



Artigo/Article

Identificação por PCR e sensibilidade a antifúngicos de isolados clínicos vaginais de *Candida* sp

Identification by PCR and antifungal susceptibility of vaginal clinical *Candida* sp isolates

Izabel Almeida Alves¹, Fernanda Pês de Camargo¹ e Letícia Silveira Goulart¹

RESUMO

Introdução: A candidíase vaginal é uma condição que afeta um grande número de mulheres em idade fértil. *Candida albicans* é a espécie mais frequentemente isolada de secreção vaginal, entretanto, outras espécies mais resistentes às drogas antifúngicas podem ser isoladas de amostras clínicas vaginais. **Métodos:** Foram identificadas as espécies de 30 isolados vaginais de *Candida* sp por PCR utilizando o primer universal ITS4 e primers espécie-específicos para *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei*. A sensibilidade destes isolados frente à anfotericina B, fluconazol e voriconazol foi determinada pelo método de macrodiluição M27-A2 do CLSI. **Resultados:** Através dos ensaios de PCR, 28 isolados foram caracterizados como *C. albicans* e 2 isolados apresentaram amplificação para os primers específicos de *C. albicans* e *C. glabrata*. A concentração inibitória mínima para anfotericina B variou de 0,03µg/mL a 0,25µg/mL, para o fluconazol de 0,125µg/mL a 16µg/mL e para o voriconazol de 0,03µg/mL a 0,25µg/mL. **Conclusões:** A identificação de *Candida* ao nível de espécie através de ensaios de PCR deve ser relevante para o gerenciamento clínico destas infecções.

Palavras-chaves: *Candida* sp. Antifúngicos. PCR.

ABSTRACT

Introduction: Vaginal candidiasis is a condition that affects innumerable fertile women. *Candida albicans* is the most frequently isolated species from vaginal discharge; however, other different species that are more resistant to antifungal drugs can be identified in vaginal clinical samples. **Methods:** The species of 30 vaginal *Candida* isolates was identified by PCR using the universal ITS4 primer and species-specific primers for *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* and *C. krusei*. The sensitivity pattern to amphotericin B, fluconazole and voriconazole was assessed using the CLSI M27-A2 macrodilution method. **Results:** The PCR assay revealed 28 *C. albicans* and 2 samples showed amplification for *C. albicans* and *C. glabrata* primers. The minimum inhibitory concentration for amphotericin B ranged from 0.03µg/mL to 0.25µg/mL, for fluconazole from 0.125µg/ml to 16µg/mL and for voriconazole from 0.03µg/mL to 0.25µg/m. **Conclusions:** Identification at *Candida* species level by PCR assay could be relevant for clinical management of these infections.

Key-words: *Candida* sp. Antifungal. PCR.

INTRODUÇÃO

A candidíase vaginal afeta uma elevada proporção de mulheres em idade adulta, estima-se que aproximadamente 75% destas apresentem pelo menos um episódio de vulvovaginite fúngica em sua vida, onde 40 a 50% vivenciam novos surtos e 5% tornam-se recorrentes. A espécie isolada mais frequente de secreções vaginais continua sendo *Candida albicans*, entretanto, outras espécies também estão envolvidas neste tipo de infecção^{1,2}.

O método convencional para identificação de espécies de *Candida* é baseado em teste de assimilação e fermentação de açúcares, análise morfológica da colônia, uso de meios cromogênicos, painéis enzimáticos e sistemas automatizados³⁻⁵. A fim de minimizar as limitações da fenotipagem, métodos de biologia molecular foram adaptados para serem utilizados na identificação de espécies de *Candida*^{6,7}. Goebel⁸ padronizou um PCR espécie-específico para determinar espécie de *Candida*. Este PCR espécie-específico consiste na amplificação das regiões transcritas internas 1 e 2 do gene do rRNA das espécies de *Candida*. Nesta técnica, foram utilizados 7 primers espécie-específicos e 1 primer universal, o qual anela em uma região do gene rRNA 28S. Estes primers identificam espécies de *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. guilliermondii*.

A resistência aos antifúngicos, tem representado um grande desafio para a clínica, frente às dificuldades observadas no tratamento da candidíase. Este aumento pode ser decorrente do uso de terapias seletivas com doses inadequadas ou devido ao uso crescente desses fármacos na profilaxia de infecções fúngicas o que pode condicionar a seleção da resistência clínica⁹. Devido ao aumento das infecções fúngicas oportunistas, o *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) atual *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) estabeleceu um subcomitê para padronizar a metodologia capaz de avaliar a suscetibilidade

1. Curso de Farmácia Bioquímica Clínica, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Santo Ângelo, RS.

Endereço para correspondência: Acad. Izabel Almeida Alves. Campus Universitário/UFSM. Faixa de Camobi Km 9/Prédio 20/Sala 4139, 97105-900 Santa Maria, RS.

Tel: 55 55 3220-8906

e-mail: izabelalmeida@hotmail.com

Recebido para publicação em 14/11/2009

Aceito em 14/05/2010

in vitro das leveduras¹⁰. A determinação da atividade dos antifúngicos possibilita realizar uma correlação entre atividade *in vitro* e resposta clínica, sendo possível desta forma, monitorar a resistência aos antifúngicos no curso do tratamento clínico¹¹. O objetivo do presente trabalho foi identificar as espécies de *Candida* sp isoladas da mucosa vaginal por PCR e avaliar o perfil de suscetibilidade frente a anfotericina B, ao fluconazol e ao voriconazol.

MÉTODOS

Microrganismos estudados e condições de cultivo

Foram utilizados neste estudo trinta isolados vaginais de *Candida* sp e as cepas padrões *Candida albicans* ATCC 18804 e *Candida glabrata* ATCC 2001. Os isolados clínicos foram obtidos de swabs coletados da mucosa vaginal de pacientes com sintomas de candidíase vulvovaginal, atendidas em um serviço de ginecologia do Município de Santo Ângelo, Rio Grande do Sul, no período de fevereiro a maio de 2007. A amostragem não foi populacional e, sim, proveniente do serviço de ginecologia, isto é, por demanda espontânea. As coletas foram realizadas por um médico ginecologista e os critérios empregados para caracterizar infecção foram prurido, edema, eritema na vulva e vagina e presença de fluxo vaginal grumoso aderente às paredes vaginais. As pacientes que participaram da pesquisa apresentaram adesão voluntária, seguida de autorização documentada através da assinatura do termo de consentimento livre esclarecido.

Os swabs da mucosa vaginal foram semeados em ágar Sabouraud (Himedia, Mumbai, Índia) e incubados a 37°C por 48 horas. Colônias isoladas das leveduras foram identificadas de acordo com características macromorfológicas e micromorfológicas pela técnica de microcultivo em ágar Fubá (Oxoid, Basingstok, UK).

Determinação das espécies por PCR

Extração de DNA: o DNA genômico foi extraído conforme o método descrito por Crestani¹². Os isolados foram semeados em ágar Sabouraud por 24-48 horas a 37°C. As colônias foram recolhidas e adicionadas a um microtubo contendo 500µL de tampão de lise celular (NaCl 0,15M; Tris - HCl 50M; EDTA 10mM; SDS - 2%; pH 8) e este foi incubado a 65°C por uma hora. Após, foram adicionados 500µL de fenol/clorofórmio (1:1) e misturado em vórtex por 15 minutos. Este foi centrifugado por 15 minutos a 13000rpm e logo retirado a suspensão aquosa e adicionado a um novo microtubo. A suspensão que continha DNA foi adicionado 400µL de fenol, misturado em vórtex por 5 minutos e centrifugados por 15 minutos a 13000rpm, a fase aquosa formada, foi submetida a outro processo de extração com 400µL de fenol. Ao sobrenadante foi adicionado 1mL de etanol absoluto e este foi armazenado uma hora a -20°C. Após uma centrifugação por 15 minutos a 13000rpm, o sedimento foi lavado com etanol 70% gelado, seco a temperatura ambiente e ressuscitado em 80µL de Tris - EDTA. Ao material foi tratado com 3µL de RNase (Invitrogen, Carlsbad, CA) na concentração de 50µg/mL 30 minutos a 37°C. A qualidade do DNA foi verificada visualmente sob luz UV após eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com 0,5µg/mL de brometo de etídio. Os microtubos contendo o DNA foram armazenados a -20°C.

PCR espécie-específico

O método de PCR utilizado para a identificação das espécies de *Candida* foi baseado no protocolo descrito por Goebel⁸. A reação de amplificação foi realizada em um volume final de 50µL contendo 10 a 20ng de DNA, 10mM Tris HCl pH 8,3/ 50mM KCl, 1,5mM MgCl₂, 0,8mM de desoxirribonucleotídeo, 0,8µL de cada primer (20pmol/µL)

e 1U de Taq platinum DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA). As condições para a realização deste PCR foram: desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos, 35 ciclos de desnaturação de 94°C por um minuto, anelamento de 63°C por um minuto, extensão de 72°C por um minuto e extensão final de 72°C por 5 minutos. Os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose 1% corado com 0,5µg/mL de brometo de etídio e visualizados sob luz UV.

Os primers utilizados foram construídos por Li et al¹³ com base nas sequências disponíveis no GenBank do espaçador transcrito interno (ITS) 1 e 2. São eles: CT (*C. tropicalis*, 5'-AAG AAT TTA ACG TGG AAA CTT A-3'), CA (*C. albicans*, 5'- TCA ACT TGT CAC AGA TTA TT-3'), CK (*C. krusei*, 5'- GAT TTA GTA CTA CAC TGC GTC A-3'), CGLA (*C. glabrata*, 5'- CAC GAC TCG ACA CTT TCT AAT T-3') e o primer universal ITS4 (5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'). Os ensaios de PCR geram produtos de amplificação de 402pb para *C. albicans*, 632pb para *C. glabrata*, 475pb para *C. krusei* e de 149pb para *C. tropicalis*.

Testes de suscetibilidade a antifúngicos

Os testes de suscetibilidade a antifúngicos foram realizados conforme o protocolo M-27A2 do CLSI¹¹, sendo realizada a técnica de macrodiluição frente aos antifúngicos anfotericina B (Wyeth), fluconazol (Biolab Saws) e voriconazol (Pfizer). O meio de cultura utilizado foi o RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) tamponado com ácido morfopropileno sulfônico (MOPS) 1,65M pH 7,2. Os fármacos foram conservados sob refrigeração e ao abrigo da luz até o momento do uso. As diluições dos antifúngicos foram realizadas com o meio RPMI 1640 a fim de se obter nos tubos testes concentrações que variam de 16 a 0,03µg/mL para anfotericina B e de 64 a 0,125µg/mL para o fluconazol. Os inóculos foram preparados a partir de colônias com crescimento de 24h em meio de ágar Sabouraud as quais foram ressuscitadas em solução salina estéril, a fim de se obter uma turbidez correspondente a 1x10⁶ a 5x10⁶ células por mL. Esta suspensão foi diluída 1:100, seguida de uma nova diluição 1:20 em meio líquido RPMI 1640. Volumes de 0,1mL de cada uma das diferentes concentrações de agente antifúngico foram dispensados em tubos de ensaio de 12x75mm, após foram acrescentados 0,9mL do inóculo padronizado. Os tubos foram incubados a 37°C por 48h, para posterior determinação da concentração inibitória mínima (CIM). O critério de leitura considerou que a CIM seria a menor concentração capaz de inibir 80% do crescimento para os azólicos e 100% para anfotericina B.

Ética

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai das Missões, sob protocolo nº 032-4/THC/06.

RESULTADOS

Os ensaios de PCR permitiram identificar as espécies das amostras como 28 (93,3%) *C. albicans* e 2 (6,7%) foram caracterizadas como *C. albicans* e *C. glabrata*, ou seja, apresentaram amplificação tanto para o primer CA, quanto para o primer CGLA. As Figuras 1 e 2 apresentam os produtos de amplificação obtidos com o PCR espécie-específico. Nenhum dos isolados apresentou amplificação com os primers CT e CK, os quais permitem identificar *C. tropicalis* e *C. krusei*, respectivamente. Os ensaios foram realizados em duplicata, a fim de garantir maior confiabilidade dos resultados.

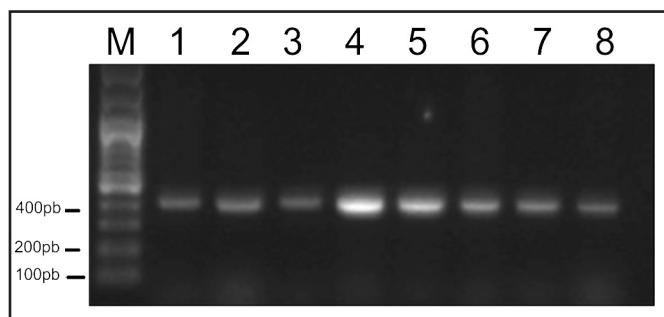


FIGURA 1 - Reação em cadeia da polimerase utilizando *primers* (ITS4 e CA) para identificação de *C. albicans*. M-marcaador de peso molecular; linha 1 - *C. albicans* ATCC 18804; linhas 2 a 8 - isolados 1, 2, 3, 4, 5, 16, 26.

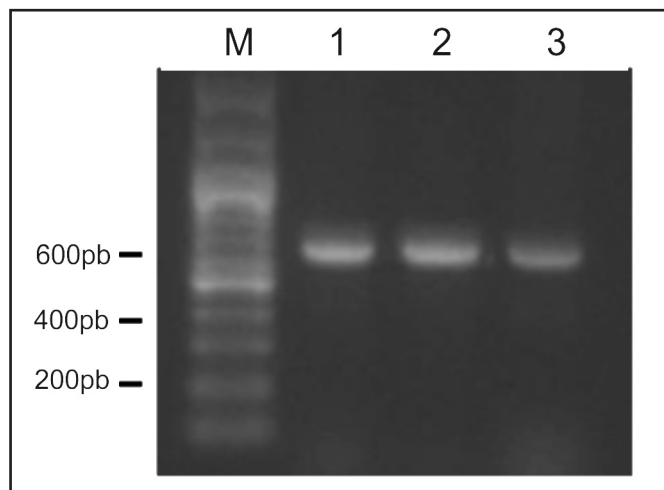


FIGURA 2 - Reação em cadeia da polimerase utilizando *primers* (ITS4 e CG) para identificação de *C. glabrata*. M-marcaador de peso molecular; linha 1 - *C. glabrata* ATCC 2001; linhas 2 e 3 - isolados 16 e 26.

Para os testes de suscetibilidade foram utilizados apenas 28 isolados, uma vez que foram excluídos destes ensaios as duas amostras que apresentaram duas espécies (*C. albicans* e *C. glabrata*) concomitantes. Após a realização dos testes de suscetibilidade frente à anfotericina B, determinou-se que todos os isolados foram sensíveis a este poliênico. As CIMs para este antifúngico variaram de 0,03 a 0,25µg/mL sendo que a CIM₅₀ (concentração inibitória mínima para 50% das amostras testadas) foi de 0,06µg/mL e a CIM₉₀ (concentração inibitória mínima para 90% das amostras testadas) foi de 0,25µg/mL (Tabela 1). Os testes de suscetibilidade ao fluconazol, também caracterizaram todos os isolados como sensíveis a este azólico. As CIMs variaram de 0,125 a 16µg/mL, a CIM₅₀ para as amostras foi 0,5µg/mL e a CIM₉₀ foi 4,0µg/mL (Tabela 1). Todas as amostras estudadas mostraram-se sensíveis ao voriconazol, e as CIMs tiveram variação de 0,03 a 0,25µg/mL, com CIM₅₀ de 0,03µg/mL e CIM₉₀ de 0,125µg/mL (Tabela 1).

TABELA 1 - Concentrações inibitórias mínimas para anfotericina B, fluconazol e voriconazol dos isolados.

	Anfotericina B	Fluconazol	Voriconazol
CIM ₅₀ (µg/mL)	0,06	0,5	0,03
CIM ₉₀ (µg/mL)	0,25	4	0,125
CIM ₅₀ : concentração inibitória mínima para 50% das amostras testadas.			
CIM ₉₀ : concentração inibitória mínima para 90% das amostras testadas.			

DISCUSSÃO

Neste trabalho, observamos que *C. albicans* foi a espécie isolada com maior frequência (93,3%) em amostras clínicas de pacientes com candidíase vaginal. Vários estudos têm evidenciado o predomínio da espécie *albicans* em infecções vaginais. Entretanto, com uma proporção inferior. Estes relatos incluem os estudos de Holland cols¹⁴ na Austrália (89%), Paulisch cols¹⁵ na Áustria (87,9%), Correa cols¹⁶ no Brasil (87%) e Arechavala cols¹⁷ na Argentina (86%).

Em nosso estudo, para dois isolados vaginais, identificamos duas espécies de *Candida* (*C. albicans* e *C. glabrata*) na mesma amostra. Estes resultados indicam uma falha no processo de seleção das colônias utilizadas na extração do material genômico. Este fato pode ser justificado pelo cultivo dos *swabs* vaginais ter sido realizado somente em ágar *Sabouraud*, onde, estas espécies apresentam colônias com características morfológicas semelhantes. Para minimizar esta interferência as amostras deveriam ter sido semeadas em um meio cromogênico, o que não ocorreu. De qualquer modo, o resultado aponta para uma possível colonização concomitante por *C. albicans* e *C. glabrata*. A maioria das vaginites é causada por uma única espécie de *Candida*, entretanto, duas ou mais espécies podem estar envolvidas simultaneamente neste tipo de processo infeccioso¹⁷⁻¹⁹.

Abordagens moleculares estão sendo desenvolvidas para estabelecer uma identificação mais rápida e segura de espécies fúngicas, devido à imprecisão e demora dos testes fenotípicos tradicionais. Estas técnicas, como o PCR, o PCR *multiplex* e o *nested-PCR*, têm permitido identificar espécies de *Candida* através da amplificação principalmente das regiões ITS1 e ITS2, que estão presentes em fungos patogênicos^{20,8,9}.

Em nosso trabalho foi possível identificar as espécies de isolados de *Candida* utilizando um *primer* universal ITS4 o qual anela em uma região do gene rRNA 28S e quatro *primers* espécie específicos, baseados nas regiões dos espaçadores transcritos internos 1 e 2. Wahyuningsih cols²¹ caracterizaram *C. albicans* utilizando os *primers* ITS3 e ITS4. Fujita cols²² identificaram espécies de *Candida* através de um PCR *multiplex*, utilizando os *primers* universais ITS1, ITS3 e ITS4. Chang cols²³ utilizaram o PCR *multiplex* para identificação de *Candida* e suas espécies. A técnica foi baseada na amplificação das regiões ITS1 do gênero *Candida* e de um fragmento da região ITS2, específica para *C. albicans*. Leaw cols²⁴ determinaram as espécies de fungos patogênicos utilizando sequências das regiões ITS. As regiões ITS1 e ITS2 são apropriadas para o diagnóstico, identificação, taxonomia e filogenia de fungos de importância médica. Além disto, a utilização de *primers* universais podem beneficiar as técnicas de diagnóstico clínico microbiológico²⁵⁻²⁷.

A anfotericina B é considerada a droga de referência para o tratamento da maioria das infecções fúngicas, porém apresenta alta toxicidade e sua indicação deveria ser restrita às infecções sistêmicas^{1,28}. Em nosso estudo, todos os isolados testados foram sensíveis a anfotericina B, apresentando valores de CIMs que variam de 0,03 a 0,25µg/mL. Outros autores também têm observado uma elevada sensibilidade a anfotericina B em amostras clínicas de espécies de *Candida*. Galle & Gianini⁹, Ferraza cols¹ e Ribeiro cols²⁹ ao avaliarem a sensibilidade de isolados vaginais de *Candida* observaram valores de CIMs que variaram entre 0,25 a 1µg/mL e 0,12 e 1µg/mL respectivamente, caracterizando suas amostras como sensíveis a anfotericina B.

Os triazólicos são fármacos bastante utilizados no tratamento e profilaxia das infecções fúngicas. Entretanto, existe uma tendência para se evitar o uso profilático do fluconazol em doses baixas, a fim de se prevenir o surgimento de isolados resistentes e surgimento de infecções causadas por espécies naturalmente resistentes a este antifúngico como *C. grubata* e *C. Krusei*²⁸. Os valores de CIM ao fluconazol encontrados em nosso trabalho são semelhantes aos valores reportados por Galle & Gianini⁹, Ferraza cols¹ e Gross cols³⁰.

Um isolado em estudo foi caracterizado como sensível dose-dependente ao fluconazol (CIM de 16 µg/mL). Outros autores têm relatado o crescente número de amostras sensíveis doses dependentes a este antifúngico. Richter cols³¹ ao analisarem amostras de pacientes com vulvovaginites recorrentes, encontraram CIMs para fluconazol elevados (CIM ≥ 16 µg/mL) em 15% das amostras. Mohanty cols³² observaram que 30% dos isolados de *Candida* da mucosa vaginal estudados foram dose-dependentes.

O voriconazol é um antifúngico triazólico de amplo espectro, reservado para tratamento de micoses sistêmicas, em nosso estudo os testes de sensibilidade apresentaram um CIM de 0,03 a 0,25 µg/mL, revelando sensibilidade elevada dos isolados a este antifúngico. Pfaller cols³³ ao testar a sensibilidade de isolados vaginais de *Candida* com testes de disco difusão encontraram em espécies de *C. albicans* um percentual de sensibilidade elevado, de 98,4%. Swinne cols³⁴ em seu estudo demonstraram uma atividade elevada do voriconazol contra *C. albicans*, representado por 94% de sensibilidade.

Pacientes que apresentam sintomas de vulvovaginite fúngica diagnosticadas através de cultura positiva para *Candida*, são tratadas com terapia empírica, portanto é importante destacar que na decisão da terapêutica adequada para cada paciente, se considere não somente a patogenia, mas também as características intrínsecas desse paciente³⁵. Os testes de suscetibilidade a antifúngicos são úteis na escolha do agente antifúngico mais apropriado para o tratamento das formas de candidíases. Entretanto, o uso destes testes na rotina laboratorial não é comum, pois estas técnicas apresentam custo elevado o que limita sua realização. Uma alternativa seria a utilização dos testes de disco difusão e o E-teste para rastreamento, sendo os métodos de diluição em caldo reservados para confirmação de resistência³⁶.

Outro fato importante a ser destacado é o crescente aumento do número de isolados de espécies não-*albicans*, e a dificuldade e imprecisão dos testes fenotípicos na determinação destas espécies, assim abordagens moleculares estão sendo desenvolvidas para estabelecer uma identificação mais rápida e segura de espécies de fungos¹³. Futuramente, métodos moleculares baseados em técnicas de polimorfismos deverão ser aplicados para entender a dinâmica dos microorganismos infecciosos em populações humanas, interpretar o relacionamento entre comensalismo e infecção, identificar a origem de uma infecção ou monitorar a emergência de linhagens resistentes a drogas³⁷.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não haver nenhum tipo de conflito de interesse no desenvolvimento do estudo.

REFERÊNCIAS

- Ferraza MH, Maluf MLE, Consolaro MEL, Shinobu CS, Svidzinski TIE, Batista MR. Caracterização de leveduras isoladas da vagina e sua associação com candidíase vulvovaginal em duas cidades do sul do Brasil. *Rev Bras Ginec Obst* 2005; 27:58-63.
- Nyirjesy PS, Seeney M, Grody MHT, Jordan CA, Buckley HR. Chronic fungal vaginitis: the value of cultures. *Am. J Obstet Gynecol* 1995; 173:820-823.
- Oliveira NC, Rampazzo RCP, Minari MC, Correa PRC, Bizerra FC, Carneiro M, et al. Utilização de um meio cromogênico e da técnica de semi-nested PCR para identificação de espécies de *Candida*. *Semina: Cien Biol de Saude* 2006; 27:125-132.
- Santos IBC, Oliveira NMC, Xavier DE, Casimiro GS, Pena RLM, Lima EO. Avaliação do método clássico e do CHROMagar *Candida* na identificação de leveduras. *LAES & HAES* 2005; 56:182-192.
- Sidrim JJC, Rocha MFG. *Micologia Médica à luz de autores contemporâneos*. 1ª editora Guanabara Koogan; 2004.
- Cirak MY, Kalkanici A, Kustimur S. Use of molecular methods in identification of *Candida* species and evaluation of fluconazole resistance. *Mem Inst Osw Cruz* 2003; 8:1027-1032.
- Elie CM, Lott TJ, Reiss E, Morrison CJ. Rapid identification of *Candida* species with species-specific DNA probes. *J Clin Microbiol* 1999; 36:3260-3265.
- Goebel CS. *Padronização de ensaio imuno-enzimático (ELISA) para diagnóstico laboratorial de candidemias*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS; 2007.
- Galle LC, Gianini MJSM. Prevalência e suscetibilidade de leveduras vaginais. *Jorn Bras Patol Med Labor* 2004; 40:229-236.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard: document nº M27-A2. Wayne, PA: NCCLS; 2002.
- Sobel JD, Zervos M, Reed BD, Hooton T, Soper D, Nyirjesy P, et al. Fluconazole Susceptibility of Vaginal Isolates Obtained from Women with Complicated *Candida* Vaginitis: Clinical Implications. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:34-38.
- Crestani J. Isolamento e caracterização de leveduras de uma madeira e sua correlação com um caso clínico de criptococose. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS; 2007.
- Li YL, Leaw JH, Chen H, Chang HC, Chang TC. Rapid identification of yeasts commonly found in positive blood cultures by amplification of the internal transcribed spacer regions 1 and 2. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003; 22:693-696.
- Holland J, Young ML, Lee O, Chen SC-A. Vulvovaginal carriage of yeasts other than *Candida albicans*. *Sex Transm Infect* 2003; 79:249-250.
- Paulitsch A, Weger W, Ginter-Hanselmayer G, Marth E, Buzina W. A 5-year (2000-2004) epidemiological survey of *Candida* and non-*Candida* yeast species causing vulvovaginal candidiasis in Graz, Austria. *Mycoses* 2006; 49:471-475.
- Corrêa PR, David PRS, Peres NP, Cunha KC, Almeida MTG. Caracterização fenotípica de leveduras isoladas da mucosa vaginal em mulheres adultas. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2009; 31:177-181.
- Arechavala AI, Bianchi MH, Robles AM, Santiso G, Negroni R. Identificación y sensibilidad frente a fluconazol y albaconazol de 100 cepas de leveduras aisladas de flujo vaginal. *Rev Iberoam Micol* 2007; 24:305-308.
- Rivera-Sanchez R, Flores Paz R, Arriaga Alba M. Identificación de especies de *Candida* causantes de vaginitis en población mexicana. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006; 24:634-636.
- Richter SS, Galask RP, Messer SA, Hollis RJ, Diekema DJ, Pfaller MA. Antifungal susceptibilities of *Candida* Species causing vulvovaginitis and epidemiology of recurrent cases. *J Clin Microbiol* 2005; 43:2155-2162.
- Boriollo MFG. Análise da diversidade genética de amostras de *Candida albicans* isoladas da cavidade bucal de crianças saudáveis por eletroforese de enzima multiloco. *Rev Bras Epidemiol* 2005; 8:51-66.
- Wahyuningsih R, Freisleben H, Sonntag H, Schntzler P. Simple and rapid detection of *Candida albicans* DNA in serum by PCR for diagnosis of invasive candidiasis. *J Clin Microbiol* 2000; 38:3016-3021.
- Fujita S, Senda Y, Nakaguchi S, Hashimoto T. Multiplex PCR using internal transcribed spacer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains. *J Clin Microbiol* 2001; 39:3617-3622.
- Chang HC, Leaw SN, Huang AH, Wu TL, Chang TC. Rapid identification of yeast in positive blood cultures by a multiplex PCR method. *J Clin Microbiol* 2001; 39:3466-3471.

24. Leaw SN, Chang HC, Sun HF, Barton R, Bouchara J, Chang TC. Identification of medically important yeast species by sequence analysis of the internal transcribed spacer regions. *J Clin Microbiol* 2006; 44:693-699.
25. Chen YC, Eisner JD, Kattar MM, Rassoulia-Barret SL, Lafe K, Yarfitz SL, et al. Identification of medically important yeast using PCR-based detection of DNA sequence polymorphism in the internal transcribed spacer 2 region of rRNA gene. *J Clin Microbiol* 2000; 38:2302-2310.
26. Mirhendi H, Makimuka K. PCR-detection of *Candida albicans* in blond using a new primer pair to diagnosis of systemic candidiasis. *Iran J Public Health* 2003; 32:1-5.
27. Henry T, Iwen PC, Hinrichs SH. Identification of *Candida* species using internal transcribed spacer region 1 and 2. *J Clin Microbiol* 2000; 38:1510-1515.
28. Marra A, Camargo LFA. Fluconazol ou anfotericina B no tratamento de candidemias em pacientes internados na UTI. *Rev Assoc Med Bras* 2002; 48:107.
29. Ribeiro MA, Dietze R, Paula CR, Da Matta DA, Colombo AL. Susceptibility profile of vaginal yeast isolates from Brazil. *Mycopathologia*. 2001;151:5-10.
30. Gross NT, Arias ML, Moraga M, Baddasarow Y, Jarstrand C. Clinical Study Species Distribution and Susceptibility to Azoles of Vaginal Yeasts Isolated Prostitutes. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2007; 82:412-417.
31. Richter SS, Galask RP, Messer SA, Hollis RJ, Diekema DJ, Pfaller MA. Antifungal susceptibilities of *Candida* species causing vulvovaginitis and epidemiology of recurrent cases. *J Clin Microbiol* 2005; 43:2155-2162.
32. Mohanty S, Xess I, Hasan F, Kapil A, Mittal S, Tolosa JE. Prevalence e susceptibility to fluconazol of *Candida* species causing vulvovaginitis. *Indian Med Resid* 2007; 126:216-219.
33. Pfaller MA, Diekema DL, Gibbs VA, Newell JF, Meis IM, Gould WF, et al. Results from the artemis disk global antifungal surveillance study, 1997 to 2005: an 8.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species and other yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. *J Clin Microbiol* 2007; 45:1735-1745.
34. Swinne D, Watelle M, Nolard N. In vitro activities of voriconazole, fluconazole, itraconazole and amphotericin B against non *Candida albicans* yeast isolates. *Rev Iberoam Micol* 2005; 22:24-28.
35. Fidel PL, Sobel JD. Immunopathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Clin. Microbiol Rev* 1996; 9:335-348.
36. Vermitsky JP, Self MJ, Chadwick SG, Trama JP, Adelson ME, Eli M, et al. Survey of Vaginal-Flora *Candida* Species Isolates from Women of Different Age Groups by Use of Species-Specific PCR Detection. *J Clin Microbiol* 2008; 46:1501-1503.
37. Boriollo MFG, Hofling JF, Mendes A, Rosa EAR. Ferramentas moleculares para caracterização de *Candida albicans* (Robin) Berkout (1923) em estudos epidemiológicos. *Est Biol* 2005; 27:21-47.