

Identificación y características de *Candida spp.* en secreción vaginal de pacientes embarazadas y no embarazadas

*Gustavo Aguilar¹, Patricia Araujo¹, Elizabeth Godoy¹, Myrian Falcón², María Gloria Centurión², Rossana Ortiz², Mariel Brites², Mario Martínez²

1. Sección de Micología - Departamento de Bacteriología y Micología. Laboratorio Central de Salud Pública. Asunción - Paraguay
2. Sección de Bacteriología Clínica- Departamento de Bacteriología y Micología. Laboratorio Central de Salud Pública. Asunción - Paraguay

Cómo referenciar este artículo/ How to reference this article:

Aguilar G, Araujo P, Godoy E, Falcón M, Centurión MG, Ortiz R, et al. Identificación y características de *Candida spp.* en secreción vaginal de pacientes embarazadas y no embarazadas que acudieron al Laboratorio Central de Salud Pública, Asunción-Paraguay. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud.* 2017; 15(3): 6-12

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue identificar las especies de *Candida spp.* aisladas de secreción vaginal de pacientes embarazadas y no embarazadas y relacionarlas con la microscopía, síntomas y signos característicos de la vaginitis causada por esta levadura. Se estudiaron 743 muestras de secreción vaginal de pacientes que acudieron al Departamento de Bacteriología y Micología del Laboratorio Central en el 2015. Las muestras fueron sembradas en CHROM agar *Candida* y agar Sabouraud. La identificación se hizo por macro y micromorfología, pruebas bioquímicas, auxonograma y método comercial. En las 522 pacientes embarazadas se aislaron 536 *Candida spp.*: *C. albicans* 463 (86,4%), *C. glabrata* 46 (8,6%), *C. krusei* 9 (1,7%), *C. parapsilosis* 9 (1,7%), *C. tropicalis* 8 (1,5%), *C. lusitaniae* 1 (0,1%). En las 221 pacientes no embarazadas se aislaron 222 *Candida spp.*: *C. albicans* 163 (73,4%), *C. glabrata* 31 (14%), *C. krusei* 10 (4,6%), *C. parapsilosis* 9 (4,1%), *C. tropicalis* 6 (2,7%), *C. guilliermondii* 1 (0,4%), *C. kefyr* 1 (0,4%) y *C. novyensis* 1 (0,4%). Se observó un mayor porcentaje de aislamiento de *Candida* no *albicans* en las no embarazadas (26,6% vs 13,6%). En 15 pacientes (2%) se aislaron dos especies de *Candida*. Tanto en embarazadas como no embarazadas el prurito, la reacción inflamatoria y la presencia de pseudohifas fueron más frecuentes cuando el aislamiento era *C. albicans*. Enfatizamos la importancia de la siembra de las muestras en agar cromogénico para identificar y diferenciar especies de *Candida* para la epidemiología y un tratamiento eficaz de la vaginitis causada por esta levadura.

Palabras clave: embarazada, secreción vaginal, *Candida spp.*, Paraguay

Identification and characteristics of *Candida spp.* in vaginal secretion of pregnant and non-pregnant patients

ABSTRACT

The objective of this study was to identify *Candida spp.* isolated from vaginal secretion of pregnant and non-pregnant women and relate them with microscopy, symptoms and signs characteristic of vaginitis caused by this yeast. A total of 743 vaginal secretion samples was studied from patients consulting at the Department of Bacteriology and Mycology of the Central Laboratory in 2015. All samples were cultured on CHROM agar *Candida* and Sabouraud agar. The identification was made by macro and micromorphology, biochemical tests, auxonogram and commercial method. In pregnant patients (n = 522), 536 *Candida spp.* were isolated: *C. albicans* 463 (86.4%), *C. glabrata* 46 (8.6%), *C. krusei* 9 (1.7%), *C. parapsilosis* 9 (1.7%), *C. tropicalis* 8 (1.5%), *C. lusitaniae* 1 (0.1%). In no-pregnant

Fecha de recepción: mayo 2017. Fecha de aceptación: agosto 2017

*Autor Correspondiente: **Gustavo Aguilar**. Sección de Micología - Departamento de Bacteriología y Micología. Laboratorio Central de Salud Pública. Asunción - Paraguay.

Email: micologicalcsppy@gmail.com

patients (n = 221), 222 *Candida* spp. were isolated: *C. albicans* 163 (73.4%), *C. glabrata* 31 (14%), *C. krusei* 10 (4.6%), *C. parapsilosis* 9 (4.1%), *C. tropicalis* 6 (2.7%), *C. guilliermondii* 1 (0.4%), *C. kefyr* 1 (0.4%) and *C. novyensis* 1 (0.4%). In the non-pregnant women, a higher percentage of non-*albicans* *Candida* species isolation was observed (26.6% vs 13.6%). Fifteen patients (2%) with two *Candida* species were detected. In pregnant as well non pregnant women, presence of pruritus, inflammatory reactions and presence of pseudohifas were more frequent when *Candida albicans* was isolated. We emphasize the importance of culturing samples in chromogenic agar to identify and differentiate *Candida* species for epidemiology and an effective treatment of the vaginitis caused by this yeast.

Keywords: pregnant, vaginal secretion, *Candida* spp., Paraguay.

INTRODUCCIÓN

La candidiasis vulvovaginal es una infección muy común en todos los países afectando alrededor de 50 – 70% de las mujeres (1,2). En Paraguay en un estudio realizado en el hospital San Pablo de Asunción y el hospital regional de la ciudad de San Lorenzo se encontraron una prevalencia del 27,7% en un estudio de infecciones vulvo-cervicales (3). En otro estudio, Laspina et al mencionan un 13% de prevalencia en vulvovaginitis en niñas que consultaron en el Hospital Central del Instituto de Previsión Social de Asunción, siendo más frecuente entre las edades de 6 a 12 años (4).

Los factores de riesgo como embarazo, uso inadecuado de antibióticos, diabetes, empleo de dispositivos intrauterinos (DIU), procedimientos ginecológicos aumentan la frecuencia de candidiasis vulvovaginal. *Candida albicans* es la principal causa (5-8).

Debido al aumento de vaginitis por especies de *Candida* no *albicans* (9-10), además de lo inespecíficos que pueden ser muchas veces los síntomas y como generalmente estas especies son más resistentes a los antifúngicos empíricos dando lugar a recurrencias frecuentes (11). Por todo esto y ante una sospecha de infección se impone el estudio de la secreción vaginal y determinación de las especies implicadas.

El objetivo del trabajo fue identificar las *Candida* spp. aisladas de la secreción vaginal y relacionarlas con la presencia ó no de prurito, el tipo de flujo y el examen en fresco en pacientes embarazadas y no embarazadas que acudieron en el 2015 al Laboratorio Central de Salud Pública, Asunción- Paraguay. Esto ayudaría conocer la epidemiología de las especies implicadas y un tratamiento más adecuado.

MATERIALES y MÉTODOS

Para el estudio se consideraron los siguientes puntos en los formularios de las muestras de secreción vaginal: edad, embarazo, mes de gestación, enfermedad de base, procedimientos quirúrgicos, tratamientos con antibióticos, presencia de prurito vaginal, color, aspecto y cantidad del flujo, examen en fresco y especie aislada.

Se estudiaron las muestras de secreción vaginal de 743 pacientes, en el período de enero a diciembre del 2015, 522 embarazadas (14 a 51 años) y 221 no embarazadas (9 a 64 años) en las que se aislaron *Candida* spp. Las mujeres eran procedentes de gran Asunción y ciudades cercanas. Las muestras fueron tomadas y procesadas en el Departamento de Bacteriología y Micología del Laboratorio Central del Ministerio de Salud, Asunción.

Se utilizó un hisopo de algodón para tomar la muestra de la parte interna de la pared vaginal introduciendo previamente un espéculo estéril sin lubricar. Luego el hisopo se colocó en un tubo de ensayo con 1 ml de solución salina estéril. Posteriormente se observó en el microscopio con aumento de 40x. Anotando el recuento de leucocitos, presencia de blastoconidios, pseudohifas y células epiteliales. El cultivo se realizó en placas de agar Sabouraud Dextrosa (Britania) y agar cromogénico CHROM agar *Candida* (Oxoid) con una incubación de 72 hs a 35°C. Todos los aislamientos de levaduras compatibles con *Candida* spp. fueron conservados en 1 mL de caldo infusión cerebro corazón (BHI) y glicerol al 10%.

Identificación de especie de levaduras

A partir de las colonias de agar Sabouraud de 24 hs se realizó prueba de tubo germinativo. En el CHROM agar *Candida* se observó el color de las colonias a las 72 hs para identificar la especie: Verde: *C. albicans*, Azul: *C. tropicalis*, Rosa pálido seco: *C. krusei*. En caso de otro color se volvió a aislar en agar Sabouraud y a las 24 hs se realizaron microcultivos, prueba de urea, caldo malta, crecimiento a 30°C, 37°C, 42°C y auxonograma

(12). En los casos de un resultado indeterminado con las pruebas anteriores, se realizó la identificación definitiva con el método API-20C AUX (bioMeurieux, Francia), siguiendo las especificaciones del fabricante.

RESULTADOS

De las 758 especies de *Candida* spp. Aisladas, la prevalencia de las principales especies fueron: *C. albicans* 626 (82,6%), *C. glabrata* 77 (10,2%), *C. krusei* 19 (2,5%), *C. parapsilosis* 18 (2,4%) y *C. tropicalis* 14 (1,8%). Se observaron porcentajes de aislamientos mayores, con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), para el grupo de no embarazadas ($n = 222$) en relación a las embarazadas ($n = 536$) para *C. glabrata*: 14,1% vs. 8,5%, *C. krusei*: 4,5% vs. 1,6%, *C. parapsilosis*: 4,1% vs. 1,6% y *C. tropicalis*: 2,7% vs. 1,4%, respectivamente. Aunque *C. albicans* fue aislada con mayor frecuencia en embarazadas 86,3% vs. 74,4% la diferencia no fue significativa ($p = 0,07$). Tabla 1

Tabla 1. Distribución de aislamientos de *Candida* spp. En muestras de secreción vaginal en pacientes embarazadas y no embarazadas

Especies de <i>Candida</i>	Embarazadas	No embarazadas	Total
<i>C. albicans</i>	463 (86,4)	163 (73,4)	626 (82,6)
<i>C. glabrata</i>	46 (8,5)	31 (14)	77 (10,2)
<i>C. krusei</i>	9 (1,7)	10 (4,5)	19 (2,5)
<i>C. parapsilosis</i>	9 (1,7)	9 (4,1)	18 (2,4)
<i>C. tropicalis</i>	8 (1,5)	6 (2,6)	14 (1,8)
<i>C. lusitaniae</i>	1 (0,2)	3 (1,4)	4 (0,5)
Total	536	222	758

En la Tabla 2 se presenta la distribución según mes de gestación de las especies de *Candida* spp. aisladas de muestras de secreción vaginal en pacientes embarazadas. *C. albicans* (>85%) fue la especie más frecuente en todos los meses de gestación seguida de *C. glabrata*.

Tabla 2. Distribución según mes de gestación de especies de *Candida* spp. en muestras de secreción vaginal en pacientes embarazadas

Mes de gestación	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. lusitaniae</i>
1-3 (n=163)	140 (85,9)	15 (9,2)	5 (3,1)	1 (0,6)	1 (0,6)	1 (0,6)
4-6 (n=203)	175 (86,2)	18 (8,9)	2 (1)	5 (2,4)	3 (1,5)	-
7-9 (n=170)	148 (87)	13 (7,6)	2 (1,2)	3 (1,8)	4 (2,4)	-

En la Tabla 3 se presenta la distribución según grupo de edad de las especies de *Candida* spp. aisladas de muestras de secreción vaginal en pacientes no embarazadas. *C. albicans* fue la especie más frecuente, en todos los grupos de edad seguida de *C. glabrata*; en el grupo 45-64 años la distribución fue similar a *C. glabrata*.

Tabla 3. Distribución por grupo de edad de especies de *Candida* spp. en muestras de secreción vaginal en pacientes no embarazadas

Grupo de edad (años)	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>Candida</i> spp.
9-15 (n=12)	9 (75)	3 (25)	-	-	-	-
16-44 (n=190)	145 (76,3)	20 (10,6)	10 (5,3)	7 (3,6)	6(3,2)	2 (1)*
45-64 (n=20)	9 (45)	8 (40)	-	2 (10)	-	1 (5)**

C. guilliermondii* (22 años) y *C. kefyr* (39 años) *C. novyensis* (48 años)

Las *Candida* spp. y sus características en relación al tipo de flujo, presencia ó no de prurito, el rango de leucocitos y presencia de pseudohifas en la secreción vaginal en embarazadas y no embarazadas se observan en las Tablas 4 y 5. En embarazadas y no embarazadas el prurito, la reacción inflamatoria y la presencia de pseudohifas se observaron más frecuentemente cuando el aislamiento era *C. albicans* ($p < 0,05$). Tabla 4.

Tabla 4. Características de pacientes embarazadas con aislamientos de *Candida* spp. en secreción vaginal*

Total (n=535)	<i>C. albicans</i>		<i>C. glabrata</i> (n=46)	<i>C. krusei</i> (n=9)	<i>C. parapsilosis</i> (n=9)	<i>C. tropicalis</i> (n=8)
	Asintomática	Sintomática				
Prurito	134 (29%)	329 (71%)	25%	100%	100%	100%
Flujo**	Blanco escaso	Blanco grumoso abundante	Blanco escaso	Blanco moderado	Blanco grumoso moderado	Blanco moderado
Leucocitos en examen fresco	1 - 10/c	10 - 20/c >30/c (70%)	1 -10/c (45%) 11- 20/c>30/c (29%)	10 - 20/c	1 - 10/c	1 - 10/c
***	Blastoconidias	Psed (65%) Blastoconidias	Blastoconidias	Psed (22%) Blastoconidias	Psed (11%) Blastoconidias	Blastoconidias

*Las características no dependieron de los trimestres de embarazo

**Color y cantidad observada

***Morfología de levaduras en examen en fresco

Psed: Pseudohifas

En pacientes con edades de 15 a 45 años embarazadas o no, con aislamientos de *C. albicans* y *C. glabrata* se observaron formas asintomáticas (ausencia de prurito, flujo escaso y solo blastoconidias en el examen en fresco) en ambos grupos de pacientes. Tabla 5. Aunque el número de pacientes con *C. tropicalis* fue bajo se observó que en el grupo de no embarazadas (n=6), el prurito estaba presente solo en el 16,7% de los casos comparada con las embarazadas (n=8) en que en todas se presenta.

Tabla 5. Características de pacientes no embarazadas con aislamientos de *Candida* spp. en secreción vaginal

Total = 119	<i>C. albicans</i> (n=163)		<i>C. glabrata</i> (n=31)	<i>C. krusei</i> (n=10)	<i>C. parapsilosis</i> ² (n=9)	<i>C. tropicalis</i> ² (n=6)
	Asintomática ²	Sintomática				
Prurito	14 (8,5%)	149 (91,6%)	25% ²	100%	100%	16,7%
Flujo*	Blanco escaso	Blanco grumoso abundante	Blanco escaso	Blanco moderado	Blanco moderado	Blanco moderado
Leucocitos en ex. fresco	1 - 10/c	5 - 10/c ^{1,2} 11 - 20/c ^{2,3} >30/c	1- 10/c ^{1,2,3} 11-20/c ²	1 - 10/c	1 - 10/c	1 -10/c
**	Blastoconidias	Psed (50%) ^{1,3} (35%) ² Blastoconidias	Blastoconidias	Psed (30%) Blastoconidias	Psed (30%) Blastoconidias	Blastoconi dias

*Color y cantidad observada

**Morfología de levaduras en examen en fresco.

1: <15 años, 2: 15 a 45 años, 3: >45 años

Psed: Pseudohifas.

En no embarazadas con aislamiento de especies de *Candida no albicans* más del 50% tenían antecedentes de tratamiento previo con antifúngicos y cirugías ginecológicas.

Se aislaron dos especies de *Candida* en quince pacientes. El aislamiento de *C. albicans* con cualquier otra especie de la Tabla 6, se presentó en los pacientes con prurito, flujo blanco grumoso y leucocitos mayores a 30/c. Para los dos pacientes con *C. parapsilosis/C. krusei* se observó también prurito con flujo blanco moderado y leucocitos entre 1 -10 /c.

Además se identificaron especies inusuales en la secreción vaginal en cuatro pacientes: en una persona embarazada se aisló *C. lusitaniae* con picazón, flujo moderado blanco y leucocitos 10 -20/c. En tres personas no embarazadas se aislaron: *C. guilliermondii*, *C. kefir* y *C. novergensis*. Estas pacientes presentaron prurito leve, flujo blanco moderado y leucocitos de 1 a 10/c.

Tabla 6. Aislamiento mixto de especies de *Candida* en secreción vaginal

Aislamiento mixto	Nº de pacientes
Embarazadas	
<i>C. albicans</i> / <i>C. glabrata</i>	6
<i>C. albicans</i> / <i>C. tropicalis</i>	2
<i>C. albicans</i> / <i>C. parapsilosis</i>	2
<i>C. albicans</i> / <i>C. krusei</i>	2
<i>C. parapsilosis</i> / <i>C. krusei</i>	2
No embarazada	
<i>C. albicans</i> / <i>C. glabrata</i>	1

DISCUSIÓN

Como informan varias publicaciones sobre secreción vaginal la prevalencia de *C. albicans* es del 80 a 90% (5,11,13-15) mientras que para las otras especies alcanza hasta el 20% de los casos (16). En nuestro estudio encontramos un 82,6% de *C. albicans* en los aislamientos y con mayor porcentaje en embarazadas.

Se enfatiza la importancia de la identificación de los aislamientos a nivel de especie y su relación con signos, síntomas y la microscopia del examen en fresco de la vaginitis por *Candida*. *C. albicans* ha sido relacionado a más cuadros sintomáticos que las especies no *albicans* sin embargo estas últimas son más resistentes y requieren mayores concentraciones de los antifúngicos para que el tratamiento sea eficaz (17, 18). En este trabajo la prevalencia de las especies no *albicans* fue del 17,4%.

Las formas filamentosas (hifas y pseudohifas) de las especies de *Candida* se asocian con la enfermedad activa (19). Las pseudohifas penetran en las células epiteliales vaginales y se adhieren más a las células que las formas levaduriformes (blastoconidias)(20). En este estudio encontramos presencia de pseudohifas en el examen en fresco en ambos grupos de pacientes con síntomas. Para *C. albicans* en mayor porcentaje en embarazadas 65% en contraste a 35 a 50% en pacientes no embarazadas en edad reproductiva ($p < 0,05$).

C. albicans y otras especies de *Candida* pueden formar parte de la microbiota vaginal de las mujeres asintomáticas. En un estudio realizado con mujeres elegidas al azar se encontró que el 30% de las mismas se encontraban colonizadas por *Candida* (21). En nuestro trabajo para los pacientes asintomáticos con aislamientos de *C. albicans* encontramos en un porcentaje similar al anterior en embarazadas y un 8,5% en no embarazadas.

C. glabrata se aísla en el 10% de los casos de infecciones fúngicas vaginales (16,22). Esta se presenta con menos inflamación que otras especies de *Candida* como lo reporta Geirger *et al* (23). Aunque puede ser más difícil de eliminar con los tratamientos convencionales (22). En nuestro estudio en las pacientes con aislamiento de *C. glabrata* observamos falta de prurito en un 75% de los casos tanto en embarazadas como en las no embarazadas, esto coincide con el reporte de Geirger *et al*(23).

C. tropicalis se aísla en alrededor de un 1 a 5% de los casos de vaginitis por *Candida* y puede asociarse con una mayor tasa de recurrencias tras el tratamiento convencional (24). En este trabajo también obtuvimos aislados en el rango de porcentajes reportado anteriormente (1,8 %) con la peculiaridad de la ausencia de prurito en gran parte de las pacientes no embarazadas.

Existe la posibilidad de recidivas en la vaginitis por especies de *Candida* no *albicans* como *C. glabrata* y *C. krusei* que son resistentes a varios antifúngicos de uso común, como se demuestran en varios estudios. Estas especies colonizan la mucosa vaginal después de un tratamiento prolongado con antifúngicos azólicos a especies sensibles (2,5,10,25).

En este estudio observamos quince pacientes con colonias mixtas de *Candida* utilizando el CHROM agar *Candida*. El cultivo en agar cromogénico tiene la ventaja que además de ser un método rápido y simple que identifica las tres especies más comunes (*C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei*) permite diferenciar morfologías que luego pueden ser identificadas con los métodos tradicionales. Además, generalmente en estudios de factores de virulencia y pruebas de sensibilidad a antifúngicos a partir de muestras clínicas, se parte de varias colonias de una placa de agar Sabouraud, el medio más utilizado para aislamiento de levaduras, donde no se diferencian morfologías que están relacionadas a especies. Consideramos fundamental el uso de agar cromogénico para detectar colonias mixtas que tendrían relación con las recidivas en vulvovaginitis por *Candida* (11, 26, 27).

El diagnóstico de laboratorio en candidiasis vaginal es esencial para el tratamiento de la enfermedad ya que este se basa en el número y tipo de *Candida*. Los resultados obtenidos en este trabajo apuntan a la necesidad de continuar los estudios de vigilancia de las especies implicadas en la vaginitis por *Candida* y a un conocimiento más profundo de la epidemiología de las infecciones vaginales causadas por hongos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado con el apoyo financiero del Fondo para la Convergencia Estructural del Mercosur FOCESM.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Esmailzadeh S, Omran SM, Rahmani Z. Frequency and etiology of vulvovaginal candidiasis in women referred to a gynecological center in Babol. Iran. Int J Fertil Steril 2009; 3:74-7.
2. Nabhan A. Vulvovaginal candidiasis. Ain Shams J Obstet Gynecol 2006; 3:73-8.
3. Duarte C, Soilán AM. Detección de Chlamydia trachomatis, esporos micóticos y Trichomonas vaginalis en mujeres en edad fértil que acuden a los Hospitales San Pablo y Regional de San Lorenzo. 2011.
4. Laspina F, Samudio M, Céspedes AM, González GM, Balmaceda MA. Agentes etiológicos de vulvovaginitis en niñas. Mem Inst Investig Cienc Salud 2005; 3(1).
5. Sobel JD, Faro S, Force RW, Foxman B, Ledger WJ, Nyirjesy PR et al. Vulvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic and therapeutic considerations. Am J Obstet Gynecol 1998; 178: 203-11.
6. Foxman B, Barlow R, D'Arcy H, Gillespie B, Sobel JD. Candida vaginitis: self-reported incidence and associated costs. Sex Transm Dis. 2000; 27(4): 230-5.
7. Linhares LM, Witkin SS, Miranda SD, et al. Differentiation between women with vulvovaginal symptoms who are positive or negative for *Candida* species by culture. Infect Dis Obstet Gynecol 2001; 9(4): 221-5.
8. Sebitloane MH. HIV and gynecological infections. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 2005; 19(2):231-41.
9. Ringdahl EN. Recurrent vulvovaginal candidiasis. Mo Med 2006; 103: 165-8.
10. Sobel JD. Management of recurrent vulvovaginal candidiasis: unresolved issues. Curr Infect Dis Rep 2006; 8: 481-6.
11. Holanda AAR, Fernandes ACS, Bezerra CM, Ferreira MAF, Holanda MRR, Holanda JCP. Candidíase vulvovaginal: sintomatologia, fatores de risco e colonização anal concomitante. Rev Bras Ginecol Obstet 2007; 29: 3-9.
12. Sanabria R, Samudio M, Fariña N, Laspina F, Figueredo L de, Aguilar G. Perfil de susceptibilidad a anti fúngicos de aislados de *Candida* spp por el método de microdilución. Nuevos puntos de cortes para fluconazol. Mem Inst Investig Cienc Salud 2014; 12(1): 33-40.
13. Lopes Consolaro ME, Aline Albertoni T, Shizue Yoshida C, Mazucheli J, Peralta RM, Estivalet Svidzinski TI. Correlation of *Candida* species and symptoms among patients with vulvovaginal candidiasis in Maringá, Paraná, Brazil. Rev Iberoam Micol. 2004 Dec;21(4):202-5.
14. Novikova N, Rodrigues A, Mardh PA. Can the diagnosis of recurrent vulvovaginal candidosis be improved by use of vaginal lavage samples and cultures on chromogenic agar? Infect Dis Obstet Gynecol 2002; 10 (2): 89-92.
15. Corsello S, Spinillo A, Osnengo G, Penna C, Guaschino S, Beltrame A, et al. An epidemiological survey of vulvovaginal candidiasis in Italy. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2003 Sep 10;110(1):66-72.
16. Vermitsky JP, Self MJ, Chadwick SG, Trama JP, Adelson ME, Mordechai E, 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 Apr;46(4):1501-3.
17. Ferrazza MSH, Maluf MLF, 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 Ginecol Obstet 2005; 27: 58-63.
18. Andrioli JL, Oliveira GSA, Barreto CS, Sousa ZL, Oliveira MCH, Cazorla IM. Frequência de leveduras em fluido vaginal de mulheres com e sem suspeita clínica de candidíase vulvovaginal. Rev Bras Ginecol Obstet 2009; 31: 700-4.
19. Garcia-Tamayo J, Castillo G, Martínez AJ. Human genital candidiasis: Histochemistry, scanning and transmission electron microscopy. Acta Cytol 1982; 26: 7-14.
20. Kimura LH, Pearsall NN. Relationship between germination of *Candida albicans* and increased adherence to human buccal epithelial cells. Infect Immun 1980;28: 464-8.
21. McCormack WM, Starko KM, Zinner SH. Symptoms associated with vaginal colonization with yeast. Am J Obstet Gynecol 1988; 158: 31-3.
22. Spinillo A, Capuzzo E, Gulminetti R, et al. Prevalence of and risk factors for fungal vaginitis caused by non-albicans species. Am J Obstet Gynecol 1997;176: 138-41.
23. Geiger AM, Foxman B, Sobel JD. Chronic vulvovaginal candidiasis: Characteristics of women with *Candida albicans*, *C. glabrata* and no *Candida*. Genitourin Med 1995;75: 304-7.

24. Horowitz BJ, Edelstein SW, Lippman L. *Candida tropicalis* vulvovaginitis. *ObstetGynecol* 1985; 66: 229-32.
25. Achkar JM, Fries BC. *Candida* infections of the genitourinary tract. *Clin Microbiol Rev* 2010; 23: 253-73.
26. Ringdahl EN. Recurrent vulvovaginal candidiasis. *Mo Med* 2006; 103: 165-8.
27. Boatto HF, Moraes MS, Machado AP, Girão MJBC, Fischman O. Correlação entre os resultados laboratoriais e os sinais e sintomas clínicos das pacientes com candidíase vulvovaginal e relevância dos parceiros sexuais na manutenção da infecção em São Paulo, Brasil. *Rev Brasil Ginec Obst* 2006; 29: 80-4.