AA51	ALBICANS	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	N.I.	<i>C. albicans</i>
AA52	ALBICANS	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> (1.783)	<i>C. albicans</i>
AA53	ALBICANS	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> (1.748)	<i>C. albicans</i>
AA54	ALBICANS	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> (1.812)	<i>C. albicans</i>
AA55	ALBICANS	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> (1.718)	<i>C. albicans</i>
AA56	ALBICANS	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> (1.864)	<i>C. albicans</i>
AA57	ALBICANS	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> (1.834)	<i>C. albicans</i>
AA58	ALBICANS	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> (1.835)	<i>C. albicans</i>
AA59	ALBICANS	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	N.I.	<i>C. albicans</i>
AA60	ALBICANS	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> (1.876)	<i>C. glabrata</i>
AA61	ALBICANS	INDEFINIDO	INDEFINIDO	N.I.	<i>C. albicans</i>
AA62	ALBICANS	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> (1.903)	<i>C. albicans</i>
AA63	ALBICANS	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> (1.853)	<i>C. albicans</i>
AA64	ALBICANS	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> (1.761)	<i>C. albicans</i>
AA65	NÃO ALBICANS	INDEFINIDO	<i>C. glabrata</i>	N.I.	<i>c. glabrata</i>
AA66	ALBICANS	INDEFINIDO	<i>C. albicans</i>	N.I.	<i>C. albicans</i>
AA67	ALBICANS	INDEFINIDO	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> (1.941)	<i>C. albicans</i>
AA68	ALBICANS	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	N.I.	<i>C. albicans</i>
AA69	ALBICANS	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	N.I.	<i>C. albicans</i>
AA70	ALBICANS	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	N.I.	<i>C. tropicallis</i>

AA71	ALBICANS	INDEFINIDO	<i>C. tropicallis</i>	<i>C. albicans</i> (1.719)	<i>C. albicans</i>
AA72	ALBICANS	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	N.I.	<i>C. albicans</i>
AA73	ALBICANS	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> (1.966)	<i>C. albicans</i>
AA74	ALBICANS	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> (1.770)	<i>C. albicans</i>
AA75	ALBICANS	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	N.I.	<i>C. albicans</i>
AA76	ALBICANS	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	N.I.	<i>C. albicans</i>
