

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

ALINE LORENZONI PANIAGUA

**AVALIAÇÃO MICROBICIDA *IN VITRO* DE *LACTOBACILLUS CASEI*
CONTRA *CANDIDA* SPP.**

BRASÍLIA - DF
2019

ALINE LORENZONI PANIAGUA

**AVALIAÇÃO MICROBICIDA *IN VITRO* DE ESPÉCIES DE *LACTOBACILLUS*
CONTRA *CANDIDA* spp.**

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

Orientadora: Profa. Dra. Yanna Karla de Medeiros Nóbrega

Co-orientador: Profa. Dra. Amabel Fernandes Correia

BRASÍLIA - DF
2019

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

LAL411a Lorenzoni Paniagua, Aline
Avaliação microbiciada in vitro de Lactobacillus casei
contra candida spp. / Aline Lorenzoni Paniagua; orientador
Yanna Karla de Medeiros Nóbrega; co-orientador Amabel
Fernandes Correia. -- Brasília, 2019.
52 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Ciências Médicas) --
Universidade de Brasília, 2019.

1. Candida ssp. 2. Lactobacillus casei. 3. Ácido láctico.
4. Probióticos. 5. Candidíase. I. Karla de Medeiros Nóbrega,
Yanna, orient. II. Fernandes Correia, Amabel, co-orient.
III. Título.

ALINE LORENZONI PANIAGUA

**AVALIAÇÃO MICROBICIDA *IN VITRO* DE ESPÉCIES DE *LACTOBACILLUS*
CONTRA *CANDIDA* SPP.**

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

Aprovada em 01 de março de 2019

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Luiz Alberto Simeoni (UnB)

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

Profa. Dra. Yris Maria Fonseca Bazzo (UnB - Suplente)

Este trabalho é dedicado ao meu marido Gustavo e minhas filhas Isabelle e Luiza, que com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu concluísse este trabalho, pessoas que eu amo e são a essência do meu espírito.

AGRADECIMENTOS

Durante esses dois anos só tenho a agradecer a todos que passaram pelo meu caminho e que com certeza deixaram um pouco de si. Os momentos de alegria serviram para me permitir acreditar na beleza da vida, e os de sofrimento, serviram para um crescimento pessoal único. É muito difícil transformar sentimentos em palavras, mas serei eternamente grata a vocês, pessoas imprescindíveis para a realização e conclusão deste trabalho.

Inicio meus agradecimentos por DEUS, já que Ele colocou pessoas tão especiais ao meu lado, sem as quais certamente não teria dado conta.

Gostaria de agradecer a minha orientadora Professora Doutora Yanna Karla de Medeiros Nóbrega, que com muita calma e sabedoria sempre soube conduzir essa pesquisa, por ter acreditado e depositado sua confiança em mim, pelos ensinamentos, incentivo, amizade e dedicação. Você esteve ao meu lado durante esses dois anos e não mediu esforços para me ajudar, sempre com uma solução simples para os meus problemas que pareciam ser gigantes. Obrigada por me guiar e orientar neste trabalho e despertar o meu interesse nesta área, tenho muito orgulho em tê-la como minha orientadora.

Ao meu querido esposo, Gustavo, sempre ao meu lado, com a sua cumplicidade incondicional, companheirismo, amizade, paciência, compreensão, apoio, alegria e amor. Você me fez acreditar que posso mais que imagino, o meu eterno amor.

As minhas grandes preciosidades, minhas filhas amadas Isabelle e Luiza, amor infinito.

A minha mãe que sempre foi o meu modelo e exemplo de vida.

A minha irmã Patrícia que sempre esteve presente mesmo longe, me incentivando e apoiando com muito carinho.

A minha amiga querida Elinalva que me incentivou, apoiou e sempre estava pronta para me ajudar em todos os momentos, o meu agradecimento.

A minha grande amiga, comadre e companheira de todas as horas, Claudia obrigada por me ajudar a dividir os problemas e a somar as alegrias.

A Doutora Rosane, com sua sabedoria e conhecimento, acreditou que esse projeto iria dar certo, me apoiando, ajudando, incentivando e contagiando com sua energia e alegria.

A Doutora Lenora por ter me dado a oportunidade de ficar durante um ano ao seu lado nos trabalhos em equipe multidisciplinar, podendo atuar como acupunturista "minha paixão," ajudando as pessoas.

Gostaria de agradecer ao LACEN-DF e toda a equipe do Laboratório de Micologia: Patrícia, Adair, Marinilda e Fernanda pessoas maravilhosas e excelentes profissionais que me ajudaram muito nesta jornada, e em especial a minha co-orientadora Doutora Amabel uma pessoa incrível e de um coração enorme, que em um momento tão difícil da minha pesquisa, abriu as portas para que eu pudesse concretizá-la, proporcionando-me mais que a busca por conhecimento técnico-científico, e trazendo-me uma LIÇÃO DE VIDA. E finalmente à CAPES, pelo suporte técnico e financeiro, o qual proporcionou a realização deste projeto.

Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Se estamos possuídos por uma inabalável determinação conseguiremos superá-los independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho (Dalai Lama)

RESUMO

A microbiota vaginal normal é composta predominantemente por *Lactobacillus* spp., que produzem através de vários mecanismos uma barreira defensiva, que dificulta a proliferação e invasão de espécies de *Candida*, leveduras comensais dessa microbiota que podem se tornar patogênicas sob determinadas condições que alteram o ambiente vaginal. Em sua fase patogênica *Candida* causa a candidíase vulvovaginal, uma infecção da mucosa genital, causada por fungos deste gênero, que compromete principalmente vulva e vagina. Essa vaginite é considerada a segunda maior causa de infecção sintomática no trato genital feminino em todo o mundo, sendo considerada pela sua recorrência um problema de saúde pública, que afeta a qualidade de vida das mulheres. O ácido láctico é um ácido orgânico produzido como metabólito pelos *Lactobacillus* spp., e é também considerado o principal fator antimicrobiano produzido por esses micro-organismos. O presente trabalho teve como objetivo investigar a atividade inibitória de *Lactobacillus casei* sobre cepas de *Candida* spp. isoladas de casos de candidíase vulvovaginal, em modelo *in vitro*. Após a identificação das espécies de *Candida*, por métodos fenotípicos e a confirmação por MALDI TOF, foram testadas as seguintes espécies: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida norvegensis* e *Candida auris*. Após a identificação e seleção dos isolados clínicos de *Candida* spp, foi testada a atividade do *Lactobacillus casei* sobre estas cepas em cocultivo. Os resultados demonstraram excelente atividade microbicida de *L. casei* sobre todas as espécies fúngicas testadas, com inibição mais efetiva sobre as cepas de *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, e menos efetiva em *C. glabrata* e *C. norvegensis*, embora tenha sido observada atividade microbicida superior a 58% em todas as cepas testadas, incluindo a cepa emergente e multirresistente *Candida auris*. Após 24h de incubação, a dosagem de ácido láctico revelou valores significativos de produção de ácido láctico, superiores a 6,51 mg/mL para todos os cocultivos testados, valores próximos aos produzidos na microbiota normal saudável, que apresenta uma produção de cerca de 10 mg/mL ou 1 % de ácido láctico, sugerindo que o efeito microbicida de *Lactobacillus casei* pode estar associado à produção de ácido láctico em cocultivo. O efeito microbicida do ácido láctico foi confirmado pelos testes de microdiluição, que mostraram valores de MIC de 2,5 mg/mL para a maioria das cepas testadas. Este estudo abre um caminho para novas perspectivas de tratamento, ou seja, como um probiótico de origem alimentar comprovadamente pode apresentar efeito microbicida sobre espécies de *Candida*.

Palavras-Chaves: candidíase, *Candida* spp, *Lactobacillus casei*, ácido láctico, probióticos

ABSTRACT

The normal vaginal microbiota is predominantly composed of *Lactobacillus*, which produce through several mechanisms a defensive barrier that hinders the proliferation and invasion of *Candida* species, commensal yeasts of this microbiota that can become pathogenic under certain conditions that alter the vaginal environment. In its pathogenic phase *Candida* causes vulvovaginal candidiasis, an infection of the genital mucosa, caused by fungi of this genus, which mainly engulfs the vulva and vagina. This vaginitis is considered to be the second largest cause of symptomatic infection in the female genital tract worldwide, being considered a public health problem that affects the quality of life of women. Lactic acid is an organic acid produced as a metabolite by *Lactobacillus* spp., and is also considered the main antimicrobial factor produced by these microorganisms. The present work aimed to investigate the inhibitory activity of *Lactobacillus casei* on *Candida* spp. isolated from cases of vulvovaginal candidiasis, in an in vitro model. After identification of the *Candida* species by phenotypic methods and confirmation by MALDI TOF, the following species were tested: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida norvegensis* and *Candida auris*. After the identification and selection of the clinical isolates of *Candida* spp., the activity of *Lactobacillus casei*. on these co-cultivated strains was tested. The results showed excellent microbicidal activity of *L. casei* on all fungal species tested, with more effective inhibition on *C. tropicalis* and *C. parapsilosis* strains, and less effective on *C. glabrata* and *C. norvegensis*, although activity was observed microbicide of more than 58% in all strains tested, including the emergent and multiresistant strain *Candida auris*. After 24h of incubation, the lactic acid dosage showed significant values of lactic acid production, higher than 6.51 mg / mL for all the cocultures tested, values close to those produced in healthy normal microbiota, with a production of about 10 mg / mL or 1% lactic acid, suggesting that the microbicidal effect of *Lactobacillus casei* may be associated with the production of lactic acid in cocultivation. The microbicidal effect of lactic acid was confirmed by microdilution tests, which showed MIC values of 2.5 mg/mL for most of the strains tested. This study opens a path to new treatment perspectives, that is, how a proven food-borne probiotic can present a microbicidal effect on *Candida* species.

Key-words: candidiasis, *Candida* spp, *Lactobacillus casei*, lactic acid, probiotics

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Cultivo de <i>Candida albicans</i> e <i>Lactobacillus casei</i>	30
Figura 2 – Cocultivo de <i>Candida tropicalis</i> e <i>Lactobacillus casei</i>	32
Figura 3 - Avaliação da atividade microbica de cepa de <i>Lactobacillus casei</i> sobre espécies de <i>Candida</i> após cocultivo em meio YM ágar (CFU/mL).....	35
Figura 4 - Atividade microbica de cepa de <i>Lactobacillus casei</i> sobre espécies de <i>Candida</i> em meio MRS ágar (CFU/mL)	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – - Avaliação percentual da atividade microbiana de cepa de <i>Lactobacillus casei</i> após cocultivo com <i>Candida</i> spp. em meio YM.....	36
Tabela 2 - Avaliação percentual da atividade microbiana de <i>Lactobacillus casei</i> após cocultivo com <i>Candida</i> spp. em meio MRS.....	38
Tabela 3 - Avaliação da produção de Ácido láctico após cocultivo de cepa de <i>Lactobacillus casei</i> com espécies de <i>Candida</i>	40
Tabela 4 – MIC do ácido láctico para as espécies de <i>Candida</i> estudadas.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	<i>American Type Culture Colletion</i>
CFU	Unidade formadora de colônia
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMI	Concentração mínima inibitória
CST	<i>Community State Types</i>
CVV	Candidíase vulvovaginal
CVVR	Candidíase vulvovaginal recorrente
DIU	Dispositivo Intrauterino
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPV	Vírus do Papiloma Humano
HUB	Hospital Universitário de Brasília
LDD	Enzima Lactato oxidase
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-flight</i>
MBV	Microbiota vaginal
MRS	<i>Man, Rogosa e Sharpe</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PCR-RFLP	<i>Polymerase Chain Reaction –Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
POD	Enzima peroxidase
PTG	Prova tubo germinativo
rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico
YM	<i>yeast malt</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Candidíase Vulvovaginal (CVV) ou vulvovaginite por <i>Candida</i> spp.....	15
1.2. Microbiota vaginal.....	17
1.3. <i>Lactobacillus</i>	19
1.4. Diagnóstico laboratorial.....	20
1.5. Tratamento e novas perspectivas.....	22

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral.....	25
2.2. Objetivos específicos.....	25

3. METODOLOGIA

3.1. Origem dos isolados fúngicos e aspectos éticos.....	26
3.2. Isolamento e conservação dos isolados fúngicos.....	26
3.3. Identificação fenotípica das espécies de <i>Candida</i>	26
3.3.1. Prova do Tubo Germinativo (PTG).....	27
3.3.2. Identificação em Meio Cromogênico.....	27
3.4. Identificação por <i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-flight</i> (MALDI TOF).....	28
3.5. Isolamento de <i>Lactobacillus</i>	29
3.6. Preparo dos meios de cultura YM e MRS empregados para cocultivo.....	29
3.6.1. Meio de cultura YM.....	29
3.6.2. Meio de cultura MRS.....	29
3.7. Método empregado para o cocultivo.....	30
3.7.1. Isolados microbianos empregados no cocultivo.....	30
3.7.2. Atividade de <i>Lactobacillus casei</i> sobre os isolados clínicos de <i>Candida</i> spp em cocultivo.....	30
3.7.3. Medição do pH.....	32
3.7.4. Dosagem do Ácido Lático.....	32
3.8. Concentração Inibitória Mínima (MIC - <i>Minimal Inhibitory Concentration</i>) do Ácido Lático.....	33
3.8.1. Método de microdiluição.....	33

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação da atividade microbicida de uma cepa de <i>Lactobacillus casei</i> sobre	
---	--

espécies de <i>Candida</i> após semeio em ágar YM	34
4.2. Avaliação da atividade microbica de cepa de <i>Lactobacillus casei</i> sobre espécies de <i>Candida</i> após semeio em ágar MRS.....	36
4.3 Avaliação do pH.....	38
4.4 Avaliação da produção de ácido láctico após o cocultivo.....	38
4.5 Avaliação da concentração de ácido láctico que apresenta atividade microbica...40	
5. DISCUSSÃO.....	41
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	45
7. REFERÊNCIAS.....	46

1. INTRODUÇÃO

1.1. Candidíase Vulvovaginal (CVV) ou vulvovaginite por *Candida* spp.

A candidíase vulvovaginal (CVV) é uma infecção da mucosa genital causada por leveduras do gênero *Candida*, que compromete principalmente vulva e vagina. A doença ocorre endogenamente devido a fatores predisponentes que favorecem a multiplicação da levedura presente na microbiota vaginal das mulheres em idade fértil (ANDRIOLI, 2009; BRANDOLT et al., 2017).

Embora seja uma infecção multifatorial, com numerosos fatores de risco identificados, os mecanismos patogênicos ainda não são completamente elucidados (GONÇALVES et al., 2016). Entre os fatores de risco que contribuem para a colonização e o desenvolvimento da CVV, podemos destacar: fatores genéticos (polimorfismo no grupo sanguíneo), idade, atividade sexual, patologias como *Diabetes mellitus*, e causas idiopáticas (GONÇALVES et al., 2016), além de uso de contraceptivos orais a base de estrógenos, terapia de reposição hormonal, uso de antibióticos (SOBEL, 1997) e gravidez (ÁLVARES et al., 2007).

Com base na presença de fatores de risco, estudo recente de Sobel (2016) reforça que a recorrência de vaginites causadas por *Candida* pode ser atribuída ao aumento da colonização vaginal por essa levedura, e classifica os fatores que favorecem essa colonização de forma agrupada em: associados ao hospedeiro (HIV, *Diabetes mellitus* descompensada, uso de antibióticos, uso de esteroides, terapia de reposição hormonal, dieta e presença de atopia vaginal), genéticos (polimorfismo, fatores familiares e associado à raça), comportamentais (uso de contraceptivo oral, uso de esponja contraceptiva, uso de Dispositivo Intrauterino – DIU, prática de sexo oral e a frequência da atividade sexual), dermatose vulvar, vaginose bacterianas, infecções por espécies não *albicans*, e causas idiopáticas (SOBEL, 2016).

Além dos fatores de risco citados e da existência endógena de espécies de *Candida* presentes na microbiota vaginal normal, há que se considerar outras fontes de infecção como: *Candida* adquirida do intestino, através de contato sexual, ou de uma recaída resultante de um tratamento anterior que não conseguiu erradicar completamente a levedura (SOBEL, 2016; KANG et al., 2017).

As infecções por *Candida* são geralmente assintomáticas, mas após a colonização podem tornarem-se sintomáticas, o que envolve fatores do hospedeiro, tais como:

susceptibilidade à infecção, desenvolvimento da resposta inflamatória e disbiose da microbiota vaginal (BRANDOLT et al., 2017; BÖCHER et al., 2018). Uma vez estabelecida, a vaginite por *Candida* geralmente apresenta sintomas bem caracterizados como: prurido, ardor, dor, eritema e edema da vulva e da mucosa vaginal, e secreção vaginal espessa, que por vezes pode ficar aderida à superfície da mucosa (SOBEL, 1997; PETERS et al., 2014), além de leucorreia e da presença de placas esbranquiçadas na mucosa vaginal (ANDRIOLI, 2009). Sintomas estes que, pelo desconforto provocado, causam um grande impacto sobre a qualidade de vida das mulheres que apresentam a infecção (KANG et al., 2017).

A CVV é considerada a segunda causa mais comum de infecção genital nas mulheres em idade reprodutiva, sendo que a primeira causa mais comum de infecção genital é causada por *Gardnerella vaginalis*. A CVV representa um problema de importância global em saúde, que afeta todos os estratos sociais, sua exata prevalência é desconhecida (WHO, 2013; RODRIGUÉZ-CERQUEIRA et al., 2019). Alguns pesquisadores apontam que os estudos não são representativos da população em geral e apresentam erros diagnósticos (BRANDOLT et al., 2017), o que dificulta dados de uma prevalência exata (SOBEL, 2016).

De maneira geral, os estudos disponíveis na literatura apontam uma prevalência de 70-75 % de CVV em mulheres em idade fértil, que apresentam ao menos um episódio ao longo da vida; destas, cerca de 40-50 % apresentam recorrência de CVV – a chamada CVVR (SOBEL, 1997; BRANDOLT et al., 2017). A recorrência representa de 5-8 % (que representa aproximadamente 150 milhões de mulheres em todo o mundo) das infecções, e é definida como a ocorrência de pelo menos 3-4 episódios de candidíase em um ano com o aparecimento dos sintomas da infecção, o que torna a CVVR um importante problema de saúde pública (BLOSTEIN et al., 2017; SOBEL, 2016).

O principal agente etiológico da CVV é *Candida albicans*, isolada em cerca de 70-90 % dos casos. Entre as espécies não *albicans* destaca-se *Candida glabrata* (DIAS et al., 2011; BEIKERT et al., 2011), embora em alguns estudos também sejam referidas além de *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. tropicalis*, que são relatadas como espécies emergentes nas duas últimas décadas como agentes de CVV (GONÇALVES et

al., 2016; BRANDOLT et al., 2017; NAKAMURA-VASCONCELOS et al., 2017).

1.2. Microbiota vaginal

A microbiota vaginal (MBV) tem um papel importante na prevenção da colonização por organismos patogênicos, incluindo agentes infecciosos do trato urinário e doenças sexualmente transmissíveis, e atua na manutenção da saúde reprodutiva e ginecológica da mulher (MARTIN, 2012).

A alteração da microbiota vaginal é afetada por fatores internos e externos, incluindo mudanças hormonais (estrogênio), menstruação, microbiota intestinal (pela proximidade do reto), uso de produtos de higiene íntima, interação sexual e uso de contraceptivos (REID, 2018). Dentre estes fatores, os hormonais representam uma forte influência na MBV, fazendo com que ocorram diferenças nessa microbiota em mulheres em pré-menopausa, perimenopausa e pós-menopausa (BROTMAN et al, 2014).

Por essa razão, merece especial atenção a influência do hormônio estrogênio, que contribui para a maturação do epitélio vaginal através da deposição de glicogênio. O glicogênio é então metabolizado pela comunidade bacteriana endógena presente nesta microbiota, para produzir ácidos orgânicos, principalmente ácido lático, que protege o trato genital (MARTIN, 2012).

Estudos mostram que a maior dificuldade no estudo da microbiota vaginal é a técnica empregada, pois 90 % das espécies microbianas principais que compõem a MBV, não são cultiváveis em laboratório (AMANN, LUDWIG & SCHLEIFER, 1995), e essa identificação só pode ser realizada empregando técnicas moleculares.

A classificação mais aceita da composição da microbiota vaginal, agrupa os micro-organismos principais encontrados em cinco categorias referidas como *Community State Types* (CST), que estão distribuídas em: CST I (dominada por *Lactobacillus crispatus*), CST II (por *Lactobacillus gasseri*), CST III (por *Lactobacillus iners*), CST IV-A (possui proporções menores de *Lactobacillus* spp. e altas proporções de micro-organismos anaeróbios, pertencente ao gênero *Anaerococcus*, *Peptoniphilus*, *Prevotella* e *Streptococcus*; e espécies que podem estar associadas a infecções como *Gardnerella vaginalis* ou *Mobiluncus* spp.), CST IV-B (reduzida quantidade de *Lactobacillus* spp. e proporções elevadas de *Atopobium vaginae*, *Megasphaera* sp., *Clostridiales*, entre outras espécies que causam vaginose bacteriana) (RAVEL et al, 2011; GAJER et al., 2012;

BROTMAN et al., 2014; MITRA et al., 2016.).

Embora existam alguns outros micro-organismos presentes na microbiota vaginal como, por exemplo, bactérias anaeróbias, os micro-organismos predominantes são os *Lactobacillus* spp., pelo menos em cerca de 70 % das mulheres. Dentre estes micro-organismos podemos destacar *Lactobacillus crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners* e *L. jensenii*, que aparecem com maior predomínio, entretanto por vezes surgem também *L. salivarius* e *L. vaginalis*. Além destes, ainda podemos destacar os *Lactobacillus* provenientes do trato gastrointestinal como o *Lactobacillus rhamnosus*, *L. casei* e *L. plantarum*, uma vez que o intestino funciona como reservatório desses micro-organismos, que acabam por acessar o trato genital inferior através da região perianal adjacente (CASTRO et al., 2015; GONÇALVES et al, 2016).

A redução do número de *Lactobacillus* spp. que compõem a microbiota vaginal normal favorece o crescimento das bactérias anaeróbias, levando a uma condição de disbiose vaginal. Esse supercrescimento bacteriano é decorrente da redução na produção de ácido láctico pela ausência dos *Lactobacillus*, e esse quadro de disbiose favorece a infecção por outros patógenos com aumento do risco de infecção por HIV, HPV, *richomonas vaginalis* (MITRA et al, 2016), *Gardnerella vaginalis* (PETROVA et al., 2015), e outras vaginoses bacterianas (ANDERSON et al., 2004)

1.3. *Lactobacillus*

Os *Lactobacillus* spp. são os principais biomarcadores da microbiota vaginal normal e saudável (PETROVA et al, 2016), são também conhecidos como bacilos de Döderlein, em homenagem a Albert Döderlein, o pesquisador que os descobriu (DAVID, 2006).

O exercício desta atividade protetiva e promotora de saúde dos *Lactobacillus* spp. está descrita como associada a mecanismos distintos: competição por nutrientes, produção de substâncias que possuem ação microbicida ou inibitória sobre patógenos bacterianos e virais, formação de microcolônias que aderem aos receptores celulares epiteliais e formam uma barreira física impedindo a adesão de patógenos e estimulação de mecanismos de defesa do hospedeiro contra patógenos (PETROVA et al., 2016; LEBEER et al., 2010).

Entre as substâncias às quais se atribuem propriedades microbicidas produzidas por *Lactobacillus* estão ácidos orgânicos - láctico e acético, bacteriocinas,

biossurfactantes, hidrocarbonetos, peróxido de hidrogênio e moléculas de coagregação (SGIBNEV e KREMLEVA, 2015; KOVACHEV, 2018; FUOCHI et al., 2018).

As espécies de *Lactobacillus* produzem ácido láctico a partir do glicogênio presente principalmente nas células escamosas do tipo intermediárias do epitélio vaginal, cuja produção é estimulada pelos hormônios sexuais femininos (MARTIN et al., 2012). O ácido láctico é considerado o principal fator antimicrobiano produzido por esses microrganismos (O'HANLON et al., 2011; GONG et al., 2014; TACHEDJIAN et al., 2017), embora esse composto também apresente atividade antivirais e imunomodulatórias (TACHEDJIAN et al., 2017).

A microbiota vaginal composta por *Lactobacillus* constitui uma barreira defensiva importante à CVV. Apesar de *Lactobacillus* e *C. albicans* poderem ser detectados concomitantemente na vagina de mulheres assintomáticas, acredita-se que CVV pode ser desencadeada quando a microbiota de *Lactobacillus* é depletada, permitindo o crescimento dos fungos (MITRA et al., 2016).

Propriedades anti-*Candida* têm sido atribuídas a cepas de *Lactobacillus* em alguns estudos. Wagner et al. (2012) demonstraram que *Lactobacillus* probióticos podem suprimir a expressão de genes inflamatórios induzidos por *C. albicans*, modulando a resposta imunológica do hospedeiro.

Alguns *Lactobacillus* podem dificultar a aderência de *Candida*. A aderência de *C. albicans* ao hospedeiro é favorecida tanto pela formação dos tubos germinativos - pequenos prolongamentos filamentosos que provêm da célula leveduriforme e precedem a formação das hifas - (JORGE, 2012) como pela formação de biofilmes (CAVALCANTI et al., 2013). *Lactobacillus*, a depender da espécie, são capazes de interferir negativamente na formação de tubos germinativos, na formação de hifas e na formação de biofilmes por *C. albicans* (LEÃO et al., 2015; MATSUBARA et al., 2016).

Dessa forma, os múltiplos mecanismos de ação de *Lactobacillus* spp sugerem que o uso de cepas probióticas de *Lactobacillus* spp, com vistas ao seu estabelecimento na microbiota vaginal, pode ser uma medida útil contra a CVV e favorável à reposição de uma microbiota vaginal saudável.

1.4. Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial das leveduras que causam CVV é tradicionalmente baseado em microscopia direta, considerada a principal ferramenta no diagnóstico das

infecções fúngicas (WILLINGER e HAASE, 2013), e geralmente é realizada com KOH a 10-20 %, que degrada os componentes proteicos presentes nas amostras biológicas suspeitas, deixando a parede celular dos fungos intacta, o que permite sua visualização (LEASE e ALEXANDER, 2011; SOBEL, 2016). Esse teste simples e de baixo custo-enefício, apresenta baixa sensibilidade, que varia de 40-70 %, pois o resultado é dependente de um microscopista experiente (SOBEL, 2016)

A visibilidade de fungos dentro de amostras clínicas pode ser aumentada ainda mais pela adição de *Calcofluor white*, um fluoróforo que se liga à quitina presente nas paredes das células fúngicas, ou empregando dois outros corantes, lactofenol e/ou azul de algodão, que quando combinados marcam a parede celular externa do fungo (LEASE e ALEXANDER, 2011).

Embora estes testes iniciais sejam simples, quando positivos confirmam imediatamente a presença de leveduras, e essa informação inicial pode ajudar na terapia, ainda que de forma empírica nessa fase inicial (LEASE e ALEXANDER, 2011).

Na impossibilidade de realização da microscopia direta, ou no seguimento do diagnóstico laboratorial, recomenda-se a realização da cultura para fungos (SOBEL, 2016), que foi considerada o padrão ouro na identificação de fungos, embora apresente também baixa sensibilidade (LEASE e ALEXANDER, 2011).

A cultura de fungos dependerá de meios de cultivo para a realização de um isolamento primário dos fungos, e poderá no caso das leveduras do gênero *Candida*, empregar meios cromogênicos, que permitem uma rápida identificação presuntiva das espécies, diferenciando as *C.albicans*, das não *albicans* (LEASE & ALEXANDER, 2011). Comercialmente disponíveis existem o *Chromoagar Candida*[®] e o *Candida ID Agar*[®], que permitem a fácil diferenciação das espécies de *Candida* (WILLINGER et al., 2011).

Quando o emprego de meios cromogênicos não permitem a identificação das espécies, para a identificação das leveduras é necessário a realização de subcultivos da cultura isolada para a realização de testes bioquímicos (LEASE e ALEXANDER, 2011) de assimilação de compostos como por exemplo, açúcares e aminoácidos, dentre outros, que podem simplesmente serem denominados substratos.

Estes testes bioquímicos podem ser adquiridos comercialmente para realização manual após incubação da amostra fúngica isolada, ou podem empregar métodos semi-automatizados. Dentre estes métodos semi-automatizados podemos citar os três principais equipamentos comerciais disponíveis: *Phoenix* (Becton Dickinson), *MicroScan*

(Siemens), e *Vitek 2* (bioMérieux), que empregam painéis de identificação rápida para leveduras com vários substratos (WINSTANLEY e COURVALIN, 2011).

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

Outra alternativa que vem surgindo mais recentemente é o MALDI TOF, hoje considerada uma ferramenta rápida e confiável para identificação precisa de leveduras, pois os espectros gerados na identificação são considerados assinaturas únicas de cada micro-organismo, sendo considerada então a metodologia ideal para ser empregada na identificação de espécies fúngicas como as leveduras, pois apresentam mais de 90 % de especificidade na identificação de espécies (MARKLEIN et al., 2009; CROXATTO et al., 2012; ALIZADEH et al., 2017).

Essas novas estratégias de identificação de fungos, embora representem um maior custo na identificação, apresentam uma especificidade elevada na identificação correta das espécies fúngica que causam infecção, além de um tempo de resposta mais rápido, o que pode gerar um melhor custo-benefício ao paciente. No caso da CVV em especial, isso pode representar um diagnóstico correto, e mais que isso, um tratamento adequado para uma intervenção de tratamento mais efetivo. Quando estudos de MBV são realizados em simultâneo à identificação das leveduras das espécies de *Candida*, que causam candidíase, há ainda a possibilidade de correção dessa microbiota vaginal, promovendo um tratamento ainda mais amplo e com maior chance de cura.

1.5. Tratamento e novas perspectivas

São conhecidas quatro classes de antifúngicos que completam o arsenal terapêutico disponível: (1) poliênicos (ex: anfotericina B e nistatina, que atuam na membrana celular, ligam-se ao ergosterol e promovem a formação de poros na membrana celular), (2) azólicos (ex.: fluconazol, itraconazol, voriconazol, que atuam bloqueando a síntese de ergosterol, o principal esterol presente na membrana celular, levando a alterações na conformação da membrana), (3) equinocandinas (ex.: caspofungina, atuam na parede celular fúngica bloqueando a síntese de β -(1,3)-D-glicana, um importante componente da parede celular fúngica, levando a alterações estruturais e lise celular), (4) análogos de pirimidina (ex.: 5-fluorocitosina, que atua no núcleo, inibindo a síntese dos

ácidos nucleicos e proteínas) (GHANNOUM e RICE, 1999; PERLIN, 2011; MAUBON et al., 2014; SANGUINETTI et al., 2015)

Na prática clínica, o tratamento das candidíases é normalmente empírico e feito com uso de azólicos, sendo o fluconazol medicamento de escolha para tratamento de *C. albicans* nas últimas décadas. Além da resistência intrínseca de *C. glabrata* e *C. krusei*, os padrões de sensibilidade de *C. albicans* ao fluconazol foram alterados recentemente: as cepas são consideradas sensíveis atualmente apenas na vigência de um MIC $\leq 2 \mu\text{g/mL}$, enquanto referências anteriormente utilizavam um valor de MIC $\leq 8 \mu\text{g/mL}$ (SOBEL e SOBEL, 2018), que continua a ser liberado em resultados laboratoriais de rotina em testes de sensibilidade a antimicrobianos como MIC sensível, reduzindo as chances de efetividade do tratamento ao paciente.

A crescente resistência de *Candida* spp aos azóis e outras classes de medicamentos, aliada à alta toxicidade de alguns compostos, têm levado à busca tanto por novos medicamentos como por terapias alternativas. Exemplos de novos medicamentos de potencial interesse são aminopiperidinas e isoquisolinas. Hata et al. (2010) demonstraram que novos compostos da classe das aminopiperidinas possuem atividade contra cepas de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei* resistentes ao fluconazol. Compostos derivados de isoquinolina também mostraram atividade contra *C. glabrata* resistente a azol, além de ausência de toxicidade contra células humanas *in vitro* (KRAUSS et al., 2014).

O crescimento dos trabalhos envolvendo uso de nanopartículas nas últimas décadas torna seu uso contra candidíase uma estratégia interessante. Nanopartículas contendo óxido de zinco (ZnONPs) - composto amplamente empregado como microbicida, com eficácia e segurança - têm despontado como agentes promissores, sozinhas ou em combinação a fungicidas. Barad et al. (2017) mostraram que ZnONPs revestidas com quitosana-ácido oleico são efetivas na inibição do crescimento e da formação de biofilmes de *C. albicans*. Das et al. (2016) mostraram que ZnONPs são ativas contra *C. krusei* e que sua ação antifúngica provavelmente está relacionada a estresse oxidativo e produção de espécies reativas de oxigênio.

Além de compostos sintéticos, um grande número de estudos envolvendo produtos naturais, derivados de plantas, com efeitos anti-*Candida*, especialmente *C. albicans*, têm sido conduzidos nas últimas décadas. Os estudos utilizam diferentes plantas medicinais e diferentes frações, como extratos aquosos e óleos essenciais. Diversos mecanismos de ação já foram identificados, e alguns produtos mostraram-se eficazes

tanto em estudos *in vitro* como *in vivo*, representando alternativas promissoras para o tratamento das candidíases (ZIDA et al, 2017).

Uma abordagem para o tratamento de candidíases vaginais que vem ganhando força nos últimos anos é o uso de probióticos, em particular quando administrados via vaginal. Entre as várias formas farmacêuticas disponíveis, os óvulos vaginais parecem ser a mais bem aceita, pela facilidade de aplicação e redução de efeitos adversos (CAMILLETTI et al., 2018). Pelas suas propriedades microbidas contra diversos patógenos urogenitais, algumas cepas de *Lactobacillus* têm sido selecionadas para uso nesses óvulos. Essas cepas mostram ainda características tidas como ideais para uso vaginal, como capacidade de adesão às células epiteliais e de formação de biofilmes (CAMILLETTI et al., 2018).

A entrega de *Lactobacillus* para repovoamento vaginal também pode ser realizada por via oral. O tempo para esta intervenção afetar o trato vaginal é obviamente mais longo que a instilação vaginal direta, e dependerá da viabilidade das cepas quando elas atravessam o estômago e o intestino (MORELLI et al., 2004). No entanto, uma vantagem adicional da suplementação oral é que ela poderia reduzir a transferência de leveduras e bactérias patogênicas do reto para a vagina (REID et al., 2003), reduzindo assim o risco de infecção.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar a atividade inibitória de *Lactobacillus casei* sobre cepas de *Candida* spp. isoladas de casos de candidíase vulvovaginal, em modelo *in vitro*.

2.2. Objetivos específicos

-Identificar espécies de *Candida*, por métodos fenotípicos, sendo eles: prova do tubo germinativo e meio cromogênico.

-Confirmar a identificação por espectrometria de massa *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-flight* (MALDI TOF).

-Avaliar a atividade de *Lactobacillus casei* sobre os isolados clínicos de *Candida* spp. em Cocultivo.

-Realizar a dosagem do ácido láctico e determinar a concentração inibitória mínima do ácido láctico empregando o método de microdiluição.

3. METODOLOGIA

3.1. Origem dos isolados fúngicos e aspectos éticos

Nesta pesquisa foram testados isolados clínicos provenientes de pacientes com suspeita clínica de candidíase vulvovaginal atendidas no ambulatório de ginecologia do Hospital Universitário de Brasília (HUB) pela médica ginecologista Lívia Custódio Pereira; a pesquisa para o isolamento de espécies fúngicas foi aprovada pelo CEP-FM através do parecer consubstanciado número 1.572.449 e a identificação foi realizada no Núcleo de Parasitologia e Micologia da Gerência de Biologia Médica do Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal (NPM-GBM-LACEN-DF),

Após a identificação das espécies fúngicas, foram selecionados 6 isolados clínicos, preservando-se as informações restritas à pesquisa anterior. Cinco destes isolados foram selecionados por corresponderem às principais espécies de *Candida* isoladas: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida norvegensis*; e por apresentarem perfil de resistência a algum(uns) dos antifúngicos testados na pesquisa (fluorocitosina, fluconazol, voriconazol, anfotericina-B, caspofungina e micafungina). Além das espécies acima citadas, foi incluída uma cepa de *Candida auris*, espécie emergente que apresenta perfil de resistência às principais classes de antifúngicos existentes atualmente (poliênicos, azóis e equinocandinas), e foi gentilmente cedida pelo Núcleo de Parasitologia e Micologia do LACEN-DF.

3.2. Isolamento e conservação dos isolados fúngicos

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

Todas as amostras isoladas foram conservadas em solução aquosa de glicerol a 10 % e congeladas em microtubos de centrifugação de 2,0 mL a temperatura de 20°C

negativos, para recuperação e processamento posterior.

3.3. Identificação fenotípica das espécies de *Candida*

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

3.3.1. Prova do Tubo Germinativo (PTG)

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

3.3.2. Identificação em Meio Cromogênico

O meio cromogênico é indicado para identificação presuntiva de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei*. Estas espécies de *Candida* são diferenciadas a partir da produção de colônias de cores diferentes devido à reação com os substratos cromogênicos presentes no meio. Os diferentes meios cromógenos de cultivo, são fundamentados na cor desenvolvida pelas colônias através de indicadores de pH e fermentação de compostos específicos ou substratos cromógenos, têm sido utilizados para diferenciar *Candida albicans* e outras leveduras de interesse clínico. *Candida albicans* produz colônias de coloração verde clara a verde médio, *Candida tropicalis* apresenta colônias azuis esverdeadas a metalizadas, com ou sem halo violeta e *Candida krusei* apresenta colônias de cor de rosa claro a vermelho claro com rebordo esbranquiçado. Outras colorações são atribuídas às espécies de leveduras do gênero *Candida* como:

Candida parapsilosis, *Candida guilliermondii*, *Candida famata*, *Candida glabrata*, entre outras (ODDS E BERNAERTS, 1994). Entretanto, o meio cromogênico não foi utilizado neste estudo para identificar estas espécies.

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

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

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

O princípio metodológico da técnica utiliza células leveduriformes inteiras, que possuem biomarcadores moleculares, como peptídeos ou proteínas ribossômicas que são detectados nos espectros gerados após a leitura no equipamento. Esses espectros de proteínas são característicos de cada espécie fúngica e funcionam como a impressão digital (*Fingerprinting*) de cada espécie microbiana, que são posteriormente comparados a espectros depositados em bancos de dados que permitem a identificação por comparabilidade (NEPPELENBROEK et al., 2014; MCCARTY e PAPPAS, 2015).

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

O material aplicado sobre o *slide*, permaneceu mantido à temperatura ambiente novamente para secagem, e sobre a camada formada entre a colônia de *Candida* spp e o ácido fórmico aplicou-se 1 μ L de solução de matriz 3,1 % (ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico - CHCA, Biomérieux, Marcy l'Etoile, França). Após secagem da matriz,

novamente à temperatura ambiente, os *slides* foram transferidos para a estação de leitura do Sistema Vitek MS[®] (Biomérieux, Marcy l'Etoile, França), onde as identificações microbianas foram realizadas através da obtenção de espectros.

Os espectros foram analisados utilizando a base de conhecimento Vitek MS[®] (Biomérieux, Marcy l'Etoile, França) Versão 3.0. Foram realizadas comparações dos picos formados com os padrões característicos da espécie, gênero ou família do microorganismo, resultando na identificação deste. Os resultados foram considerados válidos quando os percentuais de probabilidade de identificação foram iguais ou superiores a 99,9 % (KIM et al., 2014).

3.5. Isolamento de *Lactobacillus*

A cepa de *Lactobacillus casei* utilizada foi isolada de bebida fermentada comercial (YAKULT[®] – Lote H1336), e sua identidade foi confirmada empregando a metodologia de MALDI TOF.

3.6. Preparo dos meios de cultura YM e MRS empregados para cocultivo

3.6.1. Meio de cultura YM

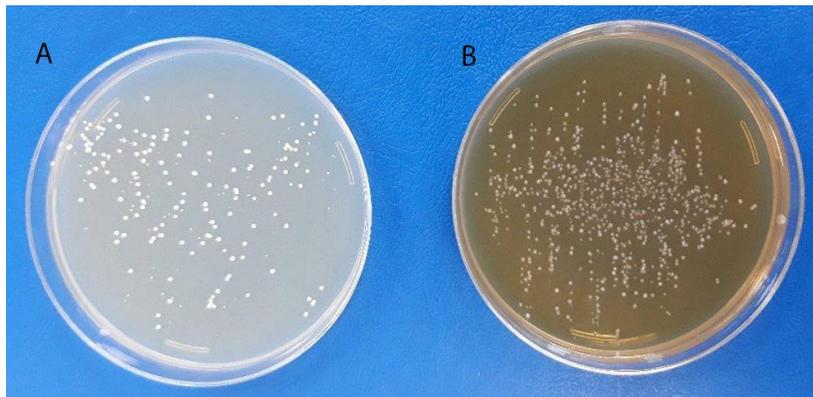
Para o preparo de 1L do meio YM, inicialmente formulado por Wickerham (WICKERHAM, 1951), foram utilizados: glicose 1 %, extrato de malte 0,3 %, peptona 0,5 % e extrato de levedura 0,3 %. Para o preparo do meio sólido foi adicionado 2 % de ágar bacteriológico. A esterilização foi realizada a 121°C por 15 minutos em autoclave, e o pH do meio líquido foi medido e ajustado para obtenção de um pH final de 6,8 em pHmetro (GEHAKA PG2000, São Paulo, Brasil).

3.6.2. Meio de cultura MRS

O meio de cultura Man, Rogosa e Sharpe (MRS) como é conhecido, foi inicialmente formulado por estes autores em 1960 (DE MAN, ROGOSA E SHARPE, 1960). Para o preparo de 1 L do meio líquido ou caldo MRS foram utilizados: peptona 1 %, extrato de carne 1%, extrato de levedura 0,5 %, dextrose 2 %, acetato de sódio 0,5 %, polisorbato 80 0,1 %, fosfato de potássio 0,2 %, citrato de amônio 0,2 %, sulfato de

magnésio 0,01 % e sulfato de manganês 0,005 %. Para o preparo do meio sólido foi adicionado 1,5 % ágar bacteriológico. A esterilização foi realizada a 121°C por 15 minutos em autoclave. Após o preparo, o meio líquido teve seu pH medido e ajustado, para obtenção de pH final 6,8 em pHmetro (GEHAKA PG2000, São Paulo, Brasil).

Figura 1 – Cultivo de *Candida albicans* e *Lactobacillus casei*



A – Meio YM, B – Meio MRS

3.7. Método empregado para o cocultivo

3.7.1. Isolados microbianos empregados no cocultivo

Para a técnica de cocultivo de micro-organismos, foram utilizados isolados de *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida norvegensis* e *Candida auris*, e a cepa de *Lactobacillus casei*.

3.7.2. Atividade de *Lactobacillus casei* sobre os isolados clínicos de *Candida* spp em cocultivo

A partir de culturas puras e frescas de *Candida* spp., obtidas de subcultivos em ágar Sabouraud com cloranfenicol (HiMedia, Mumbai, Índia) a 35 °C (\pm 2 °C) durante 24 horas, e culturas puras e frescas de *L. casei*, subcultivadas em ágar sangue, por 24 horas a 35°C (\pm 2°C) foi realizada a técnica de cocultivo de acordo com Kang et al. (2017), com modificações descritas a seguir.

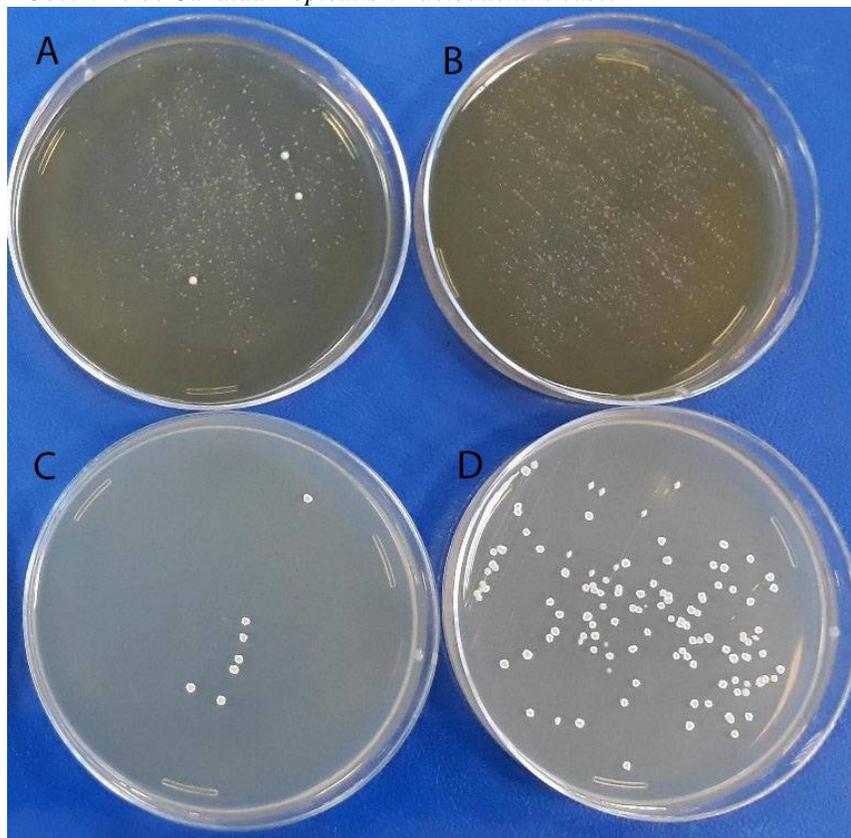
No preparo do inóculo foram dissolvidas colônias de *Candida* spp e *L. casei*, individualmente em tubos de ensaio com 3,0 mL de solução salina estéril 0,85 %, até

obter uma suspensão equivalente a 0,5 da escala de McFarland ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) no turbidímetro DensiCHEK-plus (Vitek®, Biomérieux, Marcy l'Etoile, França) (CLSI, 2004).

Em seguida, os inóculos das espécies microbianas foram adicionados em caldo misto, com volume final de 3 mL, contendo 1,5 mL do caldo YM e 1,5 mL do caldo MRS. O volume utilizado de cada inóculo foi de 500 μ L, ou seja, 500 μ L do inóculo do *Lactobacillus casei* e 500 μ L de cada espécie de *Candida*, perfazendo um volume total de 4 mL do cocultivo. Os tubos com o cocultivo foram incubados à temperatura de 37 °C durante o período de 24 horas. Como controle positivo para as espécies de *Candida* foi utilizado 1,5 mL de caldo YM e 500 μ L do inóculo, e como controle positivo para o *Lactobacillus casei* foi utilizado 1,5 mL de caldo MRS e 500 μ L do inóculo. Todos os controles foram incubados na mesma condição dos testes.

Após o período de incubação no meio misto, foi retirada uma alíquota de 10 μ L para fazer uma diluição de 1:100, e a partir dessa diluição foi realizada uma nova diluição de 1:20 (CLSI, 2004). Da diluição final (1:20) foram inoculados 10 μ L em placas de Petri contendo meios YM e MRS sólidos, que foram incubados à 37°C por 24 horas. A determinação da atividade microbiana dos *Lactobacillus casei* sobre as espécies de *Candida* foi avaliada pela contagem de Unidades Formadoras de Colônias por mL (CFU/mL). A quantificação (CFU) foi realizada em meio YM para melhor visualização de *Candida ssp* e em meio MRS para *Lactobacillus casei*. Todas as amostras e controles foram testados em triplicata técnica e em duplicata biológica.

Figura 2 – Cocultivo de *Candida tropicalis* e *Lactobacillus casei*



A – Cocultivo *Candida tropicalis* e *Lactobacillus casei* em meio MRS, B - *Lactobacillus casei* em meio MRS (controle positivo), C – Cocultivo *Candida tropicalis* x *Lactobacillus casei* em meio YM; D - *Candida tropicalis* em meio YM (controle positivo)

3.7.3. Avaliação do pH

A medição de pH dos cocultivos foi realizada antes e após período de incubação. A medição foi feita com fitas pH-Fix 0-14 (Macherey-Nagel), nas quais foram depositados 10 μ L sobre a superfície e para leitura foi utilizado padrão de indicação de mudança de coloração, do próprio fabricante.

3.7.4. Dosagem do Ácido Lático

A dosagem do ácido lático foi realizada com o caldo misto do cocultivo (MRS + YM + *Candida* spp. + *Lactobacillus casei*), após incubação por 24 horas. Antes da dosagem foi realizada uma etapa de filtração empregando filtro com de 0,2 μ m para eliminação de resíduos celulares de *Candida* e *L. casei*, que poderiam interferir na dosagem do ácido lático. A dosagem foi realizada do equipamento Cobas 6000 (Roche

Diagnósticos), empregando um método colorimétrico. A quantidade do ácido láctico foi obtida em mg/dL, e foram empregados como controles os cultivos isolados de *Candida* spp e *Lactobacillus casei*, além do controle do *kit*. O valor de referência do ácido láctico sérico padronizado pelo *kit* comercial é de 4,5 a 19,8 mg/dL.

O método empregado para a determinação do ácido láctico, utiliza como princípio uma reação enzimática para converter o L-lactato em piruvato através da enzima lactato oxidase (LDD), e essa reação gera peróxido de hidrogênio. Esse peróxido de hidrogênio presente é então utilizado na reação enzimática subsequente que, na presença de um doador de prótons e de 4-amino-2,3-dimetil-1-fenil-3-pirazol-5-1 (ampirona), é convertido pela enzima peroxidase (POD) em L-lactato e água. Após esta reação o L-lactato é convertido em um cromógeno, que pode ser medido espectrofotometricamente em 700/660 nm no espectrofotômetro digital 325-1000NM Modelo GT7220.

3.8. Concentração Inibitória Mínima (MIC - *Minimal Inhibitory Concentration*) do Ácido Láctico

3.8.1. Método de microdiluição

A partir de inóculo fúngico em solução salina 0,85 %, com concentração equivalente a 0,5 da escala de McFarland (1×10^5 CFU/mL) (CLSI, 2004), o ensaio de microdiluição foi realizado em placa com 96 poços estéril. Para isso, foi realizada uma diluição seriada (1/2, 1/4 e 1/8) de uma solução de ácido láctico a 2 %, para obter respectivamente as concentrações de 10, 5 e 2,5 mg/mL ou 1, 0,5 ou 0,25 %. A cada poço da placa de microdiluição foram adicionados 100 μ L de inóculo de *Candida* spp, com volume final de 200 μ L/poço.

A microplaca foi incubada a 35 °C (± 2 °C) por 24 horas. Após esse período de incubação, 10 μ L do conteúdo de cada poço foi semeado em placas de YM e em seguida as placas foram incubadas à 37°C (± 2 °C) por 24 horas para determinar a concentração inibitória mínima do ácido láctico. Como controle de crescimento (controle positivo), foi utilizado o inóculo de cada espécie de *Candida* spp. e para o controle negativo a solução de ácido láctico. Todas as amostras e controles foram testados em triplicata técnica e em duplicata biológica.

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação da atividade microbiana de uma cepa de *Lactobacillus casei* sobre espécies de *Candida* após semente em ágar YM

Para análise da atividade microbiana da cepa de *Lactobacillus casei* sobre os isolados clínicos de *Candida spp.* após o método de cocultivo, empregamos a quantificação de células leveduriformes viáveis em meio ágar YM, que possibilita melhor visualização de crescimento das leveduras em Unidades Formadoras de Colônias por mL (CFU/mL - *Colony Forming Unit*).

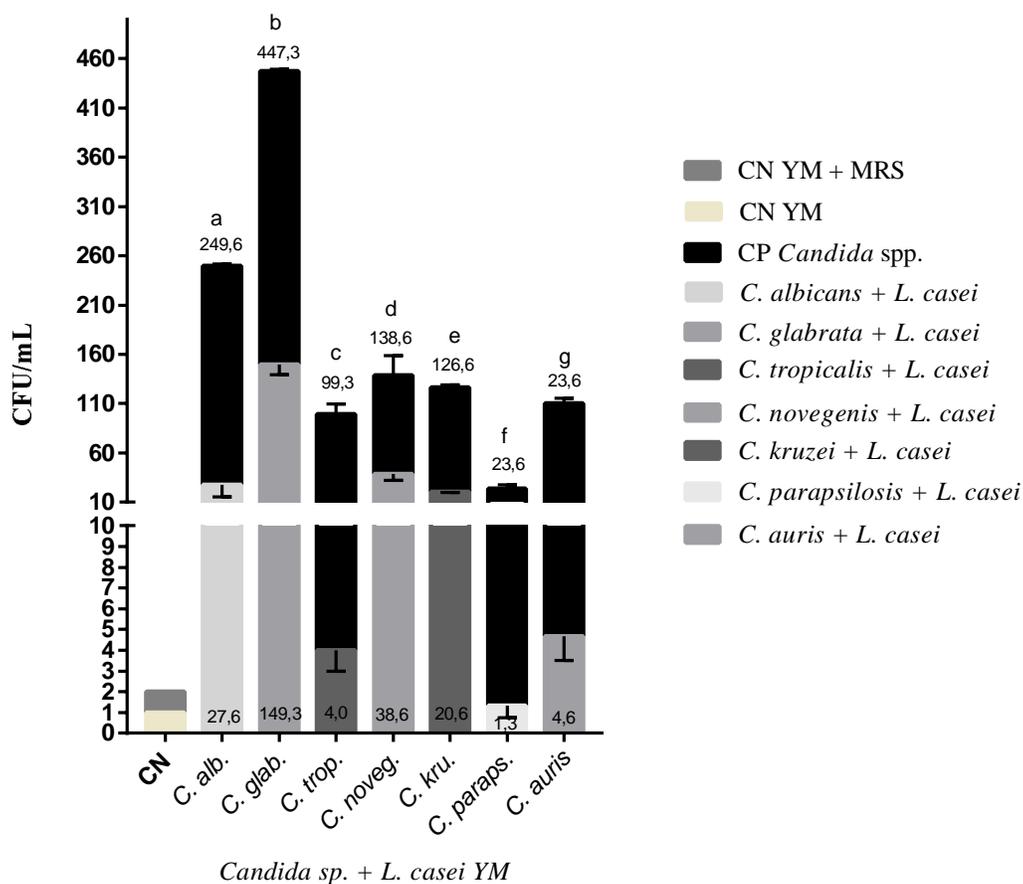
No presente estudo, a contagem de CFU/mL de cada espécie de *Candida spp.* revelou que a cepa de *L. casei* utilizada apresenta forte atividade microbiana sobre todas as espécies fúngicas testadas, inibindo o crescimento destas após 24h do cocultivo.

Estes dados podem ser constatados quando avaliamos na figura 3 a redução da quantidade de CFU/mL de todas as espécies testadas de *Candida*, que apresentaram os seguintes resultados: *C. albicans*, foi reduzida de 249,6 para 27,6 CFU/mL (9x), *C. glabrata*, foi reduzida de 447,3 para 149,3 CFU/mL (3x), *C. tropicalis*, foi reduzida de 99,3 para 4,0 CFU/mL (24x), *C. norvegensis*, de 138,6 para 38,6 CFU/mL (3,5x), *C. kruzei*, de 126,6 para 20,6 CFU/mL – 6x), *C. parapsilosis*, de 23,6 para 1,3 CFU/mL (18x) e *C. auris* foi reduzida de 23,6 para 4,6 CFU/mL (5x).

De forma preliminar, podemos sugerir que a inibição parece ser mais efetiva sobre *C. tropicalis* (24x) e *C. parapsilosis* (18x), e menos efetiva para *C. glabrata* (3x) e *C. norvegensis* (3,5x) (Figura 3).

Figura 3 – Avaliação da atividade microbiana de cepa de *Lactobacillus casei* sobre espécies de

Candida após cocultivo em meio YM ágar (CFU/mL)



**Candida* spp. representa cada espécie de *Candida* estudada (controle positivo). Análise estatística realizada com Teste *t*-student múltiplo definiu $p \leq 0,05$ com estatisticamente significativa após as comparações entre controle positivo e cocultivo. Os valores de p encontrados nas comparações foram a - $p \leq 0,00001$, b - $p \leq 0,00009$, c - $p \leq 0,007$, d - $p \leq 0,0000003$, e - $p \leq 0,0009$, f - $p \leq 0,0000004$; g - $p \leq 0,00005$.

Para avaliação da atividade microbica da cepa de *Lactobacillus casei* sobre *Candida* spp., foi transformado os dados iniciais em percentagem. Os dados de crescimento em CFU/mL de cada espécie de *Candida* isoladamente foram denominados controle positivo (CP), e do cocultivo *Candida* spp. + *Lactobacillus casei* (CFU/mL), denominados amostras a serem avaliadas.

A atividade microbica (%) foi calculada de forma específica para cada espécie de *Candida*, considerando o CP como 100 % de crescimento, e o cocultivo como sendo a inibição percentual efetivamente realizada, que quando reduzida de 100, foi representada em percentagem.

A atividade microbica de *L.casei* sobre as espécies de *Candida* em termos percentuais foram: *C. albicans* 88,9 %, *C. glabrata* 66,6 %, *C. tropicalis* 96,0 %, *C.*

norvegensis 72,2 %, *C. krusei* 83,7 %, *C. parapsilosis* 94,5 % e *C. auris* 81,8 % (Tabela1). observamos um maior percentual microbicida para *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, e menor percentual para *C. glabrata* e *C. norvegensis* (tabela 1).

Na análise do percentual da atividade microbicida de cada espécie de *Candida* como um todo, é preciso reforçar que, embora tenha havido diferentes espectros de inibição, em todos os cocultivos essa atividade microbicida foi superior a 66,6 %, demonstrando capacidade promissora de inibição de crescimento das espécies de *Candida*, incluindo a espécie emergente e multirresistente *C. auris*, cuja atividade microbicida foi de 81,8 %.

Tabela 1 - Avaliação percentual da atividade microbicida de cepa de *Lactobacillus casei* após cocultivo com *Candida* spp. em meio YM

	CP <i>Candida</i> spp.(CFU)	Cocultivo <i>Candida</i> spp. + <i>L.</i> <i>casei</i> (CFU)	Atividade microbicida (%)
<i>Candida albicans</i>	249,6	27,6	88,9
<i>Candida glabrata</i>	447,3	149,3	66,6
<i>Candida tropicalis</i>	99,3	4,0	96,0
<i>Candida norvegensis</i>	138,6	38,6	72,2
<i>Candida krusei</i>	126,6	20,6	83,7
<i>Candida parapsilosis</i>	23,6	1,3	94,5
<i>Candida auris</i>	23,6	4,3	81,8

CP (controle positivo de cada espécie de *Candida*)

4.2. Avaliação da atividade microbicida de cepa de *Lactobacillus casei* sobre espécies de *Candida* após semeio em ágar MRS

Paralelamente, como etapa do estudo, foi utilizado o meio ágar MRS para o semeio após o cocultivo, esta escolha foi baseada no fato de que o meio MRS é empregado para o cultivo de *Lactobacillus* spp. e auxilia o crescimento exuberante deste micro-organismo, - embora também favoreça o crescimento das leveduras -, permitindo a contagem e a melhor visualização principalmente dos *Lactobacillus* spp. e ratificando os dados obtidos anteriormente.

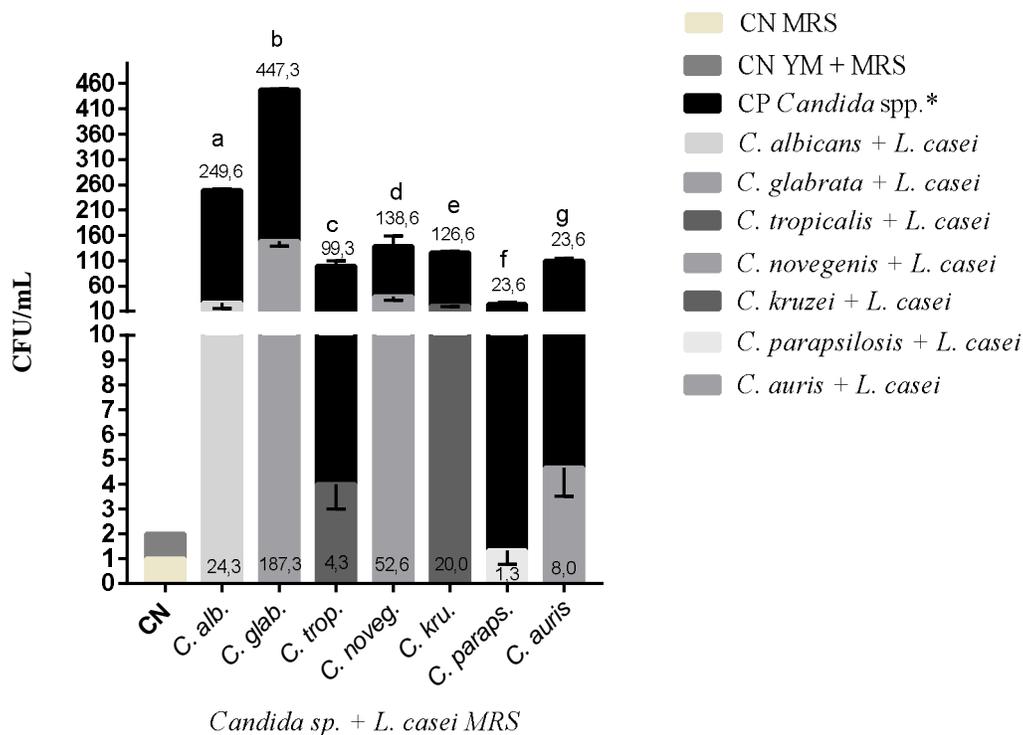
Estes dados são avaliados na figura 4, que confirma e reforça a redução da quantidade de CFU/mL de todas as espécies testadas de *Candida*, conforme descrito a seguir: *C. albicans*, foi reduzida de 249,6 para 24,3 CFU/mL (10x), *C. glabrata*, de

447,3 para 187,3 CFU/mL (2,4x), *C. tropicalis*, de 99,3 para 4,3 CFU/mL (23x), *C. norvegensis*, foi reduzida de 138,6 para 52,6 CFU/mL (2,6x), *C. kruzei*, de 126,6 para 20 CFU/mL (6,3x), *C. parapsilosis*, de 23,6 para 1,3 CFU/mL (18x) e *C. auris*, de 23,6 foi reduzida para 8,0 CFU/mL (3x).

De forma preliminar, podemos sugerir que a inibição da cepa de *L. casei* parece ter sido mais efetiva novamente sobre *C. tropicalis* (23x) e *C. parapsilosis* (18x), e menos efetiva para *C. glabrata* (2,4x) e *C. norvegensis* (2,6x) (Figura 4).

Comparando os resultados do semeio nos meios ágar YM e MRS, não foram observadas alterações significativas nos resultados, confirmando a atividade antifúngica do *Lactobacillus casei* frente a todas as espécies de *Candida*.

Figura 4 - Atividade microbicida de cepa de *Lactobacillus casei* sobre espécies de *Candida* em meio MRS ágar (CFU/mL)



**Candida* spp. representa cada espécie de *Candida* estudada (controle positivo). Análise estatística realizada com com Teste *t-student* múltiplo definiu $p \leq 0,05$ com estatisticamente significativa após as comparações entre controle positivo e cocultivo. Os valores de *p* encontrados nas comparações foram a - $p \leq 0,00001$, b - $p \leq 0,00001$, c - $p \leq 0,007$, d - $p \leq 0,0000003$, e - $p \leq 0,0009$, f - $p \leq 0,0000004$; g - $p \leq 0,00005$.

Foi realizada a avaliação em porcentagem da atividade microbicida da cepa de *L. casei* após o cocultivo com *Candida* spp. utilizando controle positivo *Lactobacillus casei*

e do cocultivo *Candida spp.*+ *Lactobacillus casei* em CFU/mL.

A atividade microbicida da cepa de *L. casei* sobre as espécies de *Candida* em termos percentuais foram: *C. albicans*, 90,3 %, *C. glabrata*, 58,1 %, *C. tropicalis*, 95,7 %, *C. norvegensis*, 62,0 %, *C. Krusei*, 83,7 %, *C. parapsilosis*, 94,5 % e *C. auris*, 66,1 % (tabela 2). Os resultados apresentam maior percentual microbicida para *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, e menor percentual para *C. glabrata* e *C. norvegensis*. Observando os resultados dos percentuais da atividade microbicida de cada espécie de *Candida* em todos os cocultivos, esse percentual foi superior a 50 %.(tabela 2).

Tabela 2 - Avaliação percentual da atividade microbicida de *Lactobacillus casei* após cocultivo com *Candida spp.* em meio MRS

	CP <i>Candida spp.</i> (CFU)	Cocultivo <i>Candida spp.</i> + <i>L.</i> <i>casei</i> (CFU)	Atividade microbicida (%)
<i>Candida albicans</i>	249,6	24,3	90,3
<i>Candida glabrata</i>	447,3	187,3	58,1
<i>Candida tropicalis</i>	99,3	4,3	95,7
<i>Candida norvegensis</i>	138,6	52,6	62,0
<i>Candida krusei</i>	126,6	20,6	83,7
<i>Candida parapsilosis</i>	23,6	1,3	94,5
<i>Candida auris</i>	23,6	8,0	66,1

CP (controle positivo de cada espécie de *Candida*)

4.3. Avaliação do pH

O pH do meio de cocultivo foi avaliado antes e após as 24 h de incubação, em todas as culturas de *Lactobacillus casei* e *Candida spp.* houve alteração de pH com aumento da acidez. Inicialmente quando os micro-organismos foram colocados em contato um com o outro o pH aferido foi de 6,0, após 24h de cocultivo esse pH passou a ser 5,0 em todos os cocultivos avaliados, o que demonstra claramente a presença de um fator ácido produzido durante o período de cultivo, e que pode ser atribuído a produção de ácido lático pelo *Lactobacillus casei*.

4.4. Avaliação da produção de ácido lático após o cocultivo

De acordo com os resultados apresentados na tabela 3, nos cultivos isolados das

espécies de *Candida* observa-se pouca produção de ácido láctico, mas no cocultivo das espécies de *Candida* com a cepa de *L. casei* empregada no estudo verifica-se valores significativos do ácido láctico, sugerindo que o efeito microbiano do *L. casei* pode estar associado à produção de ácido láctico.

Como controle negativo de cultivo empregamos os meios YM e MRS isolado e conjuntamente, com a finalidade de demonstrar que a produção do ácido láctico não sofre interferência de nenhum componente do meio de cultivo empregado, e como controle positivo usamos a cepa de *Lactobacillus casei* isoladamente cultivada nos meios YM e MRS.

Tabela 3 - Avaliação da produção de Ácido láctico após cocultivo de cepa de *Lactobacillus casei* com espécies de *Candida*

Ácido Láctico	YM	Cocultivo 24h	
	<i>Candida spp.</i> mg/dL	<i>Candida spp. + L. casei</i> mg/dL	mg/mL
Meio YM (CN)	0	0	0
Meio MRS (CN)	0	0	0
Meio YM + MRS (CN)	0	0	0
<i>Lactobacillus casei</i> (CP)	-	1034,0*	10,34
<i>Candida albicans</i>	2,0	707,3	7,07
<i>Candida glabrata</i>	1,9	651,7	6,51
<i>Candida tropicalis</i>	2,1	758,3	7,58
<i>Candida norvegensis</i>	2,5	822,1	8,22
<i>Candida krusei</i>	1,9	780,7	7,80
<i>Candida parapsilosis</i>	2,3	814,3	8,14
<i>Candida auris</i>	2,1	824,2	8,24

CN (controle negativo), CP(controle positivo), **Lactobacillus casei* cultivado em YM e MRS

4.5. Avaliação da concentração de Ácido láctico que apresenta atividade microbicida

Para confirmarmos a capacidade microbicida do ácido láctico sobre espécies de *Candida*, empregamos ácido láctico PA em três concentrações distintas 10, 5 e 2,5 mg/mL com base na produção biológica dos *Lactobacillus* presentes na microbiota saudável normal, cuja concentração é de aproximadamente 1%, que corresponde a aproximadamente 10 mg/mL (O'HANLON et al., 2013).

A tabela 4 mostra a Concentração Inibitória Mínima (MIC) de ácido láctico frente

às espécies de *Candida* spp. A concentração de 2,5 mg/mL apresentou efeito antimicrobiano contra a maioria das espécies de *Candida*, a única exceção foi a espécie *Candida parapsilosis*, cuja concentração inibitória mínima foi 5 mg/dL. Com estes resultados podemos afirmar que ácido láctico possui atividade antimicrobiana sobre as cepas de *Candida* estudadas, inclusive a cepa multirresistente de *Candida auris*.

Tabela 4 – MIC do ácido láctico para as espécies de *Candida* estudadas

Ácido Láctico (mg/dL)	Concentrações empregadas		
	10 mg/mL (1 %)	5 mg/mL (0,5 %)	2,5 mg/mL (0,25 %)
Meio MRS (CN)	-	-	-
<i>Lactobacillus casei</i> (CP)	+	+	+
<i>Candida albicans</i>	+	+	+
<i>Candida glabrata</i>	+	+	+
<i>Candida tropicalis</i>	+	+	+
<i>Candida novogensis</i>	+	+	+
<i>Candida krusei</i>	+	+	+
<i>Candida parapsilosis</i>	+	+	-
<i>Candida auris</i>	+	+	+

(+) Com atividade, (-) Sem atividade

5. DISCUSSÃO

A microbiota vaginal é colonizada por diversas espécies microbianas incluindo espécies dos gêneros *Lactobacillus* e *Candida*. Normalmente, os micro-organismos convivem em equilíbrio, mas na vigência de um desequilíbrio hormonal, citopatológico ou imune, que causa a chamada disbiose, é comum ocorrer proliferação desordenada de espécies de *Candida*, causando as vulvovaginites (ANDRIOLI, 2009; BRANDOLT et al., 2017).

A CVV é um dos diagnósticos mais frequentes em ginecologia, sendo a segunda infecção genital mais comum (RODRIGUÉZ-CERQUEIRA et al., 2019). Um dos principais problemas associados a essas infecções é a falha da terapia antifúngica, resultando episódios de CVV recorrente (SOBEL, 2016).

Muitas linhagens de *Candida* spp apresentam resistência aos azóis, que são os principais antifúngicos utilizados na prática clínica (GONÇALVES et al., 2016), complicando o tratamento das candidíases e voltando o interesse na busca de terapias alternativas que visem a melhoria do paciente, com menos efeitos colaterais e mais eficácia. Uma das estratégias mais promissoras é o uso de probióticos, em especial de *Lactobacillus* spp (KIM e PARK, 2017).

Neste estudo foi analisada a atividade microbicida de *Lactobacillus casei* sobre sete isolados clínicos de *Candida* spp, cada um de uma espécie diferente, representando as principais espécies envolvidas na etiologia de CVV (GONÇALVES et al., 2016), além do patógeno emergente *C. auris*. Após o cocultivo, a quantificação de UFC de células leveduriformes mostrou que *L. casei* apresenta significativa atividade inibitória sobre todas as cepas testadas, reduzindo seu crescimento após 24 horas. A inibição por *L. casei* observada aqui foi bastante efetiva - 88,9 % - sobre *C. albicans*, que é ainda a espécie mais prevalente nas CVV (SOBEL, 2016). Para a cepa de *C. tropicalis* foi de 96% (em meio YM). A inibição do crescimento promovida por *L. casei* sugere que essas bactérias são capazes de produzir substâncias com atividade antifúngica, capazes de afetar as cepas testadas.

Diversos mecanismos microbicidas e inibitórios sobre agentes patogênicos têm sido atribuídos a espécies de *Lactobacillus*, principalmente a partir de estudos *in vitro*. Segundo De Seta et al., (2014), *Lactobacillus* spp são capazes de inibir a adesão, o crescimento e a proliferação de outros micro-organismos estranhos ao meio vaginal por mecanismos que incluem a secreção de ácidos orgânicos (como ácido lático) e a

competição por nutrientes e por receptores no momento da adesão ao epitélio. O efeito inibitório sobre patógenos também já foi atribuído a outras substâncias como bacteriocinas (FUOCHI et al., 2018) e peróxido de hidrogênio (SGIBNEV e KREMLEVA, 2015).

Acredita-se que entre todos os mecanismos existentes, a manutenção do meio ácido pelos *Lactobacillus* seja um dos principais fatores de proteção do trato urogenital feminino (MIRMONSEF et al., 2014). No presente estudo, foi verificada a redução de pH (de 6,0 para 5,0 após 24 horas) em todos os cocultivos de *Candida/Lactobacillus* analisados.

Alguns estudos têm mostrado que isômeros do ácido láctico apresentam níveis baixos em pacientes com disbiose, e concentrações maiores em mulheres cuja microbiota é dominada por *Lactobacillus*, resultando em maior acidez vaginal nestas últimas (PETROVA et al., 2015). O ácido láctico é produzido durante o metabolismo fermentativo de carboidratos, especialmente a partir do glicogênio, abundante no meio vaginal. Embora outras substâncias tenham sido implicadas na ação microbicida de *Lactobacillus* (KOVACHEV, 2018), estudos recentes indicam que o ácido láctico é o principal fator microbicida produzido por *Lactobacillus* (TACHEDJIAN et al., 2017).

Para investigar o envolvimento de ácido láctico na acidificação do meio, a concentração dessa substância foi dosada a partir dos meios onde foi realizado o cocultivo (MRS + YM + *Candida* spp.+ *Lactobacillus casei*), empregando a metodologia de ensaio enzimático. Os valores significativamente elevados dessa substância na presença de *L. casei* confirmam seu envolvimento na queda de pH verificada nos cocultivos. Segundo Tachedjian et al., (2017), o ácido láctico é o principal acidificante no trato reprodutivo feminino quando a microbiota é dominada por *Lactobacillus*, com as células epiteliais contribuindo com apenas 15% do ácido láctico presente, sendo *Lactobacillus* os principais produtores.

Embora a concentração de outros ácidos orgânicos não tenha sido mensurada neste trabalho, a abundante produção de ácido láctico por *L. casei* levou a investigar sua participação na inibição do crescimento das cepas de *Candida*. O ensaio de microdiluição mostrou que o ácido láctico foi capaz de inibir totalmente o crescimento da maioria das cepas de *Candida* testadas, com exceção de uma cepa de *C. parapsilosis* na concentração mínima testada, de 2,5 mg/mL. Na concentração de 5 mg/mL não foi verificado crescimento de células de *Candida* sp, confirmando a ação antifúngica do ácido láctico. Segundo Mira et al. (2010), ácidos orgânicos são capazes de se dissociar diretamente no

citosol microbiano, que é quase neutro, devido às suas propriedades lipofílicas, tornando-os muito eficientes como antimicrobianos (MIRA et al., 2010).

A concentração mínima aqui estudada, de 2,5 mg/mL é menor do que a concentração fisiológica estimada por O'Hanlon et al., (2013), sugerindo que o ácido láctico vaginal tem ação microbicida suficiente para controlar o crescimento de microorganismos patogênicos como *Candida*. Apoiam essa visão diversos estudos mostrando a ação microbicida do ácido láctico produzido por *Lactobacillus* sobre patógenos urogenitais, como *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoea*, *Escherichia coli* e *Gardnerella vaginalis* (TACHEDJIAN et al., 2017). Entretanto, há uma dificuldade inerente em transpor os resultados obtidos em outros modelos e em estudos *in vitro* para o que acontece *in vivo*.

Apesar do papel bem conhecido de *Lactobacillus* no equilíbrio microbiológico do ambiente vaginal, e apesar do uso empírico de cepas dessas bactérias como probióticos, pouco tem sido estudado sobre a ação dessas bactérias e do ácido láctico sobre linhagens de *Candida* spp causadoras de CVV. No presente estudo, foram utilizadas cepas isoladas de casos clínicos de CVV, com resistência a azóis e outros antifúngicos, fato comum em casos de CVV recorrentes. Além disso, a cepa de *L. casei* utilizada foi isolada de leite fermentado comercial, sendo provavelmente uma das cepas probióticas mais difundidas no mundo. Assim, embora sendo um estudo *in vitro*, as cepas utilizadas são mais representativas da realidade que cepas padrão (ATCC).

Atualmente formulações probióticas para uso vaginal estão sendo desenvolvidas (CAMILLETTI et al., 2017). No entanto, essas normalmente visam o tratamento e não a prevenção de CVV. É conhecido que a fonte primária da microbiota vaginal é o intestino (DANIELSSON et al., 2011). Dessa forma, a ingestão de probióticos pode favorecer a colonização vaginal com cepas produtoras de ácido láctico, ajudando a prevenir as CVV.

A sobrevivência e dispersão para a vagina de cepas probióticas de *Lactobacillus* obtidas por via oral já foi demonstrada em alguns trabalhos. Segundo Leão et al., (2015), a ingestão de *L. rhamnosus* pode prevenir o desenvolvimento da candidíase em camundongos imunossuprimidos. Vladareanu et al., (2018) apresentaram resultados mostrando que *L. plantarum* P17630 sobrevive no trato gastrointestinal e pode atingir a vagina, mantendo sua ação probiótica.

Outros estudos mostraram que a administração de probióticos juntamente com os antifúngicos diminui tanto os sintomas como a presença de leveduras detectadas por cultura, enquanto a presença de *Lactobacillus* spp é significativamente aumentada (DE

SETA et al., 2014; KOVACHEV e VATCHEVA-DOBREVSKA, 2015). Segundo Davar et al., (2016) a administração conjunta de probióticos com antifúngicos foi eficaz para a prevenção das recidivas de candidíase vulvovaginal.

É consenso que uma microbiota vaginal dominada por espécies de *Lactobacillus* é um dos principais determinantes da saúde urogenital feminina (PETROVA et al., 2015; TACHEDJIAN et al., 2017; KOVACHEV, 2018; FUOCHI et al., 2018). O presente trabalho apresenta evidências de que *L. casei* derivado de leite fermentado tem ação microbicida sobre cepas causadoras de CVV. O fato de que essas cepas podem ser fonte de colonização vaginal sugere que o consumo de leites fermentados pode ser útil na prevenção e/ou tratamento das CVV.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho apresenta o efeito microbicida de *Lactobacillus casei* isolado de produto lácteo comercial, disponível para consumo humano, que teve sua identidade laboratorial enquanto cepa biológica comprovada empregando a metodologia de MALDI TOF. Este micro-organismo produziu seu efeito microbicida sobre espécies de *Candida* isoladas de infecções vulvovaginais, em mulheres que apresentam a infecção no momento da coleta do material biológico. Isso representa de forma alinhada, mesmo em resultados obtidos *in vitro*, novas perspectivas de tratamento, ou seja, como um probiótico de origem alimentar comprovadamente pode apresentar efeito microbicida sobre espécies de *Candida*, que são capazes de causar vaginite como a candidíase, que representa a segunda maior causa de infecção sintomática em mulheres em todo o mundo, sendo considerada pela sua recorrência um problema de saúde pública, por afetar a qualidade de vida das mulheres afetadas. Esses resultados, embora preliminares, sugerem que alternativas de tratamento, bem como o uso de terapias combinadas como as de intervenção alimentar, precisam estar cada vez mais alinhadas com o tratamento farmacológico disponível, que cada vez é menos efetivo, mais tóxico e seleciona resistência microbiana entre as espécies de *Candida* isoladas destas infecções.

7. REFERÊNCIAS

ALIZADEH, M. et al. Identification of *Candida* species isolated from vulvovaginitis using matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **Current medical mycology**, v. 3, n. 4, p. 21-25, 2017. ISSN 2423-3439. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC5917097/>>.

ÁLVARES, C. A.; SVIDZINSKI, T. I. E.; CONSOLARO, M. E. L. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, p. 319-327, 2007. ISSN 1676-2444. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-24442007000500004&nrm=iso>.

AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological reviews**, v. 59, n. 1, p. 143-169, 1995. ISSN 0146-0749. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC239358/>>.

ANDERSON, M. R.; KLINK, K.; COHRSEN, A. Evaluation of Vaginal Complaints. **JAMA**, v. 291, n. 11, p. 1368-1379, 2004. ISSN 0098-7484. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1001/jama.291.11.1368>>.

ANDRIOLI, J. L. et al. Frequência de leveduras em fluido vaginal de mulheres com e sem suspeita clínica de candidíase vulvovaginal. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 31, p. 300-304, 2009. ISSN 0100-7203. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-72032009000600006&nrm=iso>.

BARAD, S. et al. Preparation and characterization of ZnO nanoparticles coated by chitosan-linoleic acid; fungal growth and biofilm assay. **Bratislavske lekarske listy**, v. 118, n. 3, p. 169-174, 2017. ISSN 0006-9248. Disponível em: <https://doi.org/10.4149/BLL_2017_034>.

BEIKERT, F. C. et al. Recurrent vulvovaginal candidosis: focus on the vulva. **Mycoses**, v. 54, n. 6, p. e807-e810, 2011. ISSN 0933-7407. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1439-0507.2011.02030.x>>.

BLOSTEIN, F. et al. Recurrent vulvovaginal candidiasis. **Annals of Epidemiology**, v. 27, n. 9, p. 575-582.e3, 2017. ISSN 1047-2797. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1047279717302685>>.

BÖCHER, S. et al. Diagnosis of vaginal discharge. **Ugeskr Laeger**, v. 180, n. 3, p. V03170229, 2018.

BRANDOLT, T. M. et al. Prevalence of *Candida* spp. in cervical-vaginal samples and the in vitro susceptibility of isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 145-150, 2017/01/01/ 2017. ISSN 1517-8382. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1517838216309030>>.

BROTMAN, R. M. et al. Association between the vaginal microbiota, menopause status, and signs of vulvovaginal atrophy. **Menopause (New York, N.Y.)**, v. 21, n. 5, p. 450-458, 2014. ISSN 1530-0374. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC3994184/>>.

CAMILLETTI, A. L. et al. First Steps towards the Pharmaceutical Development of Ovules Containing Lactobacillus Strains: Viability and Antimicrobial Activity as Basic First Parameters in Vaginal Formulations. **AAPS PharmSciTech**, v. 19, n. 2, p. 886-895, 2018. ISSN 1530-9932. Disponível em: <<https://doi.org/10.1208/s12249-017-0895-x>>.

CASTRO, A. et al. Papel de los probióticos en Obstetricia y Gineecología. **Nutrición Hospitalaria**, v. 31(Supl. 1), p 26-30, 2015.

CAVALCANTI, I. M. G. et al. Influence of substratum position and acquired pellicle on *Candida albicans* biofilm. **Brazilian Oral Research**, v. 27, p. 369-375, 2013. ISSN 1806-8324. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-83242013000400369&nrm=iso>.

CLSI. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts: Approved Guideline. Waive, Pensilvânia - USA, 2004.

CROXATTO, A.; PROD'HOM, G.; GREUB, G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 2, p. 380-407, 2012. ISSN 0168-6445. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x>>.

DANIELSSON, D.; TEIGEN, P. K.; MOI, H. The genital econiche: focus on microbiota and bacterial vaginosis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1230, n. 1, p. 48-58, 2011. ISSN 0077-8923. Disponível em: <<https://nyaspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1749-6632.2011.06041.x>>.

DAS, B et al. Understanding the Antifungal Mechanism of Ag@ZnO Core-shell Nanocomposites against *Candida krusei*. **Sci Rep**, v. 6, p. 36403, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/srep36403>>.

DAVAR, R. et al. Comparing the Recurrence of Vulvovaginal Candidiasis in Patients Undergoing Prophylactic Treatment with Probiotic and Placebo During the 6 Months. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 8, n. 3, p. 130-133, 2016. ISSN 1867-1314. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12602-016-9218-x>>.

DAVID, M. Albert und Gustav Döderlein - ein kritischer Blick auf zwei besondere Lebensläufe deutscher Ordinarien. **Zentralbl Gynakol**, v. 128, n. 02, p. 56-59, 2006. ISSN 0044-4197.

DE MAN, J. C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M. E. A MEDIUM FOR THE CULTIVATION OF LACTOBACILLI. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 23, n. 1, p. 130-135, 1960. ISSN 0021-8847. Disponível em:

<<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x>>.

DE SETA, F. et al. Lactobacillus plantarum P17630 for preventing Candida vaginitis recurrence: a retrospective comparative study. **European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology**, v. 182, p. 136-139, 2014. ISSN 0301-2115. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2014.09.018>>.

DIAS, L. B. et al. Vulvovaginal candidiasis in Mato Grosso, Brazil: pregnancy status, causative species and drugs tests. **Brazilian journal of microbiology**, v. 42, n. 4, p. 1300-1307, 2011. ISSN 1517-8382. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC3768752/>>.

FUOCHI, V. et al. Biological properties and production of bacteriocins-like-inhibitory substances by Lactobacillus sp. strains from human vagina. **Journal of Applied Microbiology**, ISSN 1364-5072. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jam.14164>>.

GAJER, P. et al. Temporal dynamics of the human vaginal microbiota. **Science translational medicine**, v. 4, n. 132, p. 132ra52-132ra52, 2012. ISSN 1946-6242. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC3722878/>>.

GHANNOUM, M. A.; RICE, L. B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clinical microbiology reviews**, v. 12, n. 4, p. 501-517, 1999. ISSN 0893-8512. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC88922/>>.

GONÇALVES, B. et al. Vulvovaginal candidiasis: Epidemiology, microbiology and risk factors. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 42, n. 6, p. 905-927, 2016/11/01 2016. ISSN 1040-841X. Disponível em: <<https://doi.org/10.3109/1040841X.2015.1091805>>.

GONG, Z. et al. Lactobacilli Inactivate Chlamydia trachomatis through Lactic Acid but Not H₂O₂. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. e107758, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107758>>.

HATA, M. et al. In Vitro and in Vivo Antifungal Activities of Aminopiperidine Derivatives, Novel Ergosterol Synthesis Inhibitors. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, n. 3, p. 473-476, 2010.

JORGE, A. O. C. Microbiologia e imunologia oral. Rio de Janeiro: Elsevier; 2012. (pp. 384) ISBN: 978-8-352-6524-8.

KANG, C. H. et al. In Vitro Probiotic Properties of Lactobacillus salivarius MG242 Isolated from Human Vagina. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 10, n. 2, p. 343-349, 2018. ISSN 1867-1314. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12602-017-9323-5>>.

KIM, J. M.; PARK, Y. J. Probiotics in the Prevention and Treatment of Postmenopausal Vaginal Infections: Review Article. **J Menopausal Med**, v. 23, n. 3, p. 139-145, 2017.

ISSN 2288-6478. Disponível em: <<https://doi.org/10.6118/jmm.2017.23.3.139>>.

KOVACHEV, S. Defence factors of vaginal lactobacilli. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 31-39, 2018. ISSN 1040-841X. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/1040841X.2017.1306688>>.

KOVACHEV, S. M.; VATCHEVA-DOBREVSKA, R. S. Local Probiotic Therapy for Vaginal *Candida albicans* Infections. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 7, n. 1, p. 38-44, 2015. ISSN 1867-1314. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12602-014-9176-0>>.

KRAUSS, J. et al. Synthesis and Biological Evaluation of Novel N-Alkyl Tetra- and Decahydroisoquinolines: Novel Antifungals that Target Ergosterol Biosynthesis. **Archiv der Pharmazie**, v. 347, n. 4, p. 283-290, 2014. ISSN 0365-6233. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ardp.201300338>>.

LEÃO, M. V. P. et al. *Lactobacillus rhamnosus* pode alterar a virulência de *Candida albicans*. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 37, p. 417-420, 2015. ISSN 0100-7203. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-72032015000900417&nrm=iso>.

LEASE, E. D.; ALEXANDER, B. D. Fungal diagnostics in pneumonia. **Seminars in respiratory and critical care medicine**, v. 32, n. 6, p. 663-672, 2011. ISSN 1098-9048. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC4158698/>>.

LEBEER, S.; VANDERLEYDEN, J.; DE KEERSMAECKER, S. C. J. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 171, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrmicro2297>>.

MARKLEIN, G. et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 9, p. 2912-2917, 2009. ISSN 1098-660X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC2738125/>>.

MARTIN, D. H. et al. The microbiota of the human genitourinary tract: trying to see the forest through the trees. **Transactions of the American Clinical and Climatological Association**, v. 123, p. 242-256, 2012. ISSN 0065-7778. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC3540603/>>.

MATSUBARA VH, WANG Y, BANDARA HM, MAYER MP, SAMARANAYAKE LP. Probiotic lactobacilli inhibit early stages of *Candida albicans* biofilm development by reducing their growth, cell adhesion, and filamentation. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v. 100, n. 14, p. 6415-26, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00253-016-7527-3>>.

MAUBON, D. et al. Resistance of *Candida* spp. to antifungal drugs in the ICU: where are we now? **Intensive Care Medicine**, v. 40, n. 9, p. 1241-1255, 2014. ISSN 1432-1238.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00134-014-3404-7>>.

MIRA, N. P.; TEIXEIRA, M. C.; SÁ-CORREIA, I. Adaptive Response and Tolerance to Weak Acids in *Saccharomyces cerevisiae*: A Genome-Wide View. **OMICS: A Journal of Integrative Biology**, v. 14, n. 5, p. 525-540, 2010. Disponível em: <<https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/omi.2010.0072>>.

MIRMONSEF, P. et al. Free Glycogen in Vaginal Fluids Is Associated with *Lactobacillus* Colonization and Low Vaginal pH. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. e102467, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102467>>.

MITRA, A. et al. The vaginal microbiota, human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia: what do we know and where are we going next? **Microbiome**, v. 4, n. 1, p. 58, 2016. ISSN 2049-2618. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s40168-016-0203-0>>.

MORELLI, L. et al. Utilization of the Intestinal Tract as a Delivery System for Urogenital Probiotics. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 38, p. S107-S110, 2004. ISSN 0192-0790
Disponível em: <https://journals.lww.com/jcge/Fulltext/2004/07002/Utilization_of_the_Intestinal_Tract_as_a_Delivery.15.aspx>.

NAKAMURA-VASCONCELOS, S. S. et al. Emergence of *Candida glabrata* in vulvovaginal candidiasis should be attributed to selective pressure or virulence ability? **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 296, n. 3, p. 519-526, 2017. ISSN 1432-0711. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00404-017-4465-y>>.

NEPPELENBROEK, K. et al. Identification of *Candida* species in the clinical laboratory: a review of conventional, commercial, and molecular techniques. **Oral Diseases**, v. 20, n. 4, p. 329-344, 2014. ISSN 1354-523X. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/odi.12123>>.

O'HANLON, D. E.; MOENCH, T. R.; CONE, R. A. Vaginal pH and Microbicidal Lactic Acid When *Lactobacilli* Dominate the Microbiota. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. e80074, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080074>>.

ODDS, F. C.; BERNAERTS, R. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 8, p. 1923-1929, 1994. ISSN 0095-1137. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC263904/>>.

O'HANLON, D. E.; MOENCH, T. R.; CONE, R. A. In vaginal fluid, bacteria associated with bacterial vaginosis can be suppressed with lactic acid but not hydrogen peroxide. **BMC Infectious Diseases**, v. 11, p. 200-200, 2011. ISSN 1471-2334. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC3161885/>>.

PERLIN, D. S. Current perspectives on echinocandin class drugs. **Future microbiology**, v. 6, n. 4, p. 441-457, 2011. Disponível em: <<https://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/fmb.11.19>>.

PETROVA, M. I. et al. *Lactobacillus* species as biomarkers and agents that can promote

various aspects of vaginal health. **Frontiers in Physiology**, v. 6, n. 81, 2015. ISSN 1664-042X. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2015.00081>>.

RAVEL, J. et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108 Suppl 1, n. Suppl 1, p. 4680-4687, 2011. ISSN 0027-8424. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC3063603/>>.

REID, G. et al. Oral use of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *L. fermentum* RC-14 significantly alters vaginal flora: randomized, placebo-controlled trial in 64 healthy women. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 35, n. 2, p. 131-134, 2003. ISSN 0928-8244. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1016/S0928-8244%2802%2900465-0>>.

REID, G. Has knowledge of the vaginal microbiome altered approaches to health and disease? **F1000Research**, v. 7, n. 460, 2018. Disponível em: <<http://openr.es/bhk>>.

RODRIGUÉZ-CERQUEIRA C. et al. Biofilms and vulvovaginal candidiasis. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 174, p. 110-125, 2019.

SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; LASS-FLÖRL, C. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. **Mycoses**, v. 58, n. S2, p. 2-13, 2015. ISSN 0933-7407. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/myc.12330>>.

SGIBNEV, A. V.; KREMLEVA, E. A. Vaginal Protection by H₂O₂-Producing *Lactobacilli*. **Jundishapur journal of microbiology**, v. 8, n. 10, p. e22913-e22913, 2015. ISSN 2008-4161. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC4644264/>>.

SOBEL, J. D. Vaginitis. **New England Journal of Medicine**, v. 337, n. 26, p. 1896-1903, 1997. Disponível em: <<https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM199712253372607>>.

SOBEL J.D. Recurrent vulvovaginal candidiasis. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 214, n. 1, p. 15-21, 2016. ISSN 0002-9378. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ajog.2015.06.067>>.

SOBEL, J. D.; SOBEL, R. Current treatment options for vulvovaginal candidiasis caused by azole-resistant *Candida* species. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 19, n. 9, p. 971-977, 2018. ISSN 1465-6566. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/14656566.2018.1476490>>.

TACHEDJIAN, G. et al. The role of lactic acid production by probiotic *Lactobacillus* species in vaginal health. **Research in Microbiology**, v. 168, n. 9, p. 782-792, 2017. ISSN 0923-2508. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0923250817300839>>.

VLADAREANU, R. et al. New evidence on oral *L. plantarum* P17630 product in women with history of recurrent vulvovaginal candidiasis (RVVC): a randomized double-blind placebo-controlled study. **European Review for Medical and Pharmacological**

Sciences. V. 22, n. 1, p. 262-267, 2018. Disponível em <https://doi.org/10.26355/eurrev_201801_14128>.

WAGNER, R. D.; JOHNSON, S. J. Probiotic lactobacillus and estrogen effects on vaginal epithelial gene expression responses to *Candida albicans*. **Journal of Biomedical Science**, v. 19, n. 1, p. 58, 2012. ISSN 1423-0127. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1423-0127-19-58>>.

WICKERHAM, L. J. Taxonomy of yeasts. **Technical Bulletin of the U. S. Department of Agriculture**, v. 1029, p. 1-55, 1951.

WILLINGER B, KIENZL D et al. Diagnostics in Fungal Infections. In: Human Fungal Pathogens. Ed.: Kurzai O., 2013.

WILLINGER, B.; HAASE, G. State-of-the-Art Procedures and Quality Management in Diagnostic Medical Mycology. **Current Fungal Infection Reports**, v. 7, n. 3, p. 260-272, 2013. ISSN 1936-377X. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12281-013-0145-y>>.

WINSTANLEY, T.; COURVALIN, P. Expert systems in clinical microbiology. **Clinical microbiology reviews**, v. 24, n. 3, p. 515-556, 2011. ISSN 0893-8512. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC3131062/>>.

WORD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections, including human immunodeficiency virus, 2013.

ZIDA, A. et al. Anti-*Candida albicans* natural products, sources of new antifungal drugs: A review. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 27, n. 1, p. 1-19, 2017. ISSN 1156-5233. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1156523316302220>>.