



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ: ΙΑΤΡΙΚΑ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ:

ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΚΑΝΤΙΝΤΙΑΣΙΚΗΣ ΚΟΛΠΙΤΙΔΑΣ

Βασιλική Κρουστάλη (19678134)

Εσμεράντα Ρεσούλαϊ (19678264)

Επιβλέπουσα: Μαρία Σιώπη, Ph.D., Ακαδημαϊκή Υπότροφος

Αθήνα, 2023



UNIVERSITY OF WEST ATTICA
FACULTY OF HEALTH AND CARE SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES
DIVISION: MEDICAL LABORATORIES

GRADUATE THESIS:

EPIDEMIOLOGICAL INVESTIGATION OF VULVOVAGINAL CANDIDIASIS

Vasiliki Kroustali (19678134)

Esmeralda Resoulai (19678264)

Supervisor: Maria Siopi, Ph.D., Academic Scholar

Athens, 2023

Μέλη Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής

Μαρία Σιώπη

Απόστολος Μπελούκας

Χρυσάνθη Βογιατζάκη

Δήλωση συγγραφέων πτυχιακής διπλωματικής εργασίας

Οι κάτωθι υπογεγραμμένες Κρουστάλη Βασιλική του Ανδρέα, με αριθμό μητρώου 19678134 και Ρεσούλαϊ Εσμεράλτα του Κέντρο, με αριθμό μητρώου 19678264, φοιτήτριες του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνουμε ότι:

«Είμαστε συγγραφείς αυτής της πτυχιακής/διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχαμε για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες κάναμε χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνουμε ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από εμάς αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μας, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μας ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μας».

Υπογραφή

Ευχαριστίες

Η παρούσα ερευνητική πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας του Π.Γ.Ν. «Αττικόν» σε συνεργασία με το Ιδιωτικό Διαγνωστικό Εργαστήριο Ειδικών Λοιμώξεων, Μυκητιάσεων και Μικροβιολογικών Εξετάσεων «Mycolab».

Αρχικά, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε θερμά τη Δρ. Μαρία Σιώπη, επιβλέπουσα της παρούσας εργασίας, για την αμέριστη εμπιστοσύνη που μας έδειξε από την αρχή, θέτοντας μας σε θέσεις υψηλής ευθύνης, έως και την τελευταία στιγμή της συνεργασίας αυτής. Η στήριξη, η κατανόηση και η καθοδήγησή της το διάστημα αυτό καθώς και οι γνώσεις και οι εμπειρίες που λάβαμε από την ίδια μας έκαναν να αγαπήσουμε βαθιά το αντικείμενο με το οποίο ασχοληθήκαμε.

Επιπλέον, οφείλουμε ένα τεράστιο ευχαριστώ στη Δρ. Σταυρούλα Ε. Αντωνοπούλου (Ιατρός Βιοπαθολόγος - Κλινικός Μικροβιολόγος, Διδάκτωρ Ιατρικής Μυκητολογίας Ε.Κ.Π.Α., Διευθύντρια Ε.Σ.Υ. Μικροβιολογικού Τμήματος Νοσ. «Γ. Γεννηματάς» Αθηνών), επιστημονική υπεύθυνη της παρούσας διπλωματικής, για την άψογη συνεργασία μας, τη διαρκή υποστήριξη και τη βοήθεια της, χωρίς την οποία η ολοκλήρωση αυτής της εργασίας θα ήταν αδύνατη.

Ένα ακόμα μεγάλο ευχαριστώ οφείλουμε στον Καθηγητή Μικροβιολογίας κ. Σπύρο Α. Πουρνάρα (Διευθυντής Εργαστηρίου Κλινικής Μικροβιολογίας, Π.Γ.Ν. «Αττικόν», Ιατρική Σχολή, Ε.Κ.Π.Α.) καθώς και στον Αναπληρωτή Καθηγητή Μικροβιολογίας κ. Ιωσήφ Μελετιάδη (Υπεύθυνος Τμήματος Μυκητολογίας, Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας, Π.Γ.Ν. «Αττικόν», Ιατρική Σχολή, Ε.Κ.Π.Α.) που μας έδωσαν τη δυνατότητα να διεξάγουμε την έρευνα αυτή στο εν λόγω μέρος, αλλά και σε όλα τα μέλη του Εργαστηρίου για το όμορφο κλίμα και την πολύ καλή συνεργασία μας όλο αυτό το διάστημα.

Επίσης, θέλουμε να ευχαριστήσουμε βαθιά τις οικογένειες και τους φίλους μας για την πίστη τους σε εμάς σε όλο αυτό το ταξίδι.

Τέλος, ένα τεράστιο ευχαριστώ οφείλουμε η μία στην άλλη για την άψογη συνεργασία μας, την υπομονή και το κουράγιο που προσφέραμε καθημερινά ανιδιοτελώς μεταξύ μας. Χωρίς εσένα, το αποτέλεσμα σίγουρα δε θα ήταν το ίδιο.

Πίνακας Περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	VI
ABSTRACT.....	VIII
Συνοτομογραφίες.....	X
1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	1
1.1 Εισαγωγή.....	1
1.2 Παγκόσμια επιδημιολογία της VVC.....	2
1.2.1. Επιπολασμός.....	2
1.2.2 Αιτιολογικοί παράγοντες.....	5
1.3 Παράγοντες λοιμογονικότητας των <i>Candida spp.</i>	9
1.4 Ανοσοπαθολογική προσέγγιση της VVC.....	16
1.5 Ο ξενιστής.....	19
1.5.1 Προδιαθεσικοί παράγοντες για εμφάνιση VVC.....	19
1.5.2 Ιδιοπαθής VVC.....	32
1.6 Συμπτωματολογία της VVC.....	33
1.7 Εργαστηριακή διάγνωση της VVC.....	35
1.8 Θεραπεία της VVC.....	42
1.8.1 Κατηγορίες και μηχανισμός δράσης των αντιμυκητικών παραγόντων.....	42
1.8.2 Θεραπευτική προσέγγιση της νόσου.....	46
1.8.3 Ο ρόλος των προβιοτικών στην πρόληψη και την αντιμετώπιση της νόσου.....	54
1.8.4 Νέοι αντιμυκητικοί παράγοντες και ανοσοθεραπεία για την αντιμετώπιση της VVC.....	56
1.9 Προοπτικές για μελλοντική έρευνα.....	57
2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	59
2.1 Σκοπός.....	59
2.2 Υλικά και Μέθοδοι.....	59
2.2.1 Ανασκόπηση της βιβλιογραφίας.....	59
2.2.2 Ασθενείς και ορισμοί.....	60
2.2.3 Κλινικά στελέχη.....	60
2.2.4 Ταυτοποίηση στελεχών <i>Candida spp.</i> με MALDI-ToF MS.....	61
2.2.5 Έλεγχος <i>in vitro</i> ευαισθησίας αντιμυκητικών παραγόντων έναντι <i>Candida spp.</i>	64

2.2.6 Ανάλυση δεδομένων	81
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	84
3.1 Βιβλιογραφική ανασκόπηση της επιδημιολογίας της VVC στην Ελλάδα.....	84
3.2 Δημογραφικά στοιχεία των ασθενών της παρούσας μελέτης, προδιαθεσικοί παράγοντες και συχνότητα εμφάνισης της λοίμωξης	88
3.3 Κατανομή των <i>Candida</i> spp.....	90
3.4 Προφίλ της <i>in vitro</i> ευαισθησίας των <i>Candida</i> spp. στα αντιμυκητικά.....	93
3.5 Προσδιορισμός τιμών EUCAST ECOFF αντιμυκητικών παραγόντων για <i>Candida</i> spp..	99
3.6 Επίδραση του pH στον έλεγχο της <i>in vitro</i> δραστηριότητας των αζολών έναντι <i>Candida</i> spp. χρησιμοποιώντας τη μεθοδολογία αναφοράς κατά EUCAST	104
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	108
Συμμετοχή σε δράσεις διάχυσης της μελέτης.....	121
Βιβλιογραφία	122
Παραρτήματα	153
Κατάλογος εικόνων	153
Κατάλογος πινάκων.....	156

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Επί του παρόντος, η επιδημιολογική εικόνα της καντιντιασικής αιδοιοκολπίτιδας (VVC) παγκοσμίως παραμένει ασαφής. Συγχρόνως, εξακολουθούν να υπάρχουν κενά αναφορικά με τον προσδιορισμό της *in vitro* ευαισθησίας των υπεύθυνων παθογόνων στα αντιμυκητικά, όπως η έλλειψη ορίων ευαισθησίας και η επίδραση συνθηκών που προσομοιώνουν το γυναικείο κόλπο, η κάλυψη των οποίων κρίνεται αναγκαία. Σκοπό, λοιπόν, της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτέλεσε αφενός η περιγραφή της σύγχρονης επιδημιολογίας της VVC στη χώρα μας και αφετέρου η διερεύνηση παραμέτρων για τη βελτιστοποίηση του ελέγχου της *in vitro* δραστηριότητας αντιμυκητικών παραγόντων έναντι *Candida* spp., ευρήματα που το καθένα από την πλευρά του θα συμβάλει στην καλύτερη θεραπευτική προσέγγιση των ασθενών.

Κολπικά επιχρίσματα ενηλίκων γυναικών με κλινική συμπτωματολογία ύποπτη για VVC, συλλέχθηκαν στο ιδιωτικό διαγνωστικό εργαστήριο «Mycolab» (Αθήνα, Ελλάδα) μεταξύ Οκτωβρίου 2019 και Νοεμβρίου 2021. Η VVC επιβεβαιώθηκε με μικροσκοπική ανίχνευση δομών ζυμομύκητα στις κολπικές εκκρίσεις και με θετικές για *Candida* spp. καλλιέργειες. Η υποτροπιάζουσα VVC (RVVC) ορίστηκε σε περιπτώσεις που η ασθενής ανέπτυξε ≥ 3 συμπτωματικά οξέα επεισόδια της νόσου σε διάστημα ενός έτους. Η ταυτοποίηση των στελεχών που απομονώθηκαν πραγματοποιήθηκε με MALDI-ToF MS. Ο έλεγχος της *in vitro* ευαισθησίας τους στα αντιμυκητικά (φλουконаζόλη, ιτρακοναζόλη, κλοτριμαζόλη, κετοκοναζόλη, μικοναζόλη, εκοναζόλη, φεντικοναζόλη και βορικό οξύ) διενεργήθηκε με την πρότυπη μεθοδολογία κατά EUCAST (E.DEF 7.3.2) και προσδιορίστηκαν επιδημιολογικά όρια ευαισθησίας για όσους συνδυασμούς *Candida* spp.-αντιμυκητικού δεν είναι διαθέσιμα. Επιπλέον, διερευνήθηκε η επίδραση της τιμής pH 4,5, το οποίο μιμείται το περιβάλλον του κόλπου, στην *in vitro* δραστηριότητα της φλουконаζόλης και της ιτρακοναζόλης, που αποτελούν θεραπεία πρώτης και δεύτερης γραμμής της VVC.

Η VVC αποτελεί συχνή λοίμωξη στη χώρα μας (18%, 5% RVVC), με την *C. albicans* να εμφανίζει την ίδια συχνότητα απομόνωσης με τα non-*albicans Candida* spp. (50% έκαστος). Αντοχή στη φλουконаζόλη παρατηρήθηκε στις *C. albicans* (4%) και *C. glabrata* (39%), το 19% των στελεχών *C. glabrata* είχαν φαινότυπο μη άγριου τύπου στην ιτρακοναζόλη και μερίδα στελεχών παρουσίασε διασταυρούμενη αντοχή στα επιμέρους αζολικά αντιμυκητικά.

Παράλληλα, παρατηρήθηκε επίπτωση του pH στις τιμές MIC της φλουκοναζόλης για τις *C. parapsilosis* και *C. glabrata* και της ιτρακοναζόλης για όλα τα *Candida* spp.

Η συνεχής επιτήρηση της τοπικής επιδημιολογίας της VVC σχετικά με τις αλλαγές στην κατανομή των ειδών και την ευαισθησία στα αντιμυκητικά είναι απαραίτητη για την καθοδήγηση της θεραπείας. Η κλινική συνάφεια των αυξημένων MICs που λαμβάνονται σε συνθήκες που προσομοιώνουν το πραγματικό περιβάλλον του κόλπου πρέπει να συσχετιστεί μελλοντικά με το αποτέλεσμα της θεραπείας.

Λέξεις κλειδιά: καντιντιασική αιδοιοκολπίτιδα, επιδημιολογία, Ελλάδα, επιδημιολογικά όρια ευαισθησίας, pH 4,5

ABSTRACT

To date, the epidemiological landscape of vulvovaginal candidiasis (VVC) remains unclear worldwide. Meanwhile, there are still gaps in terms of determining the *in vitro* antifungal susceptibility of the responsible pathogens, such as the lack of breakpoints and the impact of conditions simulating the vagina, whose filling is considered crucial. Therefore, the purpose of this thesis is, on the one hand, to describe the contemporary epidemiology of VVC in our country and, on the other hand, to investigate parameters for optimizing the evaluation of the *in vitro* antifungal activity against *Candida* spp., findings that will contribute to a better therapeutic approach of patients.

Vaginal swab specimens from adult women with clinical symptoms suggestive of VVC were collected at the private diagnostic laboratory "MycoLab" (Athens, Greece) between October 2019 and November 2021. VVC was confirmed by microscopic detection of yeast structures in vaginal secretions and positive cultures for *Candida* spp. Recurrent VVC (RVVC) was defined in cases where the patient developed ≥ 3 symptomatic acute episodes within one year. Species were identified by MALDI-ToF MS. The *in vitro* susceptibility profile to antifungals (fluconazole, itraconazole, clotrimazole, ketoconazole, miconazole, econazole, fenticonazole and boric acid) was determined following the reference EUCAST methodology (E.DEF7.3.2) and epidemiological cut-off values were defined for *Candida* spp.-antifungal combinations that are not currently available. In addition, the effect of low-pH 4,5, which mimics the vaginal environment, on the *in vitro* activity of fluconazole and itraconazole that are recommended as first- and second-line therapeutic regimens for VVC was investigated.

VVC is a common infection in our country (18%, 5% RVVC), with *C. albicans* being equally distributed with non-*albicans Candida* spp. (50% each). Resistance to fluconazole was observed in *C. albicans* (4%) and *C. glabrata* (39%), 19% of *C. glabrata* isolates exhibited a non-wild type phenotype to itraconazole, and some strains were cross-resistant to azole antifungals. Additionally, the pH had an impact on the fluconazole MIC values of *C. parapsilosis* and *C. glabrata* and on itraconazole MICs of all *Candida* spp.

Continuous local epidemiological monitoring of VVC regarding changes in species distribution and antifungal susceptibility is essential for guiding therapy. The clinical relevance of elevated

MICs observed in the simulated vaginal environment should be correlated with treatment outcomes.

Key words: vulvovaginal candidiasis, epidemiology, Greece, epidemiological cut-off values, pH 4,5

Συντομογραφίες

BDG	(1, 3)-β-D-glucan	(1, 3)-β-D-γλυκάνη
CA	categorical agreement	κατηγορική συμφωνία
CBPs	clinical breakpoints	κλινικά όρια ευαισθησίας
CDC	centers for disease control and prevention	κέντρα ελέγχου και πρόληψης νοσημάτων
CLSI	clinical and laboratory standards institute	ινστιτούτο κλινικών και εργαστηριακών προτύπων
DMSO	dimethyl sulfoxide	διμεθυλοσουλφοξείδιο
EA	essential agreement	βασική συμφωνία
ECOFFs	epidemiological cut-offs	επιδημιολογικά όρια ευαισθησίας
EUCAST	European committee on antimicrobial susceptibility testing	ευρωπαϊκή επιτροπή για τον έλεγχο ευαισθησίας στα αντιμικροβιακά
FDA	food and drug administration	οργανισμός τροφίμων και φαρμάκων
GC	growth control	θετικός μάρτυρας ελέγχου της ανάπτυξης
GM	geometric mean	γεωμετρικός μέσος
H₂O₂	hydrogen peroxide	υπεροξείδιο του υδρογόνου
HBD2	human β-defensin-2	ανθρώπινη β-ντεφενσίνη-2
HIV	human immunodeficiency virus	ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας
HPV	human papillomavirus	ιός ανθρώπινων θηλωμάτων
HRT	hormone replacement therapy	θεραπεία ορμονικής αποκατάστασης
HSV-2	herpes simplex virus type 2	ιός του απλού έρπητα τύπου 2

I	susceptible, increased exposure	ευαίσθητο, αυξημένη έκθεση
IL	interleukin	ιντερλευκίνη
IUDs	intrauterine devices	ενδομήτριες συσκευές
MALDI-ToF MS	matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry	φασματομετρία μάζας με μηχανισμό ιοντισμού εκρόφησης με λέιζερ, υποβοηθούμενου από μήτρα, και αναλυτή χρόνου/πτήσης
MBL	mannose-binding lectin	λεκτίνη που συνδέεται με τη μαννόζη
MIC	minimum inhibitory concentration	ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση
MMP	matrix metalloproteinase	μεταλλοπρωτεϊνάση μήτρας
NaOH	sodium hydroxide	υδροξείδιο του νατρίου
OCPs	oral contraceptive pills	από του στόματος αντισυλληπτικά χάπια
PCR	polymerase chain reaction	αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης
PRRs	pattern recognition receptors	υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων
R	resistant	ανθεκτικό
RVVC	recurrent vulvovaginal candidiasis	υποτροπιάζουσα αιδοιοκολπική καντιντίαση
S	susceptible	ευαίσθητο
SAPs	secreted aspartyl proteinases	εκκριτικές ασπαρτυλοπρωτεϊνάσες
SDA	Sabouraud dextrose agar	άγαρ δεξτρόζης Sabouraud
Th	T helper	T βοηθητικά κύτταρα
TLRs	Toll-like receptors	υποδοχείς τύπου Toll
VVC	vulvovaginal candidiasis	αιδοιοκολπική καντιντίαση

WT	wild type	άγριου τύπου
KOH	potassium hydroxide	υδροξειδίου του καλίου
N-9	nonoxynol-9	νονοξυνόλη-9
NO	nitrogen monoxide	μονοξειδίου του αζώτου
ΣΔ		σακχαρώδης διαβήτης
ΣΜΝ		σεξουαλικά μεταδιδόμενο νόσημα

1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Εισαγωγή

Η καντινιασική αιδοιοκολπίτιδα (vulvovaginal candidiasis, VVC) αντιπροσωπεύει σε παγκόσμιο επίπεδο τη δεύτερη σε συχνότητα εμφάνισης λοίμωξη του γυναικείου κόλπου και οφείλεται στην παρουσία ευκαιριακών παθογόνων του γένους *Candida* [1]. Σύμφωνα με στατιστικά στοιχεία, το ~75% των γυναικών θα εμφανίσει VVC τουλάχιστον μία φορά κατά τη διάρκεια της ζωής του, με το 40-45% αυτών να παρουσιάζει ≥ 2 επαναλαμβανόμενα επεισόδια. Αν και η *C. albicans* παραμένει ο κύριος αιτιολογικός παράγοντας, το ~10-20% των ασθενών παρουσιάζει υποτροπιάζουσα αιδοιοκολπική καντιντίαση (recurrent vulvovaginal candidiasis, RVVC), η οποία χαρακτηρίζεται από ≥ 3 συμπτωματικά επεισόδια ανά έτος και οφείλεται κυρίως σε non-*albicans Candida* spp. [2]. Αξίζει να σημειωθεί ότι ένα σημαντικό ποσοστό κλινικών στελεχών *Candida* παρουσιάζει μειωμένη *in vitro* δραστηριότητα στα διαθέσιμα αντιμυκητικά, αυξάνοντας έτσι τις πιθανότητες ανεπιτυχούς θεραπευτικής έκβασης [3]. Η επιδημιολογική εικόνα της VVC μπορεί να αλλάξει με την πάροδο του χρόνου, ενώ δύναται να παρουσιάζει αξιοσημείωτη γεωγραφική μεταβλητότητα. Ως εκ τούτου, η συνεχής παρακολούθηση της τοπικής επίπτωσης της νόσου καθώς και της κατανομής των *Candida* spp. και του προφίλ της *in vitro* ευαισθησίας τους στα αντιμυκητικά είναι καίριας σημασίας.

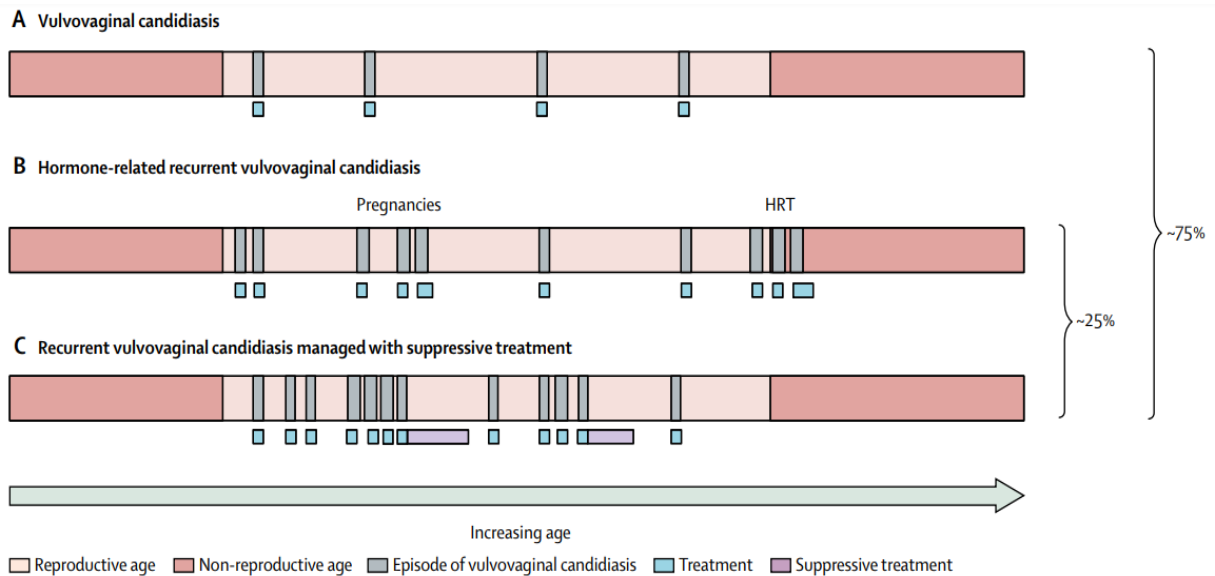
Ο προσδιορισμός της *in vitro* ευαισθησίας παθογόνων μικροβίων σε αντιμικροβιακούς παράγοντες είναι απαραίτητος όχι μόνο για τον καθορισμό του κατάλληλου θεραπευτικού σχήματος, αλλά και για την επιδημιολογική επιτήρηση της μικροβιακής αντοχής. Προκειμένου αυτός να τυποποιηθεί, ώστε τα αποτελέσματά του να είναι καλύτερα αξιολογήσιμα και συγκρίσιμα, η ευρωπαϊκή επιτροπή για τον έλεγχο ευαισθησίας στα αντιμικροβιακά (European committee on antimicrobial susceptibility testing, EUCAST) έχει καθιερώσει πρότυπες μεθοδολογίες εργαστηριακού ελέγχου καθώς και αντίστοιχα όρια ευαισθησίας. Για όσους συνδυασμούς είδος μικροβίου-αντιμικροβιακός παράγοντας δεν υφίστανται επίσημα κλινικά όρια ευαισθησίας (clinical breakpoints, CBPs),

καθορίζονται επιδημιολογικά όρια ευαισθησίας (epidemiological cut-offs, ECOFFs) αξιοποιώντας δεδομένα που εξάγονται από πολυκεντρικές μελέτες ή/και το συγκερασμό μεμονωμένων ερευνών. Συγκεκριμένα, τα ECOFFs ορίζουν την πιθανότητα ένα μικροβιακό στέλεχος να μη φέρει δευτερογενείς μεταλλάξεις που του προσδίδουν αντοχή στο εκάστοτε φάρμακο, δηλαδή να είναι άγριου τύπου (wild type, WT) [4]. Μέχρι στιγμής, δεν υπάρχουν EUCAST CBPs ή ECOFFs για την πλειοψηφία των αντιμυκητικών που χορηγούνται σε γυναίκες με VVC, καθιστώντας τη θεραπευτική προσέγγιση της λοίμωξης κυρίως εμπειρική [5]. Παράλληλα, η μέθοδος αναφοράς της EUCAST για τον *in vitro* έλεγχο ευαισθησίας *Candida spp.* στα αντιμυκητικά (pH 7,0) δεν προσομοιώνει το όξινο περιβάλλον του γυναικείου κόλπου (pH 3,8-4,5) [6].

1.2 Παγκόσμια επιδημιολογία της VVC

1.2.1. Επιπολασμός

Η VVC θεωρείται η πιο διαδεδομένη λοίμωξη από *Candida* στον άνθρωπο. Σύμφωνα με διεθνή δεδομένα, εκτιμάται πως το ~10-15% των ασυμπτωματικών γυναικών παγκοσμίως αποικίζεται από *Candida spp.* [7], ενώ υπολογίζεται ότι το ~75% των γυναικών θα εμφανίσει τη νόσο τουλάχιστον μία φορά στη ζωή του και ~25% αυτών θα υποφέρει από RVVC [8]. Ωστόσο, η VVC δεν ανήκει στις υποχρεωτικά αναφερόμενες νόσους, και ως εκ τούτου, οι πληροφορίες για τη συχνότητα εμφάνισής της είναι ελλιπείς και βασίζονται σε επιδημιολογικές μελέτες που ενδέχεται να χαρακτηρίζονται από ανακρίβειες στη διάγνωση ή/και από τη χρήση μη αντιπροσωπευτικών πληθυσμών ως δείγμα [9].



Εικόνα 1. Εκτιμώμενη συχνότητα εμφάνισης της VVC και της RVVC στη διάρκεια της ζωής μιας γυναίκας [8].

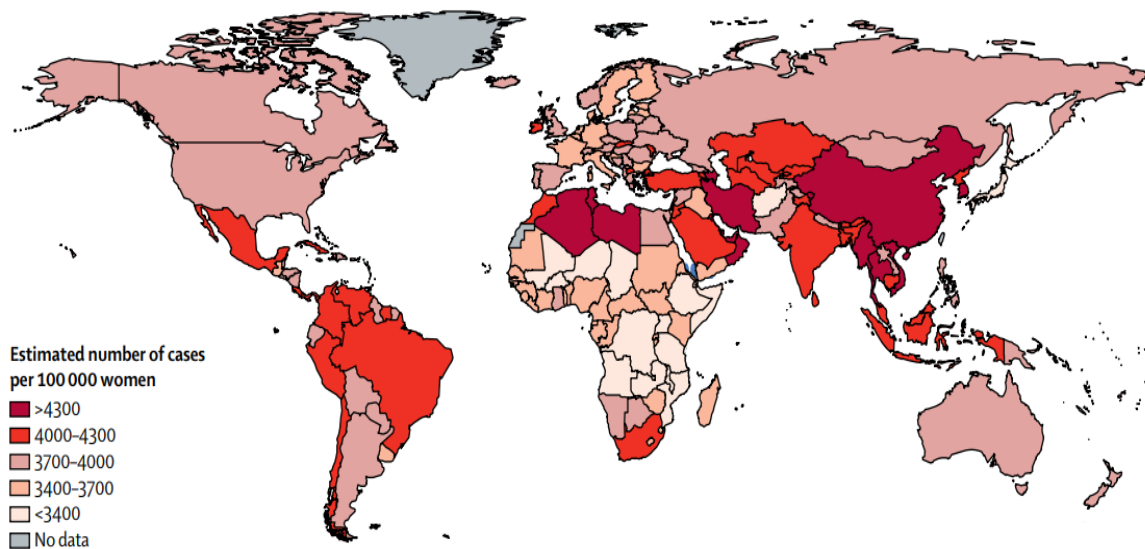
Τα αποτελέσματα μιας αναδρομικής πολυκεντρικής μελέτης, η οποία διεξήχθη αντλώντας επιδημιολογικά δεδομένα από 262 γυναικολογικά ιατρεία της Γερμανίας για το διάστημα 01/11/2014-31/10/2016, αντικατοπτρίζουν μία πρώτη εικόνα του επιπολασμού της VVC στην Ευρώπη. Συνολικά, 954.186 γυναίκες παρακολουθήθηκαν, εκ των οποίων 50.279 (5%) διαγνώστηκαν με VVC. Τα υψηλότερα ποσοστά εμφάνισης της λοίμωξης εντοπίστηκαν στις ηλικιακές ομάδες των 18-25, 26-30 και 31-35 ετών (7% στην καθεμία) [10]. Μια διαδικτυακή έρευνα που έλαβε χώρα στις ΗΠΑ το 2020, στην οποία συμμετείχαν 1.869 γυναίκες, υπέδειξε ότι το 5% των ερωτηθέντων ανέφερε ότι είχε διαγνωσμένη VVC το περασμένο έτος και το 53% δήλωσε ότι είχε διαγνωστεί με VVC από πάροχο υγειονομικής περίθαλψης κατά τη διάρκεια της ζωής του [11]. Σε γενικές γραμμές, τα ποσοστά των ασθενών με VVC φαίνεται να είναι πιο υψηλά στις πολυπληθέστερες χώρες. Σύμφωνα με την πλέον πρόσφατη ανασκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας που αφορά σε επιδημιολογικές μελέτες που δημοσιεύτηκαν μεταξύ 2003-2014, τα υψηλότερα ποσοστά περιστατικών παρατηρήθηκαν σε αφρικανικές χώρες, όπως για παράδειγμα στη Νιγηρία (57%) και στην Τυνησία (48%). Ακολουθούσαν η Βραζιλία (44-48%), η Αυστραλία (43%) και η Τουρκία (42%),

ενώ χαμηλότερα ποσοστά ανέφεραν επιδημιολογικές μελέτες προερχόμενες από ευρωπαϊκές χώρες, όπως η Ιταλία (19%) και η Ελλάδα (12%) [7].

Πίνακας 1. Συχνότητα εμφάνισης της VVC παγκοσμίως όπως περιγράφεται σε επιδημιολογικές μελέτες, οι οποίες δημοσιεύτηκαν το χρονικό διάστημα 2003-2014 [7].

Country	Year(s) of study	Symptomatic women	
		Number	With VVC (%)
Brazil	2002	23	43.5
Brazil	2005–2007	121	47.9
Jamaica	–	422	29.6
Italy	1996–2005	13014	19.5
Austria	2000–2004	10463	30.5
Greece	2002–2004	4743	12.1
Turkey	2004–2005	569	42.2
India	2003–2004	601	18.5
India	–	1050	20.4
India	2011–2012	300	17.7
Israel	–	208	35.5
Tunisia	2006–2008	481	48.0
Nigeria	–	902	57.3
Australia	2003–2004	342	42.7

Η RVVC υπολογίζεται πως επηρεάζει ~138 εκατομμύρια γυναίκες ετησίως σε παγκόσμιο επίπεδο, αριθμός που προβλέπεται μάλιστα να ανέλθει στις 158 εκατομμύρια γυναίκες ανά έτος έως το 2030. Σύμφωνα με τα πλέον πρόσφατα επιδημιολογικά στοιχεία που αφορούν το έτος 2013, ο παγκόσμιος μέσος ετήσιος επιπολασμός της νόσου αποτιμάται στα 3.871 κρούσματα ανά 100.000 γυναίκες (4.060, 4.040 και 3.755 στην Αμερική, στην Ασία και στην Ευρώπη, αντίστοιχα). Το ποσοστό εμφάνισής της σε γυναίκες ηλικίας 15-54 ετών είναι ~7%, με το υψηλότερο (9%) να συναντάται στην ηλικιακή ομάδα των 25-34 ετών [8]. Τα τελευταία χρόνια, ωστόσο, έχει παρατηρηθεί αύξηση στη συχνότητα εμφάνισής της. Έτσι, εκτιμάται ότι στις μέρες μας το 8-10% των γυναικών είναι επιρρεπείς σε υποτροπές παρουσιάζοντας ≥ 4 επεισόδια VVC ετησίως [12]. Αυτό οφείλεται εν μέρει στην πλήθυνση των λοιμώξεων που προκαλούνται από non-*albicans Candida* spp. [13].

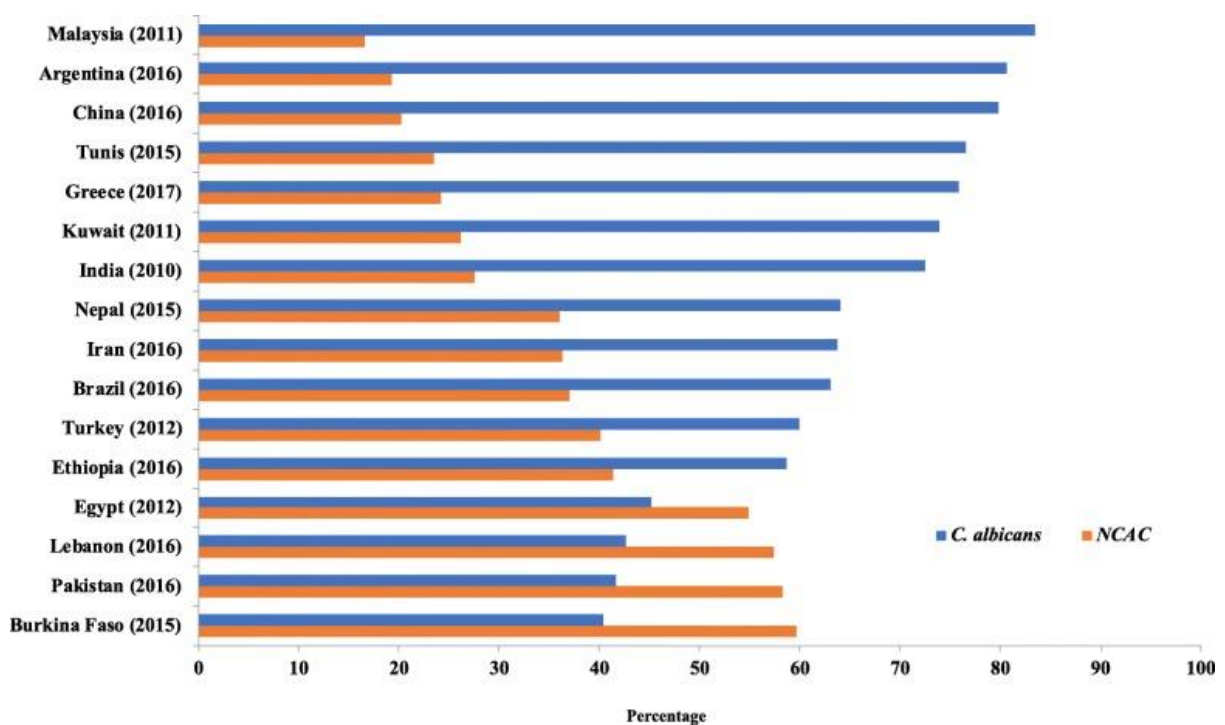


Εικόνα 2. Παγκόσμιος επιπολασμός της RVVC σύμφωνα με τα πλέον πρόσφατα επιδημιολογικά δεδομένα (2013) [8].

1.2.2 Αιτιολογικοί παράγοντες

Η *C. albicans*, η οποία είναι ένα κοινό μικρόβιο της γυναικείας ουρογεννητικής οδού, παραμένει ο πιο συνηθισμένος μύκητας που εντοπίζεται σε κλινικά δείγματα από ασθενείς που έχουν διαγνωστεί με VVC. Πρόσφατα, ωστόσο, παρατηρήθηκε μια σημαντική μεταβολή στους αιτιολογικούς παράγοντες της νόσου, με τα non-*albicans Candida spp.* να αποκτούν κυρίαρχη θέση. Τα είδη αυτά, αντιπροσωπεύουν πλέον περίπου το 10% έως και το 45% των περιπτώσεων VVC σύμφωνα με ορισμένες μελέτες [13]. Η κατανομή των αιτιολογικών παραγόντων της νόσου μπορεί να αλλάξει με την πάροδο του χρόνου, ενώ δύναται να παρουσιάζει αξιοσημείωτη γεωγραφική μεταβλητότητα, όντας διαφορετική μεταξύ των ποικίλλων πληθυσμιακών ομάδων [14]. Για παράδειγμα, έχει αποδειχθεί ότι γυναίκες με σακχαρώδη διαβήτη (σακχαρώδης διαβήτης, ΣΔ) και γυναίκες που λαμβάνουν θεραπεία ορμονικής αποκατάστασης (hormone replacement therapy, HRT) είναι πιο πιθανό να εμφανίσουν αιδοιοκολπίτιδα από non-*albicans Candida spp.* [15]. Γενικά, όπως προκύπτει από παγκόσμιες επιδημιολογικές μελέτες που διεξήχθησαν το διάστημα 2003-2014, στην περίπτωση της VVC η *C. albicans* φαίνεται να είναι το κυρίως απομονούμενο είδος στο

20-90% των περιπτώσεων, ακολουθούμενη από την *C. glabrata* (3-50%), την *C. tropicalis* (0,2-18%), την *C. parapsilosis* (0,5-10%) και τέλος την *C. krusei* (0,1-6%) [7] [16]. Παρομοίως, η *C. albicans* είναι ο κύριος αιτιολογικός παράγοντας και στην πλειονότητα των τεκμηριωμένων περιπτώσεων RVVC (74%). Ακολουθούν η *C. glabrata* (14%) και η *C. krusei* (6%) [17]. Σημειωτέον, στην αναθεωρημένη ονοματολογία των κλινικά σημαντικών μυκήτων, η *C. glabrata* αναφέρεται πλέον ως *Nakaseomyces glabrata* και η *C. krusei* ως *Pichia kudriavzevii* [18] [19].



Εικόνα 3. Κατανομή των στελεχών *C. albicans* και non-*albicans* *Candida* spp. που απομονώθηκαν από ασθενείς με VVC σε διάφορες χώρες μετά το 2010 [20].

1.2.2.1 Η *C. albicans* ως κύριο παθογόνο

Η *C. albicans*, η οποία ενοχοποιείται για την πλειοψηφία των περιπτώσεων VVC, αποικίζει ασυμπτωματικά τη στοματική, τη γαστρεντερική και την ουρογεννητική οδό στους ανθρώπους. Ωστόσο, μπορεί ακολούθως να προκαλέσει φλεγμονή στις περιοχές εντόπισής

της. Οι ιατρικά σημαντικές λοιμώξεις που προκαλούνται από *C. albicans* μπορούν ευρέως να ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες, τις βλεννογονικές και τις συστηματικές. Βλεννογονοδερματικές αλλοιώσεις από *C. albicans* εντοπίζονται κυρίως στον κόλπο (VVC), στη στοματική κοιλότητα (στοματοφαρυγγική καντιντίαση), στον οισοφάγο (οισοφαγική καντιντίαση) και σπανιότερα στα νύχια (καντιντιασική ονυχομυκητίαση). Η καντιντίαση του δέρματος είναι εξαιρετικά ασυνήθιστη και μπορεί σπάνια να εμφανιστεί σε ένα μικρό ποσοστό ασθενών με εγγενή ανοσοανεπάρκεια [21]. Η *C. albicans* αποτελεί τον κύριο αιτιολογικό παράγοντα της VVC σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Μάλιστα, παρά τις επιμέρους διαφορές στην κατανομή των *Candida* spp. μεταξύ ερευνών, υπάρχει συμφωνία για την απομόνωσή της σε ποσοστό $\geq 75\%$ σε γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας. Επιπλέον, θεωρείται το κύριο αίτιο της λοίμωξης σε ασυμπτωματικές γυναίκες, σε έγκυες και σε εκείνες που εμφανίζουν οξεία VVC [22].

1.2.2.2 Τα ενοχοποιημένα για VVC non-*albicans Candida* spp.

Η *C. glabrata*, γενετικά συγγενής του γένους *Saccharomyces* [23], αποτελεί το πιο συχνά απομονούμενο non-*albicans Candida* spp. σε γυναίκες με VVC. Εντούτοις, συχνά υπερεκτιμάται ως παθογόνος παράγοντας του κόλπου καθώς σε πολλές περιπτώσεις είναι απλά αποικιστής, ιδιαίτερα σε περι- και μετ-εμμηνοπαυσιακές γυναίκες [24]. Η συχνότητα απομόνωσής της είναι υψηλότερη σε ανοσοκατασταλμένες ασθενείς, γυναίκες που λαμβάνουν τακτικά αντιβιοτικά ευρέως φάσματος ή αντιμυκητικά [25], σε διαβητικές ασθενείς [26] και σε γυναίκες κατά τη διάρκεια της όψιμης προ- ή περι-εμμηνοπαυσιακής περιόδου [25]. Η απόκριση της *C. glabrata* στη συμβατική αντιμυκητική θεραπεία είναι δύσκολο να προβλεφθεί, λόγω της μειωμένης *in vitro* ευαισθησίας της στις αζόλες [27]. Σημειωτέον, η *C. glabrata* έχει αναγνωριστεί ως σύμπλεγμα που περιλαμβάνει τα κρυπτικά είδη *C. glabrata sensu stricto*, *C. bracarensis* [18] και *C. nivariensis* [28].

Η *C. tropicalis* θεωρείται το δεύτερο σε συχνότητα εμφάνισης non-*albicans Candida* spp. αίτιο της λοίμωξης, ωστόσο το ποσοστό απομόνωσής της παρουσιάζει ευρεία γεωγραφική κατανομή με μόλις 0,2-2% σε ευρωπαϊκές χώρες, στις ΗΠΑ και στην Αυστραλία,

8-10% σε χώρες της Νότιας Αμερικής και 34% σε χώρες της αφρικανικής ηπείρου [7]. Μεταξύ των non-*albicans* *Candida* spp., παρουσιάζει την υψηλότερη γενετική ομοιότητα με την *C. albicans* [29] ενώ και η παθογένειά της έχει αποδοθεί σε αρκετούς λοιμογόνους παράγοντες, παρόμοιους με αυτούς της *C. albicans* [30]. Πρόσφατα περιγράφηκε σημαντική αύξηση στην απομόνωση ανθεκτικών στη φλουконаζόλη στελεχών *C. tropicalis* από ασθενείς με καντινταιμία [31] και καντιντουρία [32], όμως αντίστοιχα στοιχεία για περιστατικά VVC δεν έχουν ακόμη αναφερθεί.

Η *C. parapsilosis* απομονώνεται σπάνια ως αιτιολογικός παράγοντας της VVC (0-10%) [7], ενώ μπορεί και να αποτελεί έναν προσωρινό κολπικό αποικιστή. Αν και προκαλεί συχνά συμπτωματική λοίμωξη, φαίνεται να ανταποκρίνεται σε μια ποικιλία αντιμυκητικών παραγόντων [33]. Αξίζει να σημειωθεί ότι η *C. parapsilosis* αναγνωρίστηκε το 2005 ως σύμπλεγμα που περιλαμβάνει τρία στενά συγγενικά είδη [34]. Μολονότι η *C. parapsilosis sensu stricto* παρουσιάζει την υψηλότερη συχνότητα απομόνωσης στο κλινικό περιβάλλον συγκριτικά με τις *C. orthopsilosis* και *C. metapsilosis*, τα τρία αυτά κρυπτικά είδη χαρακτηρίζονται από αξιοσημείωτες μεταξύ τους διαφορές στην παθογένεια των λοιμώξεων που προκαλούν, στη λοιμογονικότητα και στην *in vitro* ευαισθησία στα αντιμυκητικά [35].

Η *C. krusei* έχει αναφερθεί ως ασυνήθιστο αίτιο της λοίμωξης, με μόλις το 0-6% των περιστατικών VVC να οφείλονται σε αυτή [20]. Η απομόνωσή της είναι συχνότερη σε μετεμμηνοπαυσιακές, λευκές ασθενείς, ενώ αποτελεί αιτία ανθεκτικής στη θεραπεία κολπίτιδας λόγω της εγγενούς αντοχής που παρουσιάζει στις αζόλες [36].

Η *C. dubliniensis* και η *C. africana* ανήκουν στο σύμπλεγμα των ειδών *C. albicans*. Η *C. dubliniensis* εμφανίζει πολλά κοινά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά με την *C. albicans*, όπως την ικανότητα σχηματισμού χλαμυδοσπορίων και τη θετική δοκιμασία βλαστικού σωλήνα (germ tube test) [37]. Από την άλλη πλευρά, η *C. africana* διακρίνεται από τα υπόλοιπα κρυπτικά είδη του συμπλέγματος από την αδυναμία παραγωγής χλαμυδοσπορίων και αφομοίωσης πηγών άνθρακα, όμως ο διαχωρισμός της μπορεί να επιτευχθεί μόνο με μοριακές δοκιμασίες [38]. Η *C. dubliniensis* απομονώνεται σπάνια από το γεννητικό σύστημα γυναικών [39], ενώ παρουσιάζει μειωμένη ευαισθησία στις αζόλες και τείνει να αναπτύσσει γρήγορα αντοχή σε αυτές [40]. Η *C. africana* έχει αναγνωριστεί ως αιτιολογικός παράγοντας κυρίως της VVC, με

τα περισσότερα περιστατικά να έχουν περιγραφεί σε χώρες της Νότιας Αφρικής και να έχουν ανταποκριθεί στη θεραπεία με ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιμυκητικά [38].

Η *C. auris* απομονώνεται όλο και πιο συχνά από ποικίλα κλινικά δείγματα και μπορεί να προκαλέσει από ήπιες έως και απειλητικές για τη ζωή λοιμώξεις. Ανησυχητικά, είναι συχνά πολυ-ανθεκτική σε αντιμυκητικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται στην καθ' ημέρα κλινική πράξη, με το > 90% των στελεχών που έχουν απομονωθεί παγκοσμίως να εμφανίζει αντοχή στη φλουконаζόλη [41]. Είναι περισσότερο γνωστή ως αιτιολογικός παράγοντας της καντινταιμίας και έχει περιστασιακά αναφερθεί ως αιτία της VVC [42].

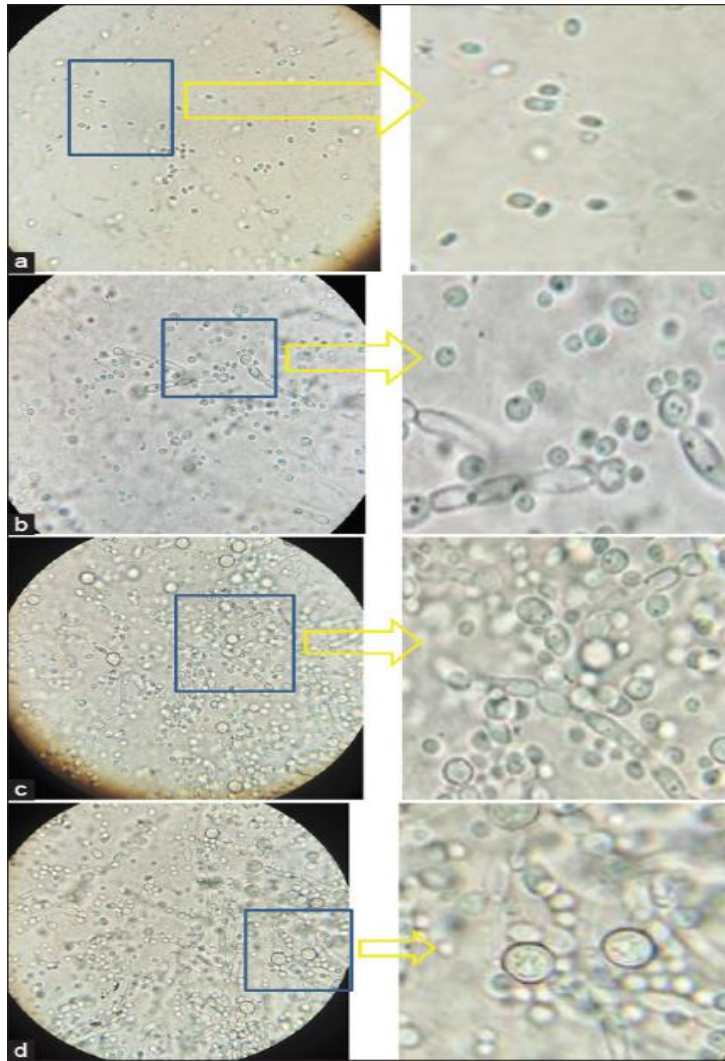
Λιγότερο κοινά non-*albicans Candida* spp. που έχουν απομονωθεί από ασθενείς με VVC περιλαμβάνουν τις *C. bracarensis*, *C. duobushaemulonii*, *C. famata*, *C. guilliermondii*, *C. inconspicua*, *C. lusitaniae*, *C. nivariensis* και *C. norvegiensis* [43]. Τέλος, έχουν περιγραφεί μεμονωμένα περιστατικά λοιμώξεων οφειλόμενα σε *Saccharomyces cerevisiae* [44].

1.3 Παράγοντες λοιμογονικότητας των *Candida* spp.

Η παθογόνος δράση των μικροοργανισμών προκύπτει από την ανάγκη τους να αμυνθούν σε περιβαλλοντικές επιθέσεις. Εν προκειμένω, τα *Candida* spp. παράγουν ορισμένους μεταβολίτες, οι οποίοι προέρχονται από το φυσικό τους μεταβολισμό ως απόκριση σε ερεθίσματα από το μικροπεριβάλλον του ξενιστή. Οι ουσίες αυτές που δρουν στους ιστούς του ατόμου και αλληλεπιδρούν με την ανοσολογική άμυνά του ονομάζονται παράγοντες λοιμογόνου δράσης. Αυτοί ενδέχεται να αποτελούν μέρος της εγγενούς σύνθεσης των κυττάρων και συμβάλουν στη διείσδυση του μύκητα στον ιστό, στον πολλαπλασιασμό και στην επιβίωση του, ενώ συγχρόνως τον προστατεύουν από την ανοσολογική άμυνα του ξενιστή. Γενικά, η VVC εμφανίζεται ταυτόχρονα με μια ανισορροπία μεταξύ των παραγόντων που προστατεύουν τον κόλπο και της λοιμογόνου δράσης της *Candida*, η οποία προκαλείται από φυσιολογικές ή μη μεταβολές, ευνοώντας έτσι τον αποικισμό ή/και την υπερανάπτυξη του παθογόνου. Συνεπώς, η μόλυνση είναι αποτέλεσμα αλλαγών στη σχέση κομμενσαλισμού μεταξύ του ξενιστή και του μικροοργανισμού [45] [46].

Ένα από τα χαρακτηριστικά που καθιστούν τα *Candida* spp. επιτυχημένα παθογόνα στην πρόκληση λοιμώξεων είναι η προσαρμοστικότητά τους, καθώς μπορούν να ευδοκιμούν επιτυχώς στις διάφορες συνθήκες (διαθεσιμότητα θρεπτικών ουσιών, pH και επίπεδα CO₂) που συναντούν στον εκάστοτε ξενιστή. Ενδεικτικά, η *C. albicans* διαθέτει μεταβολική ευελιξία, όντας σε θέση να αξιοποιεί ποικίλες πηγές άνθρακα ταυτόχρονα με σκοπό την επιβίωσή της αλλά και την ενίσχυση της μολυσματικότητάς της [47].

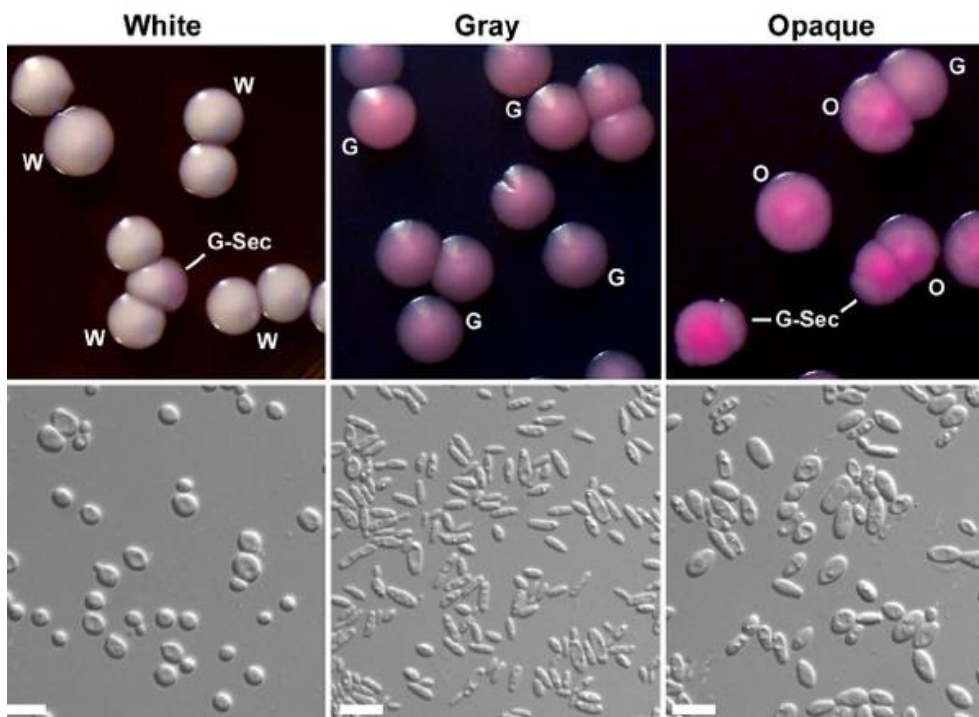
Η *C. albicans* διαθέτει ένα σύνολο παραγόντων λοιμογόνου δράσης, αλλά και πολλούς προστατευτικούς μηχανισμούς. Πρόκειται για έναν πολυμορφικό *Candida* spp. αφού μπορεί να υπάρχει σε δύο μορφές, αυτή των βλαστοκονιδίων και αυτή των ψευδοϋφών, οι οποίες προκύπτουν ως απόκριση σε διαφορετικές συνθήκες του περιβάλλοντος. Τα βλαστοκονίδια σχηματίζονται όταν ο ζυμομύκητας αναπτύσσεται με εκβλάστηση, ενώ ο σχηματισμός ψευδοϋφών λαμβάνει χώρα με πολωμένη κυτταρική διαίρεση όταν τα βλαστοκονίδια έχουν επιμηκυνθεί χωρίς να αποκολληθούν από τα γειτονικά κύτταρα. Κάτω από ορισμένες μη ιδανικές συνθήκες ανάπτυξης, η *C. albicans* μπορεί επίσης να σχηματίσει στρογγυλά, διαθλαστικά σπόρια με παχύ κυτταρικό τοίχωμα (χλαμυδοσπόρια) [48].



Εικόνα 4. Μορφολογία του βιοϋμενίου που σχηματίζει το πρότυπο στέλεχος *C. albicans* ATCC 10231 μετά από χρόνο επώασης α) 6, β) 24, γ) 36 και δ) 48 ωρών. Το είδος μπορεί να διακριθεί από αλλά λόγω του σχηματισμού ψευδοϋφών (β, γ) και χλαμυδοσπορίων (δ) [49].

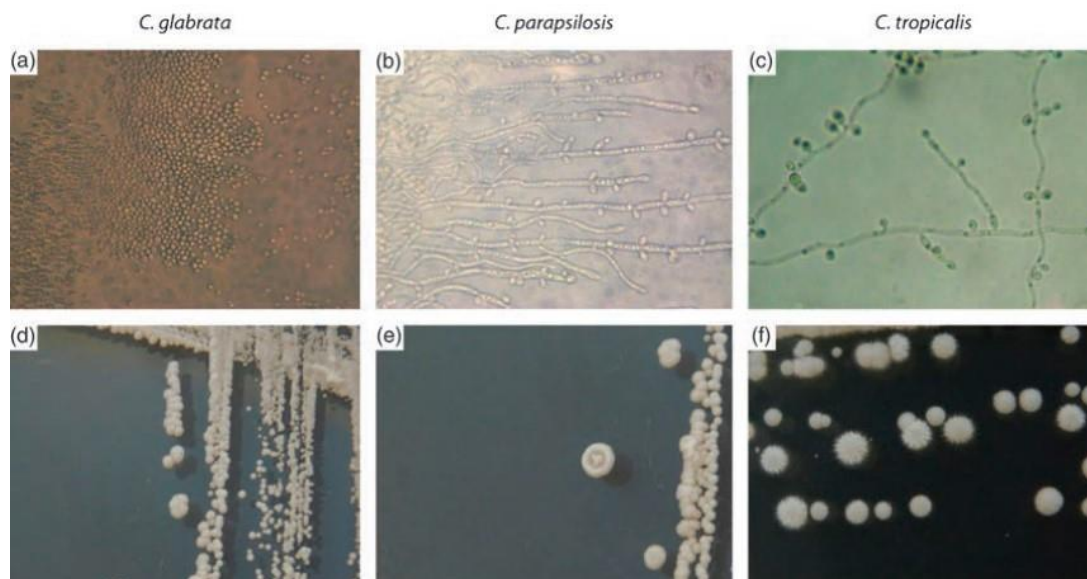
Η φαινοτυπική ευπλασία (phenotypic switch) της *C. albicans*, η οποία περιλαμβάνει εναλλαγή μεταξύ διαφορετικών μορφολογιών, συμβάλει στην ικανότητά της να αποικίζει ασυμπτωματικά και να μολύνει σχεδόν όλες τις θέσεις του σώματος του ξενιστή. Ένα ιδιαίτερα συναρπαστικό αναπτυξιακό χαρακτηριστικό της είναι η εναλλαγή λευκού-γκρι, μια αναστρέψιμη μετάβαση μεταξύ της κανονικής μορφολογίας ζυμομύκητα (λευκό) και ενός επιμήκους κυτταρικού τύπου (γκρι) που είναι η ικανό για σύζευξη. Αν και τα γκρι κύτταρα είναι πολύ λιγότερο ικανά από τα λευκά να προκαλέσουν συστηματική λοίμωξη, εντούτοις

είναι καλύτερα προσαρμοσμένα για αποικισμό και διαφεύγουν εύκολα των ουδετερόφιλων του ξενιστή [50].



Εικόνα 5. Μακροσκοπική και μικροσκοπική παρατήρηση της μορφολογίας των τριών φαινοτύπων [λευκός (W), γκρί (G) και παροδικά γκρί (O)] της *C. albicans* [51].

Εκτός της *C. albicans*, ικανότητα σχηματισμού ψευδοϋφών, οι οποίες ενισχύουν την προσκόλληση του ζυμομύκητα και άρα τη διείσδυσή του στα κύτταρα του ξενιστή [45], διαθέτουν σχεδόν όλα τα *Candida* spp. Ειδικότερα, η *C. parapsilosis* και η *C. tropicalis* σχηματίζουν ψευδοϋφές, ενώ η *C. glabrata* αναπτύσσει μόνο βλαστοκονίδια [52].

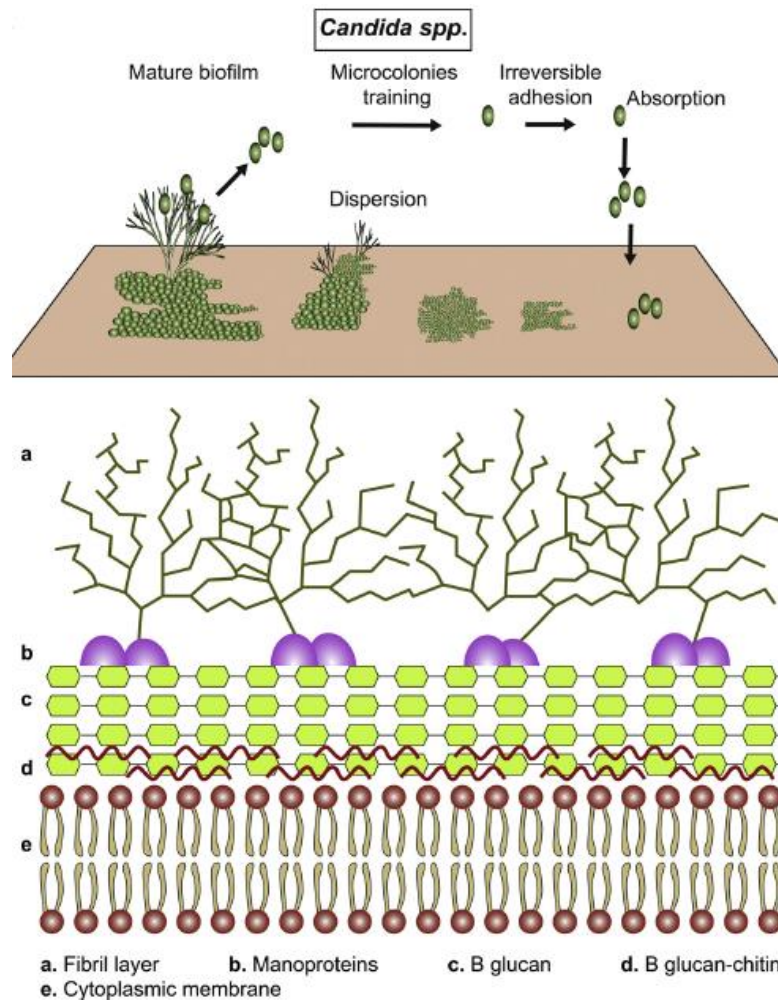


Εικόνα 6. Μακροσκοπική και μικροσκοπική παρατήρηση της μορφολογίας *Candida spp.* σε άγαρ αραβοσίτου με Tween 80. Μικροσκοπική παρατήρηση: (a) βλαστοκονίδια *C. glabrata*, (b) ψευδοϋφές *C. parapsilosis*, (c) ψευδοϋφές *C. tropicalis*. Μακροσκοπική παρατήρηση: (d) *C. glabrata* (e) *C. parapsilosis*, (f) *C. tropicalis* [52].

Σημειωτέον, η *C. albicans* και η *C. dubliniensis* παράγουν και αληθείς υφές που σχετίζονται με μεγαλύτερη μηχανική αντοχή, ενισχύοντας τη διείσδυση και τον αποικισμό στους ιστούς του ξενιστή. Συγχρόνως, επιδεικνύουν υψηλή αντοχή στη φαγοκυττάρωση [53] [54].

Ένας άλλος σημαντικός λοιμογόνος παράγοντας που σχετίζεται με την παθογονικότητα των *Candida spp.* είναι η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίων (biofilms). Εν προκειμένω, τα βιοϋμένια συνιστούν ένα σύμπλεγμα κυττάρων που περιβάλλονται από μια εξωκυττάρια μήτρα, η οποία προσφέρει δομική υποστήριξη για την προσκόλληση των κυττάρων μεταξύ τους ή/και σε διαφορετικά είδη επιφανειών [55]. Σημειωτέον, η προσκόλληση των μικροβίων σε επιφάνειες έχει αποδειχθεί ότι κατέχει σημαίνοντα ρόλο στην παθογένεια των λοιμώξεων [56]. Τα βιοϋμένια παρουσιάζουν εγγενή αντοχή στα συμβατικά αντιμυκητικά φάρμακα, στο ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή και σε

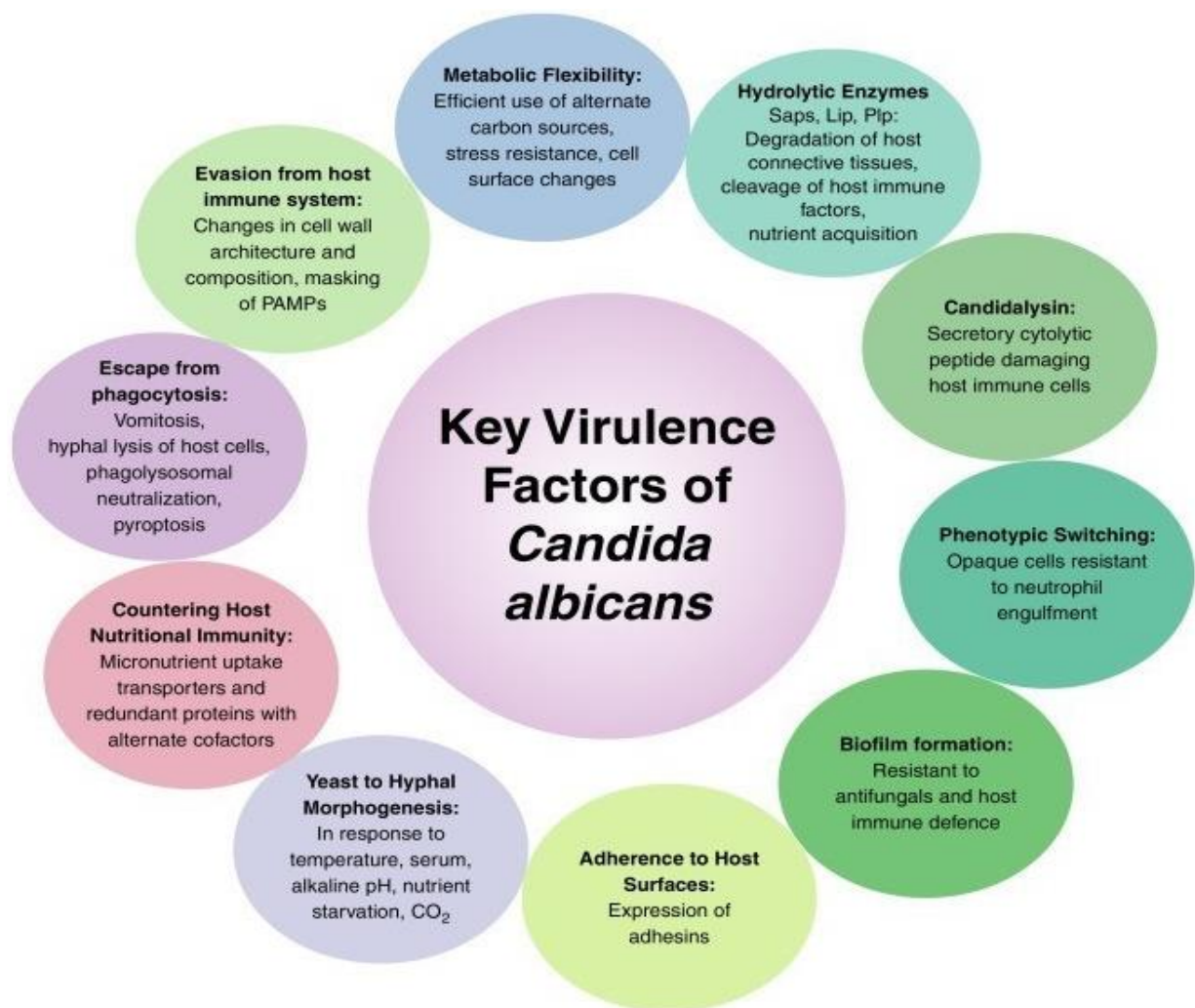
διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες, καθιστώντας τις λοιμώξεις που σχετίζονται με βιοϋμένια κλινική πρόκληση [57].



Εικόνα 7. Τα στάδια ανάπτυξης βιοϋμενίων στα *Candida* spp. [58].

Επίσης, τα *Candida* spp. εκκρίνουν υδρολυτικά ένζυμα, τα οποία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην προσκόλληση, στην εισβολή και κατ' επέκταση στην καταστροφή των ιστών που προσβάλλουν [59]. Τα ένζυμα που εμπλέκονται συχνότερα στους μηχανισμούς παθογένειας της VVC είναι οι εκκριτικές ασπαρτυλοπρωτεϊνάσες (secreted aspartyl proteinases, SAPs), καθώς και οι φωσφολιπάσες, οι λιπάσες και οι αιμολυσίνες [52]. Οι SAPs παρουσίασαν ισχυρότερη πρωτεολυτική δράση σε στελέχη που απομονώθηκαν από

περιστατικά VVC συγκριτικά με αυτά που προκάλεσαν καντινιασικές λοιμώξεις του ουροποιητικού ή του αναπνευστικού συστήματος [60]. Επιπλέον, τα επίπεδα έκφρασης και η δράση τους ήταν υψηλότερα σε στελέχη που απομονώθηκαν από γυναίκες με VVC σε σχέση με αυτά ασυμπτωματικών φορέων [61]. Σημειωτέον, η έκφραση των διακριτών για την *C. albicans* SAP1 και SAP3 παρουσιάζει ισχυρή και ειδική συσχέτιση με την εκδήλωση VVC και RVVC [62]. Από την άλλη, οι φωσφολιπάσες υδρολύουν έναν ή περισσότερους εστερικούς δεσμούς σε γλυκεροφωσφολιπίδια, συμβάλλοντας στη διατάραξη της μεμβράνης του κυττάρου-ξενιστή και στην προσκόλληση των ζυμομυκήτων σε αυτό. Πολλά *Candida spp.* διαθέτουν ικανότητα παραγωγής εξωκυττάριας φωσφολιπάσης, αλλά αυτή φαίνεται να είναι σε μεγάλο βαθμό στελεχο-εξαρτώμενη [63]. Τέλος, πρόσφατα περιγράφηκε ένας νέος παράγοντας λύσης του κυττάρου-ξενιστή από την *C. albicans*, ο οποίος ονομάστηκε «καντινταλυσίνη». Πρόκειται για μια κυτταρολυτική πεπτιδική τοξίνη, η οποία εκκρίνεται από τη διεισδυτική μορφή της *C. albicans* και αποτελεί βασικό στοιχείο για την ενεργοποίηση των κυττάρων-ξενιστών και τη στρατολόγηση των ουδετερόφιλων. Η συγκεκριμένη τοξίνη θεωρείται ως ο πρώτος αληθινός τυπικός παράγοντας λοιμογόνου δράσης της *C. albicans*, αλλά επίσης πυροδοτεί προστατευτικές ανοσολογικές αντιδράσεις στον ξενιστή [64].



Εικόνα 8. Παράγοντες λοιμογόνου δράσης του κύριου αιτιολογικού παράγοντα της VVC, της *C. albicans* [65].

1.4 Ανοσοπαθολογική προσέγγιση της VVC

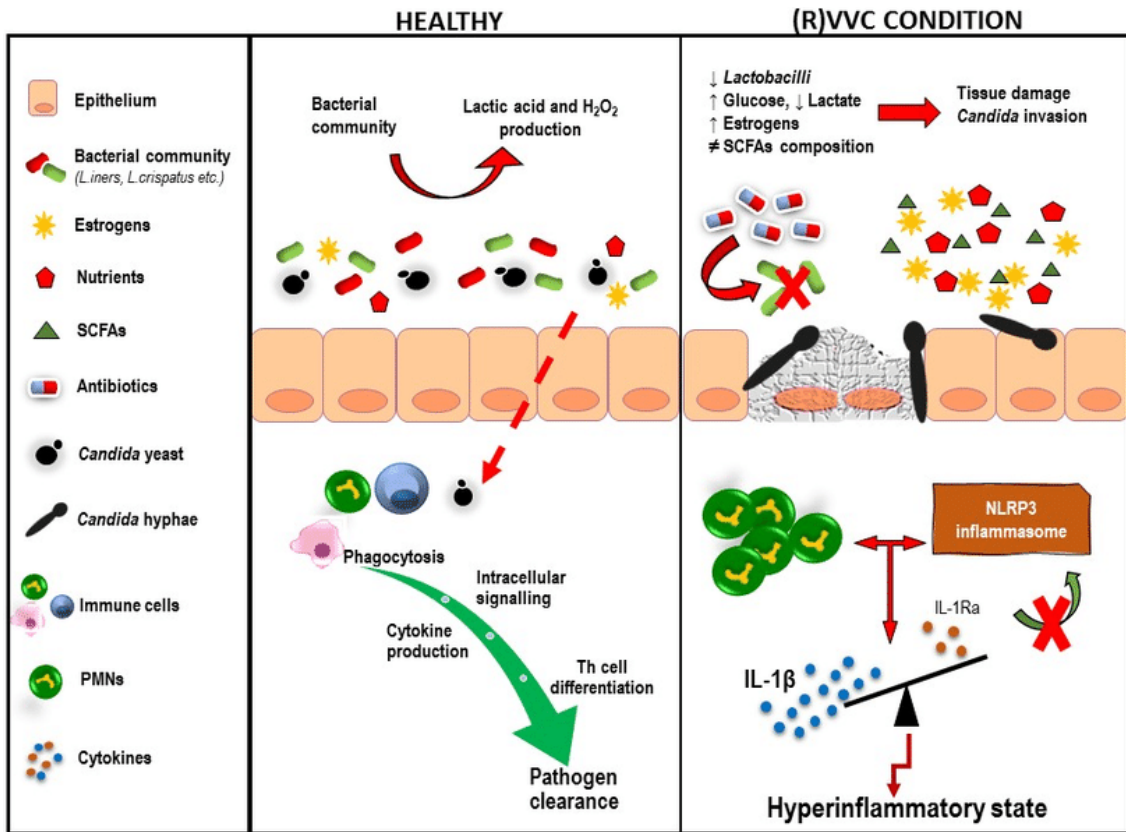
Τις τελευταίες δεκαετίες έχει παρατηρηθεί σημαντική πρόοδος στην κατανόηση της ανοσολογικής απόκρισης που επάγεται από την είσοδο παθογόνων μικροοργανισμών στον ανθρώπινο οργανισμό. Εν συντομία, στην περίπτωση της VVC, μόλις η *Candida* βλάψει την άμυνα πρώτης γραμμής του κόλπου, η οποία αντιπροσωπεύεται από επιθηλιακά κύτταρα, απελευθερώνονται αντιμικροβιακά πεπτιδία και μόρια σηματοδότησης, οδηγώντας έτσι σε

έμφυτη στρατολόγηση ανοσοκυττάρων. Διαφορετικά συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος των μυκήτων, όπως οι β-γλυκάνες και οι μαννοπρωτεΐνες, που συνήθως αναφέρονται ως μοριακά μοτίβα που σχετίζονται με παθογόνα, γίνονται αισθητά από αρκετές οικογένειες υποδοχέων αναγνώρισης προτύπων (pattern recognition receptors, PRRs), κυρίως υποδοχείς τύπου Toll (Toll-like receptors, TLRs) και υποδοχείς λεκτίνης τύπου C. Μόλις αναγνωριστούν, υποβάλλονται σε επεξεργασία από φαγοκύτταρα και, σύμφωνα με την εξειδίκευση του αντιγόνου, τα T βοηθητικά (T helper, Th) κύτταρα διαφοροποιούνται σε κυτταρικά υποσύνολα, οδηγώντας τελικά στην κάθαρση του παθογόνου [66].

Γενετικές παραλλαγές στους PRRs καθώς και σε μετατροπείς σήματος του ξενιστή θεωρείται ότι επηρεάζουν την αντιμυκητική ανοσολογική απόκριση σε ασθενείς με RVVC. Για παράδειγμα, μια μη συνώνυμη μετάλλαξη στον TLR2 (rs5743704, Pro631His) αναφέρθηκε ότι σχετίζεται με αυξημένη προδιάθεση για RVVC [67]. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι μια μετάλλαξη στο ανθρώπινο γονίδιο CLEC7A σχετίζεται με μειωμένη απόκριση κυτοκίνης και αυξημένη ευαισθησία σε υποτροπιάζουσες λοιμώξεις του βλεννογόνου ή του δέρματος, αλλά όχι στη στοματοφαρυγγική καντιντίαση ή σε συστηματικές καντιντιάζσεις [68].

Η επικοινωνία ανάμεσα στον ξενιστή και το μύκητα είναι πολύπλοκη και οδηγεί είτε σε υπεραντίδραση και υπερευαισθησία σε ορισμένες γυναίκες, είτε σε ελάττωση της εκδήλωσης συμπτωμάτων σε άλλες. Η πλειονότητα των αντιδράσεων αυτών προκαλούνται μέσω ενεργοποίησης φλεγμονωδών οδών. Ένα από τα μονοπάτια αυτά είναι η ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος NLRP3 που έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή ιντερλευκίνης (interleukin, IL)-1β και τη στρατολόγηση πολυμορφοπύρηνων ουδετερόφιλων [69]. Σε πειραματικά μυϊκά μοντέλα VVC, η IL-9 δεν προκαλεί μόνο φλεγμονή προάγοντας τη δράση του NLRP3 στα αρχικά στάδια της νόσου, αλλά συγχρόνως αυξάνει την αντοχή έναντι της μόλυνσης προς τη φάση ανάκτησης μέσω επαγωγής του ανταγωνιστή του υποδοχέα IL-1 [70]. Για την ελαχιστοποίηση αυτής της αντίδρασης, απαιτείται η παραγωγή IL-18 και IL-22 μέσω του άξονα του φλεγμονοσώματος NLR4/IL-1Ra. Πειραματικά μυϊκά μοντέλα με έλλειψη IL-18 παρουσιάζουν αυξημένη ευαισθησία στη VVC. Την ίδια στιγμή, η διέγερση της IL-22 αποδείχτηκε πως μειώνει τα επίπεδα IL-18 λειτουργώντας ως ένας μηχανισμός προστασίας έναντι της VVC [71].

Στην προσπάθεια αποκρυπτογράφησης του μηχανισμού μετάβασης από τον απλό αποικισμό στη συμπτωματική νόσο, μελέτες έδειξαν πως τα επίπεδα έκφρασης του TLR4, του TLR2 και του ηπατώματος A2 που παράγει ερυθροποιητίνη ήταν σημαντικά υψηλότερα στα επιθηλιακά κύτταρα γυναικών αποικισμένων με *C. albicans* ή με VVC συγκριτικά με τα αντίστοιχα υγιών γυναικών. Συγχρόνως, ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων NF-κΒ και c-Fos-p-38 παρουσιάστηκε σε δείγματα που έφεραν ψευδοϋφές/υφές, αλλά όχι σε εκείνα που έφεραν βλαστοκονίδια [72]. Μια άλλη προτεινόμενη οδός αποδόθηκε στην αύξηση της έκφρασης της ανθρώπινης β-ντεφενσίνης-2 (human β-defensin-2, HBD2), που πιστεύεται πως είναι το κύριο αντιμικροβιακό πεπτίδιο της κατώτερης γυναικείας ουρογεννητικής οδού. Τα επίπεδα της HBD2 συσχετίστηκαν σημαντικά με την παρουσία *Candida spp. in vivo*, γεγονός που αποδόθηκε στο ότι η θερμικά εξασθενημένη *C. albicans* μπόρεσε να επάγει την έκφραση του mRNA της δεκτίνης-1 και την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ *in vitro* [73]. Σημειωτέον, ο ρόλος της δεκτίνης-1 στην αναγνώριση των β-γλυκανών και στην εν γένει αντιμυκητική ανοσία έχει μελετηθεί εκτενώς. Ενδεικτικά, η καταστροφή του υποδοχέα σε ένα πειραματικό μυϊκό μοντέλο VVC οδήγησε στην αύξηση του μυκητικού φορτίου και στην ελαττωματική απόκριση των Th1/Th17, υπογραμμίζοντας ότι η αντιμυκητική ανοσία του βλεννογόνου βασίζεται στο γενετικό υπόβαθρο του ξενιστή [74]. Δεδομένου του μη επιβεβαιωμένου προστατευτικού ρόλου των T-κυττάρων στη ρύθμιση της απόκρισης του ξενιστή στη VVC, η ιδέα μιας απορρυθμισμένης έμφυτης ανοσολογικής απόκρισης έχει αποκτήσει βάση τα τελευταία χρόνια [75]. Μία μεγάλη λίστα μελετών στις οποίες διερευνάται η λοιμογόνος δράση της *Candida* σε ανοσολογικό επίπεδο δύναται να προστεθεί σε όσα περιγράφηκαν, ωστόσο οι δύο προαναφερθείσες οδοί είναι το επικρατέστερο, το καλύτερα διερευνημένο και ως εκ τούτου το πιο αξιόπιστο σενάριο. Σε γενικές γραμμές, οι διαθέσιμες πληροφορίες σχετικά με την ανοσολογία της VVC και τη μετάβαση από τον αποικισμό σε συμπτωματική νόσο είναι ασυνεπείς και δύσκολο να μεταφραστούν στην κλινική πράξη.

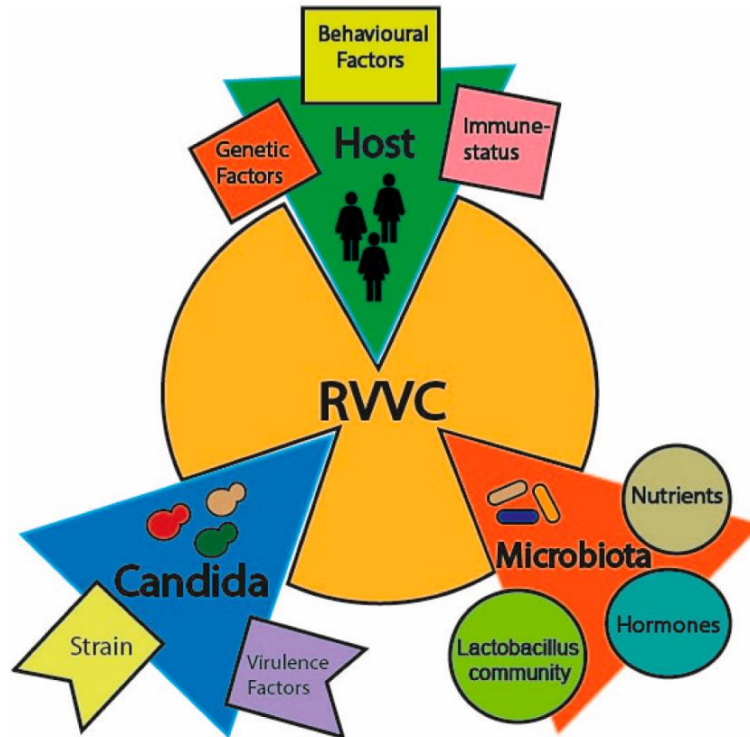


Εικόνα 9. Περιβαλλοντικοί και ανοσολογικοί παράγοντες που συμβάλουν στην υπεραντίδραση του ξενιστή στη διάρκεια της VVC [76].

1.5 Ο ξενιστής

1.5.1 Προδιαθεσικοί παράγοντες για εμφάνιση VVC

Η VVC αποτελεί μια πολυπαραγοντική διαταραχή, η οποία οφείλεται στη διατάραξη της ισορροπίας που προκύπτει από την αλληλεπίδραση μεταξύ του παθογόνου, του πληθυσμού των γαλακτοβακίλλων που αποικίζουν φυσιολογικά το μικροπεριβάλλον του κόλπου και του ξενιστή [76].



Εικόνα 10. Η RVVC ως μια πολυπαραγοντική διαταραχή [76].

Ωστόσο, έχουν περιγραφεί και αρκετοί προδιαθεσικοί παράγοντες που αυξάνουν την πιθανότητα εμφάνισης της νόσου. Οι πρωτογενείς παράγοντες αφορούν το άτομο και σχετίζονται με τη γενετική προδιάθεση και την κληρονομικότητα, ενώ οι δευτερογενείς περιλαμβάνουν παραμέτρους όπως την ηλικία, την επάρκεια του ανοσοποιητικού συστήματος, το κοινωνικοοικονομικό και μορφωτικό επίπεδο, την υγιεινή, τον τρόπο ζωής, τη συμπεριφορά και τις απόψεις/ιδεολογίες. Οι κύριοι δευτερογενείς προδιαθεσικοί παράγοντες της VVC είναι:

1. Εγκυμοσύνη

Η VVC θεωρείται η συνηθέστερη λοίμωξη του κατώτερου γεννητικού συστήματος κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης [77]. Μελέτες επιπολασμού δείχνουν ότι τα *Candida* spp. αποικίζουν τον κόλπο ~20% όλων των υγιών γυναικών, με το ποσοστό αυτό να αυξάνεται στο 30% στη διάρκεια της κύησης [78]. Η αυξημένη αυτή προδιάθεση ενδεχομένως

οφείλεται σε παράγοντες που σχετίζονται με την εγκυμοσύνη, όπως η εξασθένηση της ανοσολογικής άμυνας του οργανισμού, τα αυξημένα επίπεδα οιστρογόνων, το χαμηλό κοιλιακό pH, η μειωμένη κυτταρική ανοσία και η αυξημένη παραγωγή κοιλιακού γλυκογόνου [78]. Παρόλο που η ακριβής παθογένεια της νόσου στη διάρκεια της εγκυμοσύνης δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως, η VVC από *C. albicans* οδήγησε σε μια σειρά από ανεπιθύμητες εκβάσεις εγκυμοσύνης σε ένα ζωικό μοντέλο εγκύων ποντικών, οι οποίες σχετίζονταν με αλλαγές στην έκφραση της IL-15 και στις οδούς σηματοδότησής της [79].

Η συχνότητα εμφάνισης της νόσου κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης είναι υψηλότερη σε ασιατικές και αφρικανικές χώρες, ενώ φαίνεται να σχετίζεται με την περίοδο της κύησης καθώς και την ηλικία, το μορφωτικό υπόβαθρο και το κοινωνικοοικονομικό επίπεδο της γυναίκας [80]. Ο κύριος αιτιολογικός παράγοντας της VVC σε αυτές τις περιπτώσεις είναι η *C. albicans*. Αξίζει να σημειωθεί ότι αν και οι έγκυες γυναίκες εμφανίζουν συχνότερα VVC, είναι λιγότερο συμπτωματικές [81]. Επιπλέον, γυναίκες που είχαν αποικιστεί με *Candida spp.* κατά το δεύτερο τρίμηνο της εγκυμοσύνης εμφάνισαν υψηλότερο κίνδυνο για πρόωρο τοκετό και γέννησαν χαμηλότερου βάρους νεογνά συγκριτικά με εκείνες που είχαν αποικιστεί κατά το πρώτο τρίμηνο [82] [83]. Επομένως, αυτές οι πληροφορίες είναι σημαντικό να λαμβάνονται υπόψη κατά τον προσυμπτωματικό έλεγχο για αποικισμό από *Candida*. Τέλος, υπάρχουν δεδομένα, αν και περιορισμένα, που υποδεικνύουν ότι η VVC στη διάρκεια της εγκυμοσύνης ενδέχεται να σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο επιπλοκών, όπως αυτόματη αποβολή, δυσπλασία του πλακούντα, πρόωρη ρήξη υμένων, πρόωρο τοκετό, χοριοαμνιονίτιδα, ενδομήτρια λοίμωξη, συγγενή βλεννογοδερματική ή συστηματική καντιντίαση και καντινταιμία [78] [77].

2. Επίπεδα οιστρογόνων και θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης

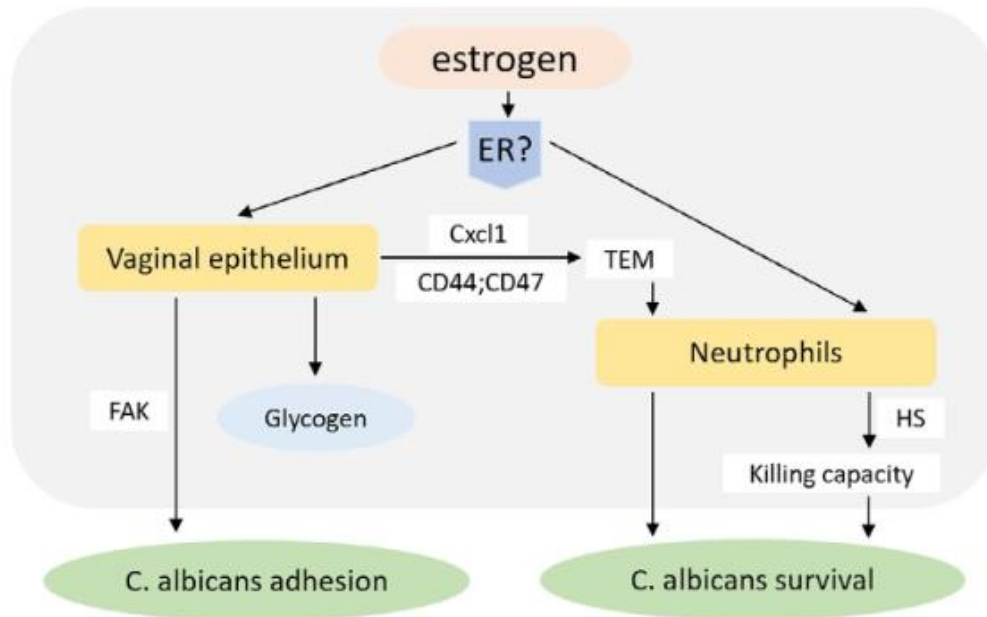
Πολυάριθμες *in vitro* και *in vivo* μελέτες έχουν δείξει ότι τα υψηλά επίπεδα οιστρογόνων επηρεάζουν τον αποικισμό του κόλπου από *C. albicans*, αυξάνοντας έτσι και την πιθανότητα εμφάνισης VVC [84]. Οι κύριοι εκπρόσωποι των γυναικείων φυλετικών ορμονών, τα οιστρογόνα και η προγεστερόνη, εκκρίνονται με έναν κυκλικό ρυθμό κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής ηλικίας. Η διαρκής αυτή διακύμανση των επιπέδων τους

αποτελεί το έναυσμα για μια σειρά από βιολογικές επιδράσεις στον οργανισμό. Για παράδειγμα, οι προαναφερθείσες ορμόνες καταστέλλουν την άμυνα του οργανισμού προκαλώντας μια περίοδο ευπάθειας αμέσως μετά την ωορρηξία προκειμένου να εξασφαλίσουν την επιβίωση του σπέρματος και την επακόλουθη επιτυχή γονιμοποίηση του ωαρίου. Δημιουργείται, λοιπόν, γόνιμο έδαφος για την εισβολή παθογόνων, όπως η *C. albicans*, στο γυναικείο ουρογεννητικό σύστημα, και κατ' επέκταση για την εκδήλωση λοιμώξεων [85].

Όπως προκύπτει από τα παραπάνω, τα περισσότερα περιστατικά VVC λαμβάνουν χώρα κατά την όψιμη ωχρινική φάση λίγο πριν από την έναρξη της έμμηνου ρύσης [86]. Το γεγονός αυτό εξηγεί και τον υψηλότερο επιπολασμό της νόσου σε γυναίκες που βρίσκονται σε αναπαραγωγική ηλικία συγκριτικά με αυτές που βρίσκονται στην προεφηβεία ή την εμμηνόπαυση. Συγκεκριμένα, μια μετεμμηνόπαυσιακή γυναίκα έχει 60% λιγότερες πιθανότητες να εμφανίσει VVC από ότι μια γυναίκα που βρίσκεται σε ηλικία τεκνοποίησης [87]. Την ίδια στιγμή, ένας μεγάλος αριθμός μελετών έχει περιγράψει τον υψηλό κίνδυνο εκδήλωσης της νόσου σε γυναίκες που λαμβάνουν HRT. Γίνεται, λοιπόν, αντιληπτό πως τα υψηλά επίπεδα οιστρογόνων (είτε οφείλονται σε εγκυμοσύνη, είτε σε HRT) σχετίζονται με αυξημένη προδιάθεση για VVC, ενώ τα χαμηλά επίπεδα οιστρογόνων (είτε οφείλονται σε ατροφία ωοθηκών, είτε σε μετεμμηνόπαυση) συνδέονται με χαμηλή προδιάθεση για την εν λόγω λοίμωξη [88].

Παρά τη σαφή επίδραση των οιστρογόνων στην εμφάνιση της νόσου, ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο αυτή συμβαίνει παραμένει ακόμα άγνωστος. Από τη μια, τα οιστρογόνα αυξάνουν τη λοιμογονικότητα της *C. albicans*, ενεργοποιώντας πολλά μονοπάτια που σχετίζονται με τη μορφολογική μετάβασή της από βλαστοκονίδιο σε ψευδοσφύη/σφύη και την αντιμυκητική αντοχή της [89]. Εικάζεται πως η οιστρογόνο-εξαρτώμενη μορφολογική μεταβολή της επιτυγχάνεται μέσω δέσμευσης της πρωτεΐνης Ebr1, η οποία βρίσκεται στην εσωτερική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης του μύκητα, με τον υποδοχέα της 17-β-οιστραδιόλης [90]. Συγχρόνως, τα οιστρογόνα αυξάνουν την αντοχή της στα αντιμυκητικά, ενισχύοντας την έκφραση του γονιδίου CDR1 και τη μεταγραφή της πρωτεΐνης PDR16 [91]. Τα οιστρογόνα ασκούν σημαντική επίδραση τόσο στο κολπικό επιθήλιο όσο και στην ανοσολογική απόκριση του ξενιστή. Στο μεν επιθήλιο του κόλπου αυξάνουν την παραγωγή

του γλυκογόνου και τη μετάπτωση του επιθήλιου μέσω της κινάσης FAK, ενισχύοντας έτσι την προσκόλληση της *C. albicans* [92]. Στη δε κυτταρική ανοσία, επηρεάζουν τη διεπιθηλιακή μετανάστευση των ουδετερόφιλων μειώνοντας την έκφραση των πρωτεϊνών CD44 και CD47 και διαταράσσοντας τη χημειοκίνη Cxcl1, ενώ συγχρόνως η θειική ηπαρίνη εκμηδενίζει τη δραστηριότητα των ουδετερόφιλων [93] [94].



Εικόνα 11. Επίδραση των οιστρογόνων στην παθογένεια της VVC από *C. albicans* [88].

3. Ανοσοκαταστολή

Σε όλες τις περιπτώσεις λοιμώξεων από *Candida*, η ανοσολογική απόκριση του ξενιστή παίζει σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδρασή του με το παθογόνο [95]. Ειδικότερα, στο περιβάλλον του κόλπου, αποτελεσματικοί αμυντικοί μηχανισμοί αποτρέπουν τη μόλυνση από *Candida*, αλλά και επιτρέπουν το μακροπρόθεσμο αποικισμό με αυτή στο πλαίσιο της φυσιολογικής κολπικής μικροχλωρίδας [9]. Συνεπώς, καταστάσεις που οδηγούν σε εξασθένιση του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως η μόλυνση με τον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (human immunodeficiency virus, HIV) η μεταμόσχευση συμπαγών οργάνων και αιμοποιητικών κυττάρων, η λήψη χημειοθεραπείας, η θεραπεία με

γλυκοκορτικοειδή και η νόσηση από καρκίνο, φυματίωση ή οποιαδήποτε άλλη χρόνια εξουθενωτική νόσο, μπορεί να αυξήσουν τις πιθανότητες εμφάνισης της VVC [7] [96]. Επιπλέον, έχει προταθεί πως ορισμένες γυναίκες με RVVC ενδέχεται να έχουν δυσλειτουργία στη φυσιολογική ανοσοαπόκριση, η οποία έχει αποκτηθεί από πρώιμη έκθεσή τους στο παθογόνο [97] [98].

Η πιο καλά μελετημένη ανοσοκατασταλτική κατάσταση που προδιαθέτει για VVC είναι η λοίμωξη από HIV, ενδεχομένως γιατί η ίδια η VVC μπορεί με τη σειρά της να αυξήσει τον κίνδυνο μόλυνσης με τον ιό [99]. Υπολογίζεται ότι έως και το 50-70% των ασθενών με HIV λοίμωξη αναπτύσσει VVC, με τα *non-albicans Candida* spp. να επικρατούν ως αιτιολογικοί παράγοντες [100]. Εντούτοις, μέχρι στιγμής δεν υπάρχουν μελέτες που να υποδεικνύουν ότι οι γυναίκες που έχουν μολυνθεί από HIV και έχουν συνλοίμωξη με VVC έχουν λιγότερες πιθανότητες να ανταποκριθούν επιτυχώς στην αντιμυκητική θεραπεία ή έχουν πιο σοβαρή συμπτωματολογία συγκριτικά με τις αρνητικές στον HIV γυναίκες [101].

Τα γλυκοκορτικοειδή χρησιμοποιούνται αφενός για τη θεραπεία πολλών ασθενειών, όπως διαφόρων αυτοάνοσων νοσημάτων ή του καρκίνου, και αφετέρου για την πρόληψη της απόρριψης μοσχευμάτων. Σε γενικές γραμμές, η χρήση τους καταστέλλει το ανοσοποιητικό σύστημα, αυξάνοντας την ευπάθεια σε μυκητικές λοιμώξεις [102]. Παρόλο που η συχνότητα εμφάνισης της VVC σε γυναίκες που λαμβάνουν θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή παραμένει άγνωστη, έχει αναφερθεί ότι η χρήση τους αυξάνει την επίπτωση άλλων λοιμώξεων από *Candida*, όπως της στοματικής καντιντίασης [103]. Ωστόσο, μια ακόμη ανεπιθύμητη επίδραση της λήψης τους είναι η πρόκληση υπεργλυκαιμίας [102]. Εικάζεται, λοιπόν, πως τα υψηλά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα συμβάλουν στην εκδήλωση VVC σε χρήστες γλυκοκορτικοειδών, όπως συμβαίνει και στις διαβητικές ασθενείς. Επίσης, αρκετά *Candida* spp. διαθέτουν μια πρωτεΐνη που δεσμεύει τα κορτικοστεροειδή συνθέτοντας ένα μυκητικό συνδέτη, ο οποίος ανταγωνίζεται τα κορτικοστεροειδή για τους υποδοχείς τους στα θηλαστικά. Έτσι, η λήψη γλυκοκορτικοειδών ίσως άμεσα επηρεάζει τη λοιμογονικότητα της *Candida* [104].

4. ΣΔ

Πολυάριθμες μελέτες έχουν υποδείξει ότι οι γυναίκες με ΣΔ έχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης VVC (32-68%) συγκριτικά με τις μη διαβητικές (11-23%) [96] [105] [106]. Πιστεύεται πως τα αυξημένα επίπεδα γλυκόζης προδιαθέτουν για VVC εξασθενώντας την άμυνα του ξενιστή και ενισχύοντας την προσκόλληση της *Candida* στον κόλπο [104]. Σημειωτέον, τα ουδετερόφιλα των διαβητικών ατόμων δρουν λιγότερο αποτελεσματικά έναντι της *C. albicans* σε σχέση με αυτά των υγιών ανθρώπων [107], καθώς το υπεργλυκαιμικό περιβάλλον αναστέλλει διάφορες λειτουργίες τους, όπως τη φαγοκυττάρωση, τη χημειοταξία, την προσκόλληση και τον ενδοκυττάριο θάνατο. Επιπλέον, ο τύπος του ΣΔ φαίνεται να παίζει ρόλο στο *Candida* spp. που αποικίζει τον κόλπο διαβητικών γυναικών, με την πλειονότητα των γυναικών με ΣΔ τύπου 1 και τύπου 2 να είναι κολπικά αποικισμένες κυρίως με *C. albicans* (56%) και *C. glabrata* (54%), αντίστοιχα [108]. Η VVC σε διαβητικές γυναίκες οφείλεται κυρίως σε non-*albicans Candida* spp. (50-61% *C. glabrata* έναντι 29-36% *C. albicans*) [106] [109]. Η αυξημένη επικράτηση των non-*albicans Candida* spp. σε αυτήν την κατηγορία ασθενών ενδέχεται να έχει σημαντικές επιπτώσεις στη θεραπεία της λοίμωξης, καθώς τα είδη αυτά είναι εγγενώς λιγότερο ευαίσθητα στους ευρέως χρησιμοποιούμενους αντιμυκητικούς παράγοντες. Πράγματι, το 45% των γυναικών με ΣΔ είχαν λοίμωξη από ανθεκτική στη φλουκοναζόλη *C. albicans*, ενώ το 81% των διαβητικών ασθενών με VVC από *C. glabrata* συνέχισε να έχει καλλιέργεια θετική για το εν λόγω παθογόνο μετά το πέρας της θεραπείας με φλουκοναζόλη [105].

5. Λήψη αντιβιοτικών

Η διερεύνηση της χρήσης αντιβιοτικών ως παράμετρο κινδύνου για VVC έχει εγείρει ιδιαίτερα το ενδιαφέρον της ιατρικής κοινότητας, αλλά ταυτόχρονα και τον προβληματισμό της, εξαιτίας της διαδεδομένης κατανάλωσής τους από γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας για την αντιμετώπιση ποικίλων παθήσεων [110]. Από τη μια πλευρά, αρκετές μελέτες επιβεβαιώνουν ότι η λήψη αντιβιοτικών προάγει την εμφάνιση VVC [111] [112] [113], γνωστής ως «μετα-αντιβιοτική αιδοιοκολπίτιδα από *Candida*» (post-antibiotic *Candida* vulvovaginitis) [114]. Συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί πως το 28-33% των γυναικών που

λαμβάνουν αντιβιοτική θεραπεία αναπτύσσουν συμπτωματική VVC [114]. Τα αντιβιοτικά διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην παθογένεια της VVC, καθώς εκτός από τα παθογόνα βακτήρια καταστρέφουν και τη φυσιολογική βακτηριακή χλωρίδα του κόλπου, δηλαδή τους γαλακτοβακίλλους που λειτουργούν ως προστατευτικός φραγμός. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, ευνοείται η υπερανάπτυξη των μυκήτων στην περιοχή. Μάλιστα, τα αντιβιοτικά που αναστέλλουν τα υποχρεωτικά αναερόβια βακτήρια, όπως η κεφτριαξόνη, η κλινδαμυκίνη, η μετρονιδαζόλη, η πιπερακιλλίνη και η ταζομπακτάμη, φαίνεται να προωθούν έναν επίμονο και υψηλού φορτίου αποικισμό από *Candida* spp. [115]. Την ίδια στιγμή, η μη φυσιολογική, διαταραγμένη βακτηριακή χλωρίδα αποτελεί προδιαθεσικό παράγοντα για RVVC μόνο όταν η ασθενής έχει λάβει πρόσφατα ή λαμβάνει κατά την εκδήλωση της λοίμωξης αντιβιοτικά [116] [117].

Στον αντίποδα, άλλοι ερευνητές αρνούνται τη συσχέτιση της νόσου με τη λήψη αντιβιοτικών, υποστηρίζοντας πως ο κίνδυνος επανεμφάνισης ή υποτροπής της δε σχετίζεται με τη σύνθεση των κολπικών βακτηριακών κοινοτήτων. Η άποψη τους, μάλιστα, ενισχύεται από στοιχεία που δείχνουν πως οι κολπικές εκκρίσεις ασθενών με VVC δεν περιείχαν μειωμένες αναλογίες γαλακτοβακίλλων συγκριτικά με τις αντίστοιχες υγιών γυναικών [117] [118]. Συγχρόνως, μελέτες υποδεικνύουν πως οι ασθενείς που ανέπτυξαν VVC κατόπιν χρήσης αντιβιοτικών είχαν ήδη αποικιστεί στον κόλπο τους από *Candida* [114].

Προς το παρόν, το επικρατέστερο σενάριο είναι πως μόνο ένα μικρό φάσμα αντιβιοτικών σχετίζεται με αυξημένη πιθανότητα κολπικού αποικισμού από *Candida* και με επακόλουθη αυξημένη συχνότητα εμφάνισης συμπτωματικής VVC, είτε ως πρώτο επεισόδιο είτε ως υποτροπή, με υψηλότερο κίνδυνο εκδήλωσης της νόσου τον πρώτο μήνα μετά το πέρας της λήψης αντιβιοτικής θεραπείας [112]. Ωστόσο, πρέπει σε κάθε περίπτωση να επισημανθεί πως η πλειονότητα των γυναικών που λαμβάνουν αντιβιοτικά δεν εμφανίζουν VVC και πως οι περισσότερες ασθενείς με VVC δεν έχουν λάβει προηγουμένως αντιβιοτική αγωγή [110]. Ως εκ τούτου, γίνεται αντιληπτό πως υπάρχει ανάγκη για υψηλής ποιότητας, καλά σχεδιασμένες κλινικές μελέτες προκειμένου να διερευνηθεί με ακρίβεια η συσχέτιση ανάμεσα στη χρήση αντιβιοτικών και στην εκδήλωση της νόσου.

6. Διαταραχή της κολπικής μικροχλωρίδας

Η VVC συναντάται συχνά σε άτομα με φυσιολογικό κολπικό μικροβίωμα, ωστόσο σε γυναίκες με λοίμωξη έχει αναφερθεί χαμηλότερος αριθμός γαλακτοβακίλλων συγκριτικά με τις υγιείς [119]. Η ποικιλομορφία της μικροχλωρίδας του κόλπου φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της νόσου. Ορισμένοι γαλακτοβάκιλλοι εμφανίζουν δραστικότητα έναντι των *Candida* spp., με χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτό του *Lactobacillus rhamnosus* [120]. Η κολπική χορήγηση μικοναζόλης για 3 ημέρες και η επακόλουθη κολπική χορήγηση *L. rhamnosus*, δύο φορές την ημέρα για 1 εβδομάδα, φάνηκε να μειώνει σημαντικά την πιθανότητα υποτροπής (45% στη συνδυαστική θεραπεία έναντι 89% στη μονοθεραπεία μικοναζόλης) 6 μήνες μετά το πέρας της θεραπείας [121]. Η προστατευτική δράση των γαλακτοβακίλλων οφείλεται κυρίως στην ικανότητά τους να προσκολλώνται στα κολπικά επιθηλιακά κύτταρα, αναστέλλοντας την ανάπτυξη των παθογόνων μικροοργανισμών. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούν διάφορους μηχανισμούς, συμπεριλαμβανομένης της ανοσοτροποποίησης, της παραγωγής αντιμικροβιακών ουσιών, όπως υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), οργανικά οξέα και βακτηριοσίνες και της αναστολής της προσκόλλησης των μικροβίων στους υποδοχείς των επιθηλιακών κυττάρων [122].

7. Συνλοίωση με βακτήρια

Πολλαπλοί μηχανισμοί συμβάλουν στο σχηματισμό μεικτών βιοϋμενίων, τα οποία κυριαρχούνται κατά κανόνα από την παρουσία βακτηρίων και μυκήτων ενσωματωμένων σε μια κοινή εξωκυττάρια μήτρα [123]. Η αυξημένη αντοχή των δομών αυτών σε διάφορους αντιμικροβιακούς παράγοντες, καθώς και η ικανότητά τους να διαφεύγουν της ανοσολογικής απόκρισης του ξενιστή, τις καθιστούν ύψιστης κλινικής σημασίας [124]. Τα βακτήρια και οι μύκητες μπορούν να συνυπάρχουν σε έναν ξενιστή και να αλληλεπιδρούν μέσω συνεργικών ή ανταγωνιστικών σχέσεων [125]. Η ύπαρξη ανταγωνιστικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των διαφορετικών ειδών μικροβίων είναι συχνή στο κατώτερο γυναικείο ουρογεννητικό σύστημα, με χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτό των προβιοτικών [124].

Οι γνώσεις σχετικά με τους μηχανισμούς που οδηγούν σε κολπική συνλοίμωξη από βακτήρια και μύκητες είναι περιορισμένες, και επομένως η δομή και η σύνθεση των μεικτών βιοϋμενίων παρέχουν στοιχεία για την κατανόηση της παθοφυσιολογίας της. Έτσι, ορισμένες συνεργικές αλληλεπιδράσεις οδηγούν σε πολύπλοκες παθογόνες διεργασίες, παρέχοντας προστασία σε ένα ή και στα δύο είδη μικροβίων των μεικτών βιοϋμενίων. Είναι πιο πιθανό η συνέργεια αυτή να παρουσιαστεί μεταξύ των παθογόνων. Προκειμένου να συμβεί αυτό, κύτταρα ορισμένων ειδών συνδέονται απευθείας με κύτταρα άλλων ειδών. Έτσι, ο *Staphylococcus aureus* μπορεί να ενισχύσει τη μορφολογική μετάβαση της *C. albicans* από βλαστοκονίδιο σε ψευδοϋφή/υφή, ώστε να διεισδύσει σε εν τω βάθει ιστούς και να εκδηλώσει την παθογόνο δράση της [126]. Επίσης, η παρουσία βιοϋμενίων *C. albicans* επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό αναερόβιων βακτηρίων σε ένα κατά τα άλλα εχθρικό, πλούσιο σε οξυγόνο περιβάλλον. Μάλιστα, τα ίδια τα βακτήρια φαίνεται να προκαλούν το σχηματισμό αυτών των προστατευτικών δομών [127]. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν πως η προστατευτική αλληλεπίδραση μεταξύ των διαφορετικών ειδών μικροβίων συνδέεται με αυξημένη αντοχή σε αντιμικροβιακούς παράγοντες. Όταν στελέχη *C. albicans* και *S. aureus* ανθεκτικά στη μεθικυλλίνη αναπτύχθηκαν μαζί, η παρουσία του μύκητα φάνηκε να προστατεύει το *S. aureus* από τη βακτηριοκτόνο δράση της βανκομυκίνης [128]. Επιπλέον, οι συνεργικές αλληλεπιδράσεις μπορούν να αυξήσουν τη λοιμογονικότητα των μικροοργανισμών [129]. Για παράδειγμα, η συγχορήγηση *S. aureus* και *C. albicans* σε υποθανατηφόρες δόσεις σε ένα πειραματικό μυϊκό μοντέλο περιτονίτιδας οδήγησε σε υψηλότερη θνητότητα από ότι όταν κάποιο από τα δυο παθογόνα χορηγήθηκε μόνο του [130]. Μολονότι αντίστοιχες αλληλεπιδράσεις δεν αξιολογήθηκαν στην κατώτερη γυναικεία ουρογεννητική οδό, οι παρατηρήσεις που προέκυψαν απεικονίζουν τη δυναμική φύση των πολυμικροβιακών αλληλεπιδράσεων έως ένα βαθμό [124].

Η παρουσία διαφορετικών μικροοργανισμών ενεργοποιούν το ανοσοποιητικό σύστημα με ποικίλους τρόπους. Η απόκριση του ξενιστή σε έναν συγκεκριμένο είδος μικροβίου ενδέχεται να προάγει τον πολλαπλασιασμό ενός άλλου είδους. Για παράδειγμα, η παρουσία *Streptococcus agalactiae* μειώνει σημαντικά την ικανότητα της *C. albicans* να σχηματίζει ψευδοϋφές *in vitro*, αλλά μπορεί επίσης να μειώσει την ανοσία του βλεννογόνου του κόλπου και να συμβάλει στον αποικισμό από *C. albicans in vivo* [131]. Ομοίως, έχει

αναφερθεί πως η *C. albicans* είναι σε θέση να καταστέλλει την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή, επιτρέποντας στην *Pseudomonas aeruginosa* να πολλαπλασιαστεί και να προκαλέσει λοίμωξη [132].

Ως εκ τούτου, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ βακτηρίων και μυκήτων είναι εξαιρετικά περίπλοκες και ο τύπος τους εξαρτάται από μια σειρά περιβαλλοντικών, μικροβιολογικών και βιολογικών παραγόντων που αφορούν τον ξενιστή. Μέχρι στιγμής, οι μηχανισμοί που οδηγούν στην εκδήλωση μεικτής κολπίτιδας παραμένουν σε μεγάλο βαθμό άγνωστοι και απαιτούν περαιτέρω διερεύνηση [124].

8. Χρήση αντισυλληπτικών

Η από του στόματος λήψη αντισυλληπτικών χαπιών (oral contraceptive pills, OCPs) έχει προταθεί ως παράγοντας κινδύνου για VVC, ωστόσο τα διαθέσιμα επιδημιολογικά δεδομένα είναι περιορισμένα και αντιφατικά [7]. Τα OCPs διατηρούν σταθερά χαμηλά τα επίπεδα των οιστρογόνων και της προγεστερόνης προκαλώντας ανωορρηξία. Φαίνεται ότι οι ορμονικές επιδράσεις που συμβάλουν στην εμφάνιση της νόσου κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, είναι παρόμοιες σε γυναίκες που λαμβάνουν OCPs, ιδιαίτερα όταν αυτά περιέχουν υψηλή δόση ορμονών [133]. Η χρήση OCPs μπορεί να αυξήσει το κολπικό γλυκογόνο, και κατ' επέκταση τη διαθεσιμότητα υδατανθράκων, οι οποίοι αποτελούν θρεπτικά συστατικά για τα *Candida* spp. Επιπλέον, τα OCPs ενισχύουν τόσο την προσκόλληση της *Candida* στο κολπικό επιθήλιο όσο και τη μορφολογική μετάβασή της από βλαστοκονίδιο σε ψευδοϋφή/υφή [134]. Τέλος, η λήψη OCPs ενδέχεται να επηρεάσει τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, προκαλώντας ανοσοκαταστολή (χαμηλά επίπεδα ανοσοσφαιρινών και λακτοφερρίνης) και μειωμένη αντίσταση του οργανισμού σε λοιμώξεις [7].

9. Χρήση σπερματοκτόνων και προφυλακτικών

Επιδημιολογικά δεδομένα υποδεικνύουν υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης της VVC σε γυναίκες που ανέφεραν χρήση προφυλακτικού (44% έναντι 38% σε περιπτώσεις μη

χρήσης) [135] ή σπερματοκτόνου (46% έναντι 14% σε περιπτώσεις μη εφαρμογής) [136] κατά τη διάρκεια των σεξουαλικών επαφών τους. Επιπλέον, υπάρχουν αναφορές για πιο αυξημένη χρήση τους από ασθενείς με RVVC (21% έναντι 10% σε υγιείς γυναίκες) [137] και από γυναίκες που έχουν αποικιστεί με *Candida* (11% έναντι 5% σε μη αποικισμένες) [138]. Ενδεχομένως, η προδιάθεση για VVC οφείλεται στη νονοξυνόλη-9 (nonoxonyl-9, N-9), μια σπερματοκτόνο ουσία που αποτελεί το δραστικό συστατικό πολλών σπερματοκτόνων σκευασμάτων και προφυλακτικών [139]. Η N-9 είναι ένα μη ιονικό απορρυπαντικό που ακινητοποιεί το σπέρμα και δρα διαταράσσοντας την κυτταρική μεμβράνη του [140]. Συγχρόνως, όμως, διαταράσσει την οικολογική ισορροπία της μικροχλωρίδας του κόλπου μέσω της αναστολής της δράσης των γαλακτοβακίλλων, οι οποίοι αντιπροσωπεύουν τον κυρίαρχο αμυντικό μηχανισμό της περιοχής έναντι των *Candida* spp. [141]. Επιπλέον, η N-9 προκαλεί διαταραχή του κολπικού επιθηλίου, οδηγώντας σε ερεθισμό των γεννητικών οργάνων [142]. Τέλος, έχει αναφερθεί ότι τα *Candida* spp. μπορούν να μεταβολίζουν τη N-9, γεγονός που έχει σαν αποτέλεσμα την αλλοίωση των χαρακτηριστικών επιφανείας του κολπικού βλεννογόνου και κατ' επέκταση την αύξηση της προσκολλητικής ικανότητας των ζυμομυκήτων στους ιστούς του ξενιστή [139].

10. Χρήση ενδομήτριων συσκευών

Η χρήση ενδομήτριων συσκευών (intrauterine devices, IUDs) είναι μια εξαιρετικά αποτελεσματική, οικονομική και ασφαλής μέθοδος αντισύλληψης [143]. Αποτελεί έναν πολύ δημοφιλή τρόπο πρόληψης της εγκυμοσύνης παγκοσμίως και την προτιμώμενη μέθοδος αντισύλληψης για τις γυναίκες των αναπτυσσόμενων χωρών [144]. Οι IUDs είναι διαθέσιμες σε διάφορα μεγέθη και σχήματα, ενώ παρασκευάζονται από μια ποικιλία υλικών που κυμαίνονται από χαλκό έως και όλα τα είδη πλαστικών. Η τοποθέτηση μιας IUD αναγνωρίζεται από τον οργανισμό σαν ξένο σώμα και προκαλεί φλεγμονώδη αντίδραση, με συνέπεια την πρόκληση κυτταρικών/βιοχημικών αλλοιώσεων στον ενδομήτριο βλεννογόνο και την τραχηλική βλέννα, οι οποίες με τη σειρά τους οδηγούν σε αντισυλληπτικά αποτελέσματα. IUDs που εκκρίνουν διαρκώς μικρές ποσότητες ορμονών στη μήτρα είναι επίσης διαθέσιμες [145]. Ωστόσο, παρά την αποτελεσματικότητά τους ως μέθοδος

αντισύλληψης, οι IUDs αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης μικροβιακών λοιμώξεων, συμπεριλαμβανομένης της VVC [145]. Αρκετές μελέτες αναφέρουν πιο συχνή χρήση IUDs σε ασθενείς με VVC (13-44%) και RVVC (28-71%) συγκριτικά με τις υγιείς γυναίκες (3-38%) [111] [137] [146]. Η συσχέτιση αυτή οφείλεται στην προσκόλληση της *Candida* και στο σχηματισμό βιοϋμενίων σε όλη την επιφάνεια της IUD, που όχι μόνο προστατεύουν το παθογόνο από τη δράση των αντιμυκητικών συνδράμοντας στην ανάπτυξη ανοχής, αλλά συγχρόνως αποτελούν πηγή επαναμόλυνσης [147]. Εκτός, όμως, από το να λειτουργούν ως δεξαμενή μικροβίων, οι IUDs ενδεχομένως να επηρεάσουν την τραχηλική και την κολπική μικροχλωρίδα μειώνοντας τα επίπεδα των γαλακτοβακίλλων που δρουν ως προστατευτικός μικροβιολογικός φραγμός [148]. Ως εκ τούτου, συνιστώνται η περιορισμένη χρονικά χρήση των IUDs, ο τακτικός έλεγχος για πιθανές λοιμώξεις κατά τη διάρκεια της χρήσης τους με σκοπό την πρόληψη σοβαρών επιπλοκών και η αφαίρεσή τους από γυναίκες με RVVC για την αποφυγή υποτροπών [147] [148].

11. Κακή προσωπική υγιεινή και σεξουαλικές πρακτικές

Η πλήθυνση του αριθμού των βλαστοκονιδίων της *Candida* στο κολπικό περιβάλλον πυροδοτεί επιθηλιακή εισβολή, συμβάλλοντας πιθανώς στην ανάπτυξη VVC. Έτσι, παράγοντες που μπορούν να πυροδοτήσουν την αύξηση του φορτίου των βλαστοκονιδίων στην περιοχή, όπως για παράδειγμα η φτωχή προσωπική υγιεινή, έχουν προταθεί ως προδιαθεσικοί για εμφάνιση VVC. Ωστόσο, η εν λόγω αύξηση δύναται να οφείλεται και σε εξωγενή μόλυνση από *Candida* μέσω ορισμένων σεξουαλικών πρακτικών, συμπεριλαμβανομένων των συχνών σεξουαλικών επαφών καθώς και της στοματογεννητικής επαφής. Οι συγκεκριμένες σεξουαλικές συμπεριφορές ενδεχομένως να είναι σημαντικές όχι μόνο για πρωτοπαθή λοίμωξη, αλλά και για επαναλαμβανόμενα επεισόδια VVC [7]. Παρά το γεγονός ότι η VVC δε θεωρείται σεξουαλικά μεταδιδόμενο νόσημα (ΣΜΝ) καθώς εκδηλώνεται και σε μη σεξουαλικά ενεργές γυναίκες, ορισμένες μελέτες έχουν υποδείξει τη σεξουαλική μετάδοση της *Candida* [149]. Μάλιστα, η μετάδοση αυτή μπορεί να ευνοηθεί από την έκθεση σε πολυάριθμα αντισώματα, αντιγόνα και κυτοκίνες που ανευρίσκονται στο

σπερματικό υγρό και ενδέχεται να επηρεάσουν την ανοσολογική απόκριση των γυναικών [150].

12. Ποιότητα και εφαρμογή ενδυμάτων

Η χρήση συνθετικών εσωρούχων ή/και στενών ή ανεπαρκώς αεριζόμενων ρούχων έχει προταθεί ως πιθανός παράγοντας που προδιαθέτει για VVC. Η συσχέτιση αυτή έχει αποδοθεί στα αυξημένα επίπεδα περινεϊκής θερμοκρασίας και υγρασίας που προκαλούν τα εν λόγω ενδύματα, τα οποία ενδεχομένως συμβάλουν στον πολλαπλασιασμό του παθογόνου [151]. Επίσης, έχει αναφερθεί ότι η χρήση συνθετικών εσωρούχων δύναται να εγείρει τοπικές αλλεργικές αντιδράσεις και αντιδράσεις υπερευαισθησίας, οι οποίες αλλοιώνουν το κολπικό επιθήλιο, υποβοηθώντας την εισβολή της *Candida* στους ιστούς του ξενιστή [7]. Άλλες πρακτικές γυναικείας υγιεινής που μπορούν να πυροδοτήσουν τέτοιες αντιδράσεις περιλαμβάνουν τη χρήση σερβιετών και τις κολπικές πλύσεις [152].

1.5.2 Ιδιοπαθής VVC

Η επιστημονική κοινότητα στην προσπάθεια της να ερευνήσει τα αίτια εμφάνισης της VVC σε γυναίκες που δεν έχουν κάποιον γνωστό προδιαθεσικό παράγοντα, έχει στρέψει το ενδιαφέρον στην πιθανή συσχέτιση της νόσου με γενετικούς παράγοντες. Πράγματι, οι αφροαμερικανές γυναίκες εμφανίζουν συχνότερα VVC και είναι πιο πιθανό να είναι κολπικά αποικισμένες με *Candida spp.* συγκριτικά με τις λευκές γυναίκες. Επιπροσθέτως, η παραγωγή H_2O_2 στον κόλπο από τον πληθυσμό των γαλακτοβακίλλων είναι μειωμένη στα άτομα της μαύρης φυλής [153] [154]. Επομένως, η γενετική προδιάθεση έχει προταθεί ως παράγοντας κινδύνου για VVC σε μαύρες γυναίκες. Επιπλέον, ένας πολυμορφισμός στα αντιγόνα της ομάδας αίματος Lewis, ο οποίος οδηγεί στην ομάδα αίματος ABO-Lewis μη εκκριτικός φαινότυπος, ανιχνεύεται με αυξημένη συχνότητα σε γυναίκες με RVVC [155].

Γενετικοί πολυμορφισμοί στα γονίδια της έμφυτης ανοσίας έχουν επίσης συσχετιστεί με αυξημένη ευαισθησία στη νόσο και ιδιαίτερα στη χρόνια μορφή της, συμπεριλαμβανομένων πολυμορφισμών στο κωδικόνιο λήξης της δεκτίνης-1, στο γονίδιο

της λεκτίνης που συνδέεται με τη μαννόζη (mannose-binding lectin, MBL), στο γονίδιο της IL-4 και στο γονίδιο του NLRP3 [156]. Η δεκτίνη-1 είναι ένας υποδοχέας λεκτίνης τύπου C που εκφράζεται στην κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων της έμφυτης ανοσίας και δρα ενισχύοντας την επαγόμενη από τους TLRs παραγωγή κυτοκινών, όπως IL-17, IL-6 και IL-10. Η παρουσία μεταλλάξεων σε ένα πρώιμο κωδικόνιο λήξης του γονιδίου της έχει ως αποτέλεσμα τη μη αναγνώριση των β-γλυκανών και την εξασθενημένη απόκριση κυτοκινών, ιδίως της προφλεγμονώδους IL-17 [157]. Τέτοιες μεταλλάξεις περιγράφηκαν σε τέσσερα μέλη μιας οικογένειας, τα οποία έπασχαν από RVVC ή/και ονυχομυκητίαση [158]. Επίσης, η MBL είναι πρωτεΐνη που δρα δεσμεύοντας ισχυρά υπολείμματα μαννόζης και N-ακετυλ-γλυκοζαμίνης στην επιφάνεια των μυκήτων *Candida*, ενεργοποιώντας το συμπλήρωμα και προωθώντας την οψωνοποίηση [159]. Μειωμένα επίπεδα της ή αυξημένη εμφάνιση γενετικών πολυμορφισμών στο γονίδιο της έχουν αναφερθεί σε ασθενείς με RVVC [160] [161]. Επιπλέον, η IL-4 αναστέλλει την αντι-*Candida* δραστηριότητα του μονοξειδίου του αζώτου (NO) που αποτελεί σημαντικό τελεστικό μόριο στην έμφυτη ανοσολογική απόκριση [162]. Μάλιστα, έχουν βρεθεί υψηλότερες συγκεντρώσεις IL-4 και χαμηλότερα επίπεδα NO στον κόλπο ασθενών με RVVC συγκριτικά με υγιείς γυναίκες. Ένας πολυμορφισμός στο γονίδιο της IL-4, ο οποίος οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή της από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού, έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση RVVC [156]. Τέλος, πολυμορφισμοί στο γονίδιο του NLRP3 ενδεχομένως να σχετίζονται με την εκδήλωση RVVC [163].

1.6 Συμπτωματολογία της VVC

Οι μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες παρουσιάζουν συνήθως καντιντίαση που προσβάλλει τη βουβωνική χώρα και το αιδοίο, ενώ οι προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες προσβάλλονται συχνά στον προθάλαμο του κόλπου και στο αιδοίο. Δεν υφίσταται τραχηλίτιδα με αιτιολογικό παράγοντα την *Candida*. Σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, τα συμπτώματα εμφανίζονται συνήθως πριν από την έμμηνο ρύση καθώς ο επαγόμενος από τα οιστρογόνα κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η επαγόμενη από την προγεστερόνη κυτταρόλυση απελευθερώνουν γλυκογόνο, το οποίο μπορεί να μεταβολιστεί από τους

γαλακτοβάκιλλους με αποτέλεσμα να αυξάνονται τα επίπεδα γλυκόζης στους ιστούς [164] [22].

Τα συμπτώματα της VVC σχετίζονται με την παρουσία μεταλλοπρωτεϊνικών εξωκυτταρικής θεμέλιας ουσίας (matrix metalloproteinase, MMP) ειδικότερα της μεταλλοπρωτεϊνάσης μήτρας-8 (MMP-8). Οι MMPs είναι εξαρτώμενες από ψευδάργυρο ενδοπεπτιδάσες που ανακαλύφθηκαν για πρώτη φορά ως πρωτεάσες, οι οποίες στοχεύουν και διασπούν εξωκυτταρικές πρωτεΐνες. Πρόσφατα, βρέθηκε ότι αυξημένα επίπεδα MMP-8, ειδικά σε ενεργοποιημένη/ενεργό μορφή (aMMP-8), στα βιολογικά υγρά αντανακλούν φλεγμονή/ασθένεια, κυρίως σε κλινικά ενεργές φάσεις [165].

Από κλινικής άποψης, συνιστάται η διάκριση μεταξύ επιπλεγμένης και μη VVC [9]. Στο ~90% των ασθενών, ο κνησμός στο αιδοίο ή/και στον κόλπο είναι το κυρίαρχο σύμπτωμα της λοίμωξης. Ωστόσο, μόλις το 35-40% των γυναικών που αναφέρουν κνησμό διαγιγνώσκονται τελικά με VVC. Η σύσταση των κολπικών εκκρίσεων μπορεί να ποικίλλει από λεπτόρρευστη (συνήθως στην έναρξη της οξείας VVC) έως πιο παχύρρευστη, ενώ δεν αποκλείεται η απουσία έκκρισης κολπικού υγρού σε ορισμένες περιπτώσεις RVVC. Σε αντίθεση με τη βακτηριακή κολπίτιδα, οι κολπικές εκκρίσεις γυναικών με VVC συνήθως δεν έχουν δυσάρεστη οσμή, αλλά χαρακτηρίζονται από υπόλευκη, γεμάτη σβώλους σύσταση [166]. Επιπροσθέτως, η πλειοψηφία των ασθενών με VVC παρουσιάζει ερυθρότητα του κόλπου ή/και της περιοχής των έξω γεννητικών οργάνων. Ωστόσο, τα συμπτώματα από μόνα τους δεν είναι δυνατό να καθορίσουν με αξιοπιστία τον αιτιολογικό παράγοντα μιας κολπίτιδας, καθώς ο κνησμός και η ερυθρότητα δεν αναφέρονται αποκλειστικά ή πάντα από γυναίκες με VVC [166]. Ασθενείς με VVC παραπονιούνται επίσης συχνά για πόνο, αίσθημα καύσου, δυσπαρευνία και δυσουρία [12]. Τα μικρά χείλη του αιδοίου μπορεί να είναι οίδηματώδη με σημάδια ραγάδων που προκαλούν αίσθημα καύσου, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις RVVC. Από δερματολογικής άποψης, η καντιντίαση του αιδοίου μπορεί να είναι φυσαλιδώδης, εκζεματώδης ή θυλακοειδής [22]. Οι VVC από *C. krusei* [36] και από *C. parapsilosis* [33] χαρακτηρίζονται συνήθως από πιο ήπια κλινικά συμπτώματα συγκριτικά με αυτά της *C. albicans*. Οι λοιμώξεις από *S. cerevisiae* δεν έχουν συνδεθεί με την εκδήλωση συμπτωμάτων [46].



Εικόνα 12. Έξω γεννητικά όργανα ασθενούς με VVC, όπου διακρίνονται το χαρακτηριστικό λευκωπό και γεμάτο σβώλους κολπικό έκκριμα, τα οιδηματώδη χείλη και η ερυθρότητα της περιοχής [167].

Τα συμπτώματα της VVC, κυρίως σε περιπτώσεις RVVC, έχουν ως αποτέλεσμα την υποβάθμιση της ποιότητας ζωής των ασθενών, όπως υπολογίζεται με βάση καθιερωμένα κριτήρια αξιολόγησης. Αυτή η υποβάθμιση είναι συγκρίσιμη με εκείνη που βιώνουν ασθενείς με άλλες χρόνιες νόσους και σχετίζεται με σημαντικά μειωμένη παραγωγικότητα στην καθημερινή εργασία και την προσωπική ζωή των νοσούντων γυναικών [168].

1.7 Εργαστηριακή διάγνωση της VVC

Η διάγνωση της VVC αποτελεί κομβικό σημείο για την επιλογή της ενδεδειγμένης θεραπείας. Παρόλο που η κλινική εικόνα της ασθενούς είναι το έναυσμα για την αναζήτηση του παθογόνου, η αυτοδιάγνωση φαίνεται να μην οδηγεί σε επιτυχημένη θεραπεία για τα 2/3 των γυναικών που την επιχειρούν, ακόμα και αν είχαν παρουσιάσει προηγούμενα

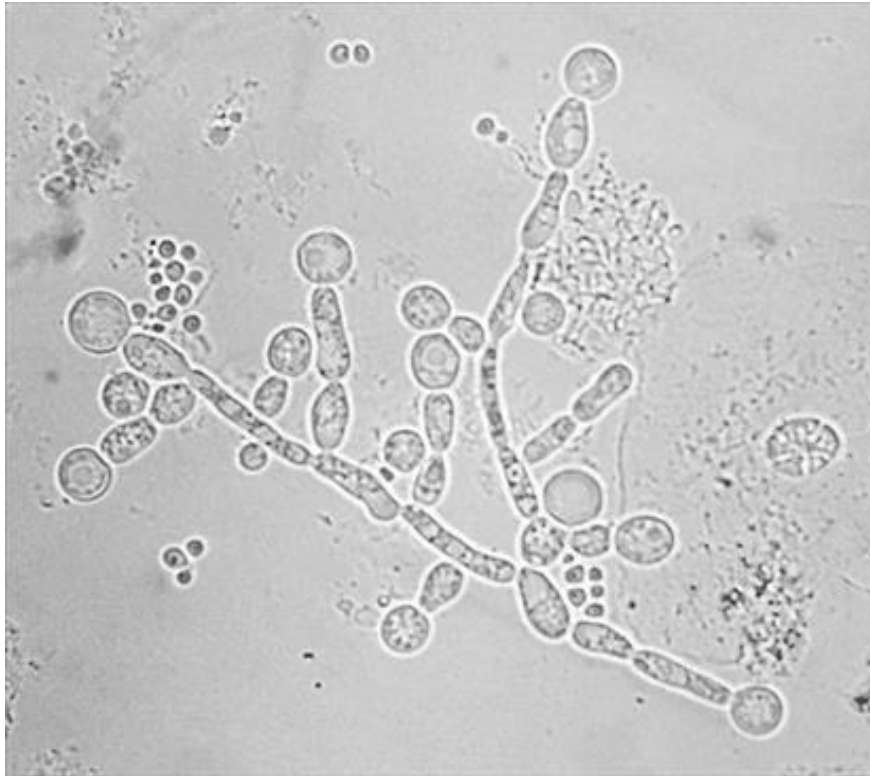
επεισόδια. [169]. Όπως προαναφέρθηκε, τα συμπτώματα της VVC είναι σε μεγάλο βαθμό μη ειδικά και ως εκ τούτου απαιτείται εργαστηριακή διερεύνησή της. Η ταυτοποίηση του *Candida* spp. παρέχει τις πρώτες πληροφορίες για το σχεδιασμό του κατάλληλου θεραπευτικού σχήματος. Σκοπός της διάγνωσης είναι η ταχεία αξιολόγηση της κλινικής κατάστασης της ασθενούς, ο εντοπισμός του παθογόνου και η εφαρμογή της θεραπείας που θα εξαλείψει τα συμπτώματα και θα αποτρέψει μελλοντικά και επαναλαμβανόμενα επεισόδια VVC.

Η οξεία VVC ορίζεται από σημεία και συμπτώματα φλεγμονής, την παρουσία *Candida* spp. στον κόλπο και την απουσία άλλων λοιμωδών αιτιολογικών παραγόντων, με εξαίρεση τις περιπτώσεις συνλοίμωξης. Αν και η συμπτωματολογία της νόσου προσομειώνει εκείνη άλλων παθήσεων της ουρογεννητικής οδού, συχνά αποτελεί την αφορμή για αναζήτηση ιατρικής βοήθειας. Η λανθασμένη διάγνωση λόγω της υπερεκτίμησης ή της υποτίμησης της κλινικής εικόνας της ασθενούς δύναται να επιφέρει σημαντικές ψυχοκοινωνικές επιπτώσεις και οικονομικές επιβαρύνσεις. Ενδεικτικά, μελέτη στην οποία συμμετείχαν 535 γυναίκες με ενοχλήσεις στην αιδοιοκολπική περιοχή υπέδειξε ότι η ευαισθησία και η ειδικότητα της στηριζόμενης στα κλασικά διαγνωστικά μέσα διάγνωσης της VVC (ιστορικό ασθενούς, κολπική εξέταση, μικροσκόπηση και μέτρηση pH κολπικού επιχρίσματος) ήταν 84% και 85%, αντίστοιχα [170].

Δεδομένου ότι > 50% των γυναικών που αναφέρουν σημεία και συμπτώματα που υποδηλώνουν VVC έχουν τελικά άλλες παθήσεις, ενώ συγχρόνως κανένα από τα κλινικά χαρακτηριστικά δεν είναι παθογνωμονικό της νόσου, η εφαρμογή επιβεβαιωτικής εργαστηριακής διερεύνησης κρίνεται απαραίτητη [171]. Έτσι, εκτός από την ορθή λήψη πλήρους ιστορικού και την τυπική γυναικολογική εξέταση, η διάγνωση της VVC πρέπει να περιλαμβάνει τη μικροσκοπική εξέταση άμεσου παρασκευάσματος κολπικών εκκρίσεων, την καλλιέργεια για μύκητες ή και άλλες επικουρικές δοκιμασίες, όπως τη μέτρηση του pH ή/και την αναζήτηση του παθογόνου με μοριακές τεχνικές. Σκοπός της διενέργειας τους είναι η διαπίστωση της ύπαρξης μυκήτων στο δείγμα καθώς και η ποσοτικοποίηση και η ταυτοποίησή τους σε επίπεδο είδους [172].

Σε κάθε περίπτωση, η μικροσκόπηση κολπικού επιχρίσματος θεωρείται υποχρεωτική [22]. Η διάγνωση της VVC βασίζεται στη θετική για ζυμομύκητες μικροσκόπηση του, εφόσον υπάρχει συμπτωματολογία που παραπέμπει στη νόσο. Το παρασκεύασμα υδροξειδίου του καλίου (ΚΟΗ) 10% έχει τεκμηριωθεί ως πιο αξιόπιστο μέσο ανίχνευσης μυκητικών στοιχείων σε κλινικά δείγματα συγκριτικά με το παρασκεύασμα φυσιολογικού ορού [9] και η χρήση του συστήνεται από τα κέντρα ελέγχου και πρόληψης νοσημάτων (centers for disease control and prevention, CDC) [2]. Συγκεκριμένα, το ΚΟΗ χρησιμοποιείται για τη διαύγαση του δείγματος, η οποία λαμβάνει χώρα χωρίς την τροποποίηση των στοιχείων του μύκητα που υπάρχουν σε αυτό, διευκολύνοντας έτσι τη μικροσκοπική παρατήρησή τους. Μια χαρακτηριστική μυρωδιά ψαριού κατά την προσθήκη ΚΟΗ στο επίχρισμα (θετική δοκιμασία αμινών, whiff test) υποδηλώνει βακτηριακή κολπίτιδα και βοηθά στη διαφοροδιάγνωση [166]. Η παρουσία ψευδοϋφών στο άμεσο παρασκεύασμα είναι χαρακτηριστικό της VVC και η παρατήρησή τους συμβάλει ιδιαίτερα στη διάκριση της λοίμωξης από τον ασυμπτωματικό αποικισμό. Η μικροσκόπηση πρέπει να γίνεται με μικροσκόπιο αντίθετης φάσης και σε μεγέθυνση φακού 40× [173]. Οι περιορισμοί της περιλαμβάνουν τη χαμηλή (40-70%) ευαισθησία και τη μικρότερη ικανότητα ανίχνευσης ορισμένων ζυμομυκήτων που δε σχηματίζουν ψευδοϋφές, όπως η *C. glabrata* [174]. Ειδικότερα, βλαστοκονίδια ή/και ψευδοϋφές/υφές μπορούν να ανιχνευθούν κατά τη μικροσκόπηση κολπικών εκκρίσεων στο 50-80% των περιστατικών VVC και μόνο στο 50% των περιπτώσεων απλού αποικισμού [9]. Κατά την παρατήρηση του παρασκευάσματος, μπορεί επίσης να βρεθεί αυξημένος αριθμός λευκοκυττάρων. Εάν δεν ανιχνευθούν βλαστοκονίδια ή/και ψευδοϋφές/υφές, ίσως η ποσότητα των μικροοργανισμών στο δείγμα να είναι περιορισμένη συντείνοντας στη χαμηλή ευαισθησία της τεχνικής [175]. Ωστόσο, φλεγμονή μπορεί να προκληθεί παρά το χαμηλό μυκητικό φορτίο, και ως εκ τούτου μέθοδοι που χαρακτηρίζονται από υψηλότερη ευαισθησία θα πρέπει να αξιοποιούνται σε ορισμένες περιπτώσεις, όπως για παράδειγμα σε ασθενείς με RVVC. Τα επιχρίσματα μπορούν επίσης να παρασκευαστούν, να στεγνώσουν στον αέρα και να στερεοποιηθούν με μεθανόλη ή θερμότητα προκειμένου να εξεταστούν με χρώση Gram, Giemsa ή Παπανικολάου [13]. Ωστόσο, το τεστ Παπανικολάου, αν και έχει αυξημένη ειδικότητα, παρουσιάζει μειωμένη ευαισθησία αφού βρέθηκε θετικό μόνο στο ~25% των δειγμάτων που ελήφθησαν από γυναίκες με συμπτωματική VVC και είχαν θετική καλλιέργεια για *Candida* spp. Τέλος, η μικροσκοπική εξέταση του επιχρίσματος συμβάλει

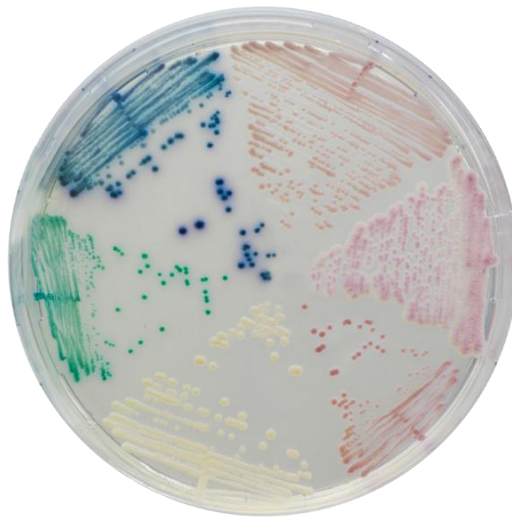
στον αποκλεισμό άλλων παθολογικών καταστάσεων, όπως η βακτηριακή κολπίτιδα (απουσία clue cells) ή η τριχομονίαση [9].



Εικόνα 13. Ανίχνευση στοιχείων ζυμομύκητα (βλαστοκονίδια, ψευδοϋφές και εκβλαστήσεις) κατά τη μικροσκοπική παρατήρηση δείγματος κολπικού υγρού (μεγέθυνση φακού 40×) [176].

Η καλλιέργεια θεωρείται το πρότυπο αναφοράς για τη διάγνωση της VVC και θα πρέπει να πραγματοποιείται ακόμη και σε γυναίκες που εμφανίζουν συμπτώματα που παραπέμπουν στη νόσο, αλλά έχουν φυσιολογική τιμή κολπικού pH και αρνητική άμεση μικροσκοπική εξέταση κολπικού υγρού. Ένα θετικό για *Candida* αποτέλεσμα καλλιέργειας δε θέτει την οριστική διάγνωση της λοίμωξης, καθώς τα *Candida* spp. είναι μέρος του φυσιολογικού μικροβιώματος του κόλπου και το 10-20% ασυμπτωματικών γυναικών αναμένεται να έχουν θετική για *Candida* καλλιέργεια [2]. Τα *Candida* spp. μπορούν να αναπτυχθούν καλά στους 25-37 °C. Το συνηθέστερα χρησιμοποιούμενο θρεπτικό υλικό για

την απομόνωση μυκήτων είναι το άγαρ Sabouraud εμπλουτισμένο με ή χωρίς αντιβιοτικά. Οι πρώτες αποικίες *Candida* αναπτύσσονται εντός 1-2 ημερών επώασης. Επίσης, χρωμογόνα θρεπτικά υλικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την άμεση ταυτοποίηση ορισμένων *Candida* spp. και την ανίχνευση μεικτών καλλιεργειών σε περίπτωση ταυτόχρονης παρουσίας ≥ 2 διαφορετικών ειδών στο δείγμα [82].



Εικόνα 14. Ανάπτυξη διαφορετικών *Candida* spp. σε χρωμογόνο θρεπτικό υλικό [177].

Στο πλαίσιο της εργαστηριακής διερεύνησης της νόσου, κρίνεται επιθυμητή και η μέτρηση του pH των κολπικών εκκρίσεων, με τις φυσιολογικές τιμές του να κυμαίνονται μεταξύ 3,8 και 4,5. Η συνεκτίμηση του κολπικού pH φαίνεται να προσθέτει στοιχεία στην κλινική εικόνα της ασθενούς, χωρίς όμως να καθορίζει και πάλι τη διάγνωση. Σημειωτέον, το pH του κόλπου είναι συνήθως φυσιολογικό σε περιπτώσεις VVC και αυξημένες τιμές του υποδηλώνουν μια εναλλακτική διάγνωση. Πρέπει, ωστόσο, να λαμβάνεται υπόψη ότι η VVC ενδέχεται να συνυπάρχει με άλλες κολπικές λοιμώξεις, όπως η βακτηριακή κολπίτιδα που σχετίζεται με αύξηση του κολπικού pH [9].

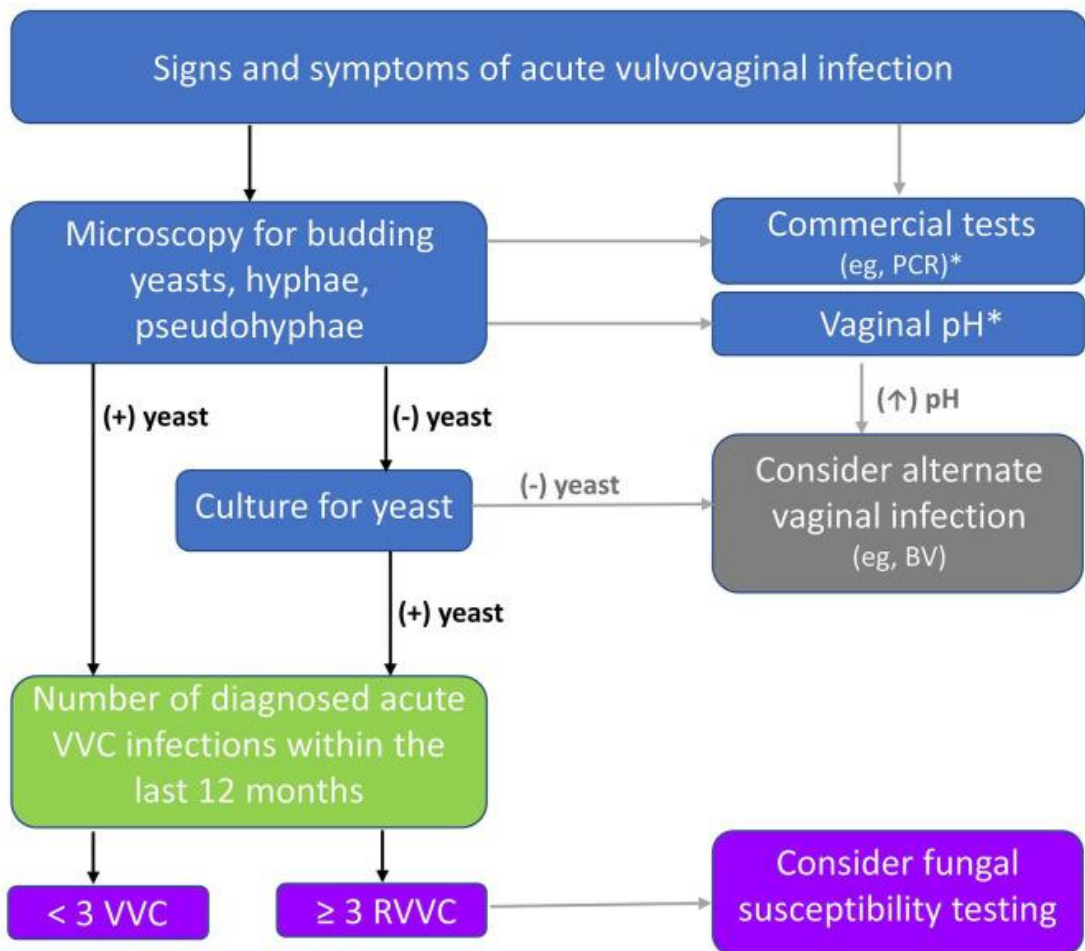
Δεδομένων των περιορισμών που χαρακτηρίζουν τις συμβατικές διαγνωστικές μεθόδους και της αυξανόμενης δημοτικότητας που παρουσιάζει η ενσωμάτωση μοριακών

τεχνικών στη διάγνωση των ΣΜΝ, ένας μεγάλος αριθμός εργαστηρίων έχει πλέον υιοθετήσει μοριακές δοκιμασίες για τη διάγνωση της VVC. Έτσι, εμπορικά διαθέσιμες δοκιμασίες βασιζόμενες στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR) χρησιμοποιούνται ολοένα και περισσότερο καθώς παρέχουν ταχύτερα αποτελέσματα συγκριτικά με την καλλιέργεια, ενώ μπορούν να ανιχνεύσουν παθογόνα που τυχόν δεν καλλιεργούνται, όπως στην περίπτωση λήψης αντιμυκητικής αγωγής. Ωστόσο, πολλές εξ αυτών δεν είναι εγκεκριμένες από τον οργανισμό τροφίμων και φαρμάκων των ΗΠΑ (food and drug administration, FDA) [172]. Συμφώνα με τα CDC, ο κλινικός γιατρός που θα στηρίξει τη διάγνωση σε αποτελέσματα που έχουν εξαχθεί εκτελώντας μια βασιζόμενη στην PCR δοκιμασία, οφείλει και να είναι εξοικειωμένος με τα χαρακτηριστικά απόδοσης της συγκεκριμένης δοκιμασίας [2]. Ενδεικτικά, η ευαισθησία μιας τέτοιας δοκιμασίας μπορεί να επηρεάζεται σημαντικά από το *Candida spp.* που προκαλεί τη VVC [178], ενώ η συμφωνία της με την καλλιέργεια ενδεχομένως να είναι χαμηλή [179]. Μεταξύ των διαφορετικών μεθόδων PCR, η πολυπλεκτική PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτόχρονη ανίχνευση πολλαπλών στόχων σε μια μόνο αντίδραση, και ως εκ τούτου για την ταυτοποίηση διαφορετικών *Candida spp.* που ενδέχεται να συνυπάρχουν σε ένα μοναδικό δείγμα [180]. Πρόσφατα, αναπτύχθηκε και αξιολογήθηκε ένα σύστημα ποιοτικών δεικτών που μπορούν να ταξινομήσουν τα απομονωθέντα από τον κόλπο στελέχη *Candida* σε αυτά που αποικίζουν ασυμπτωματικά την περιοχή ή προκαλούν RVVC, παρέχοντας ακόμη μεγαλύτερη διαγνωστική αξία στη μέθοδο της PCR πραγματικού χρόνου [181]. Αν και η ανίχνευση *Candida* σε ασυμπτωματικούς ασθενείς δεν είναι απαραίτητα ένα σημαντικό εύρημα που απαιτεί τη χορήγηση φαρμακευτικής αγωγής, η επιβεβαίωση της παρουσίας *Candida* με τεχνικές PCR μπορεί να είναι εξαιρετικά πολύτιμη στη διαχείριση γυναικών με RVVC που ίσως παρουσιάσουν υπερευαισθησία ακόμη και στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις αντιγόνων *Candida* [182]. Τέλος, σε αντίθεση με την καλλιέργεια, η PCR δεν καθιστά το παθογόνο διαθέσιμο για έλεγχο της *in vitro* ευαισθησίας του στα αντιμυκητικά .

Οι σύγχρονες δοκιμές υβριδισμού με DNA ανιχνευτές έχουν επιδείξει έως και 96% ευαισθησία και ειδικότητα για την ανίχνευση *Candida* σε δείγματα κολπικών εκκρίσεων [183], ενώ ακόμη υψηλότερα ποσοστά μπορούν να επιτευχθούν χρησιμοποιώντας μεθόδους αλληλούχισης ολόκληρου του γονιδιώματος [184]. Από την άλλη πλευρά, η αξιολόγηση

ορολογικών δεικτών δε θεωρείται χρήσιμη για τη διάγνωση της VVC. Αυτό οφείλεται κυρίως στο γεγονός ότι αντισώματα μπορούν να ανιχνευθούν ακόμη και σε γυναίκες χωρίς VVC, ενώ η μη επιπλεγμένη και χωρίς υποτροπές VVC δεν προκαλεί αυξημένα επίπεδα παραγωγής αντισωμάτων [22].

Σε γενικές γραμμές, η ταυτοποίηση του απομονωθέντος στελέχους σε επίπεδο είδους δύναται να χρησιμοποιηθεί ως οδηγός για την επιλογή της θεραπείας, καθώς αποτελεί έναν εν δυνάμει προγνωστικό δείκτη της *in vitro* ευαισθησίας του παθογόνου στα αντιμυκητικά. Το προφίλ της *in vitro* ευαισθησίας του παθογόνου στα αντιμυκητικά θα πρέπει να προσδιορίζεται όποτε κρίνεται αναγκαίο, όπως στην περίπτωση απομόνωσης *Candida spp.* που παρουσιάζουν ενδογενή αντοχή στις αζόλες, αποτυχημένης προηγούμενης θεραπείας, μακροχρόνιας λήψης αντιμυκητικών και χρόνιας RVVC. Θα πρέπει, όμως, να τονιστεί ότι η ερμηνεία των αποτελεσμάτων που προκύπτουν παραμένει σε μεγάλο βαθμό ασαφής, αφού μέχρι στιγμής δεν υπάρχουν όρια ευαισθησίας (CBPs ή ECOFFs) για την πλειοψηφία των ευρέως χρησιμοποιούμενων για τη θεραπεία της VVC αντιμυκητικών [5].



Εικόνα 15. Αλγόριθμος για την εργαστηριακή διάγνωση της VVC [172].

1.8 Θεραπεία της VVC

1.8.1 Κατηγορίες και μηχανισμός δράσης των αντιμυκητικών παραγόντων

Η *Candida* συγκαταλέγεται στους πιο κοινούς αιτιολογικούς παρόντες διεσδυτικών λοιμώξεων. Οι μύκητες, όπως και τα ανθρώπινα κύτταρα που προσβάλουν, είναι ευκαρυώτες, γεγονός που περιορίζει τα μόρια-στόχους στα οποία μπορούν να δράσουν οι αντιμυκητικοί παράγοντες [185]. Μέχρι στιγμής, υπάρχουν τέσσερις κύριες κατηγορίες αντιμυκητικών φαρμάκων.

1. Τα **πολυένια** είναι φυσικά, αμφιπαθή μόρια, έχουν μυκητοκτόνο δράση και συνιστούν την παλαιότερη κατηγορία φαρμάκων για συστηματική χορήγηση έναντι μυκητικών λοιμώξεων [185]. Η αρχική ερμηνεία της δράσης τους ήταν πως συνδέονταν άμεσα με την εργοστερόλη της κυτταρικής μεμβράνης των μυκήτων, προκαλώντας διαρροή των ενδुकυτταρικών συστατικών και τελικά κυτταρικό θάνατο [186]. Ωστόσο, σύγχρονες βιοχημικές μελέτες υπέδειξαν πως η αμφοτερικίνη Β δεν ενσωματώνεται στην κυτταρική μεμβράνη των μυκήτων, αλλά δημιουργεί εξωμεμβρανικά συσσωματώματα που αποσπών την εργοστερόλη από αυτή προκαλώντας λύση των κυττάρων [187]. Το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο πολυένιο, η αμφοτερικίνη Β, παρουσιάζει ισχυρή δράση έναντι ενός ευρέος φάσματος κλινικά σημαντικών μυκήτων, συμπεριλαμβανομένων πολλών *Candida*, *Aspergillus* και *Cryptococcus* spp. [188]. Εντούτοις, η χρήση της δεοξυχολικής μορφής της έχει περιοριστεί λόγω της χαμηλής από του στόματος βιοδιαθεσιμότητάς της, αλλά κυρίως εξαιτίας των δόσο-εξαρτώμενων τοξικών επιδράσεων της στον ξενιστή, ως επί το πλείστον νεφροτοξικότητας, που προκύπτουν από ομοιότητες μεταξύ εργοστερόλης και χοληστερόλης. Από τα μέσα της δεκαετίας του 1990, αναπτύχθηκαν λιπιδιακές μορφές αμφοτερικίνης Β, η λιποσωμιακή, το λιπιδιακό σύμπλεγμά της και το κολλοειδές διάλυμά της, τα οποία διαθέτουν βελτιωμένο φάσμα ανεπιθύμητων ενεργειών [186]. Αντοχή στην αμφοτερικίνη Β σπάνια έχει περιγραφεί στα *Candida* spp. που απομονώνονται συχνότερα, όμως μέχρι στιγμής δεν υπάρχουν διαθέσιμα τοπικά ή από του στόματος σκευάσματα για τη θεραπευτική διαχείριση της VVC [189].

Το πιο συχνά χορηγούμενο πολυένιο για την αντιμετώπιση της VVC είναι η νυστατίνη. Πρόκειται για ένα αποτελεσματικό μυκητοκτόνο ευρέως φάσματος, το οποίο χρησιμοποιείται εδώ και δεκαετίες για τη θεραπεία επιφανειακών μυκητιάσεων [190]. Η νυστατίνη ενδέχεται να δεσμεύσει τη χοληστερόλη της πλασματικής μεμβράνης των ευκαρυωτικών κυττάρων, αλλάζοντας έτσι τη μικροδομή των λιπιδιακών σχεδίων [191]. Οι λιπιδιακές σχεδίες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση τόσο της έμφυτης όσο και της προσαρμοστικής ανοσολογικής απόκρισης, μέσω της αναγνώρισης του παθογόνου, της ενεργοποίησης των λεμφοκυττάρων και της σηματοδότησης κυτοκινών [192]. Ως εκ τούτου, το εν λόγω αντιμυκητικό είναι σε θέση να επηρεάσει τις αντιμικροβιακές αμυντικές αποκρίσεις του ξενιστή. Τέλος, έχει βρεθεί πως παρουσιάζει ανταγωνιστική δράση έναντι

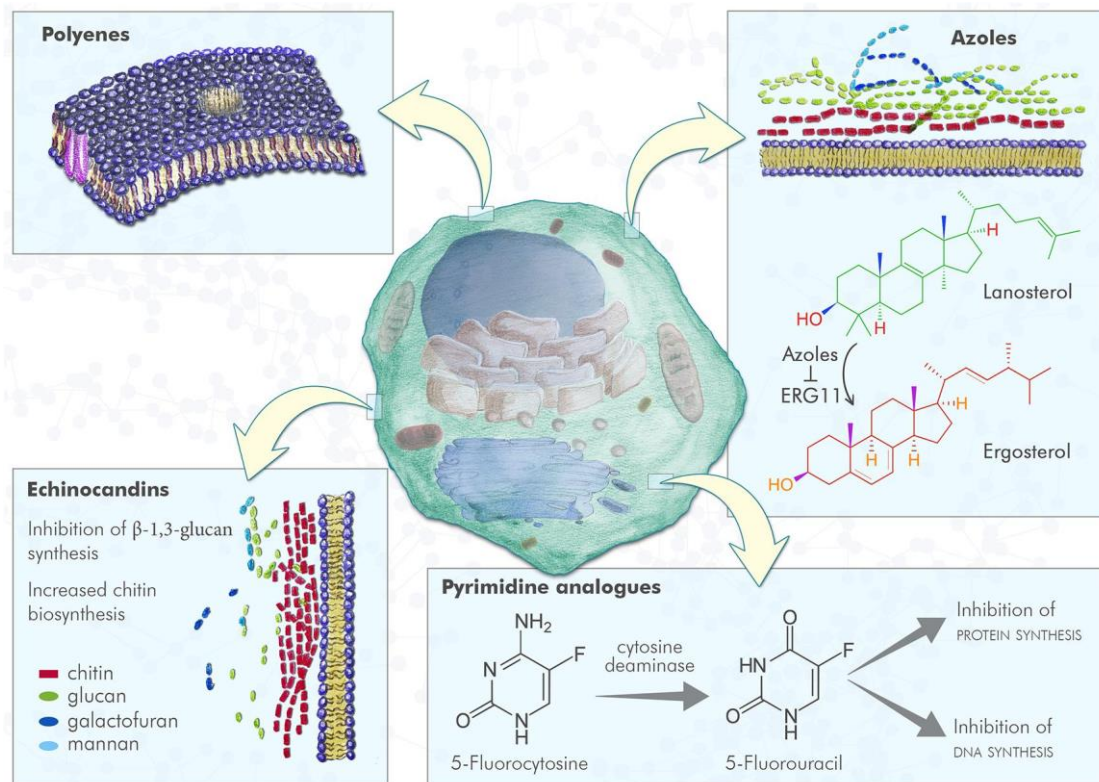
των κυτταρικών TLRs προκαλώντας ανοσολογικές αποκρίσεις μέσω της στρατολόγησης ανοσοκυττάρων και της έκκρισης χημειοκινών [193].

2. Τα **ανάλογα των πυριμιδών**, με κυριότερο εκπρόσωπό τους την 5-φλουκυτοσίνη, δρουν αναστέλλοντας τη σύνθεση του DNA και του RNA του μύκητα. Ωστόσο, η 5-φλουκυτοσίνη εμφανίζει περιορισμένο φάσμα δραστηριότητας που περιλαμβάνει είδη ζυμομυκήτων, συμπεριλαμβανομένων *Candida* και *Cryptococcus* spp., και ορισμένους μελανοτοιχωματικούς/μαύρους μύκητες. Σημειωτέον, το ποσοστό αντοχής της έναντι κλινικών στελεχών *C. albicans* και non-*albicans Candida* spp. αναφέρεται στο 7-8% και στο 22%, αντίστοιχα. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιείται ως μέρος συνδυαστικής θεραπείας με αμφοτερικίνη Β ή άλλα αντιμυκητικά για τη θεραπεία καντιντιάσεων και η χορήγησή της περιορίζεται σε περιστατικά ενδοκαρδίτιδας, ενδοφθαλμίτιδας, μηνιγγίτιδας και συμπτωματικών λοιμώξεων του ουροποιητικού συστήματος που προκαλούνται από ανθεκτικά στις αζόλες *Candida* spp. Μέχρι στιγμής, κολπικές κρέμες 5-φλουκυτοσίνης δεν είναι ευρέως διαθέσιμες στην αγορά [194].

3. Οι **αζόλες** (ημιδαζόλες και τριαζόλες) εντάχθηκαν στη θεραπευτική φαρέτρα για την αντιμετώπιση των μυκητικών λοιμώξεων τη δεκαετία του 1980 [185]. Αποτελούν ετεροκυκλικές συνθετικές ενώσεις που δρουν εμποδίζοντας τη σύνθεση της εργοστερόλης, οδηγώντας με αυτόν τον τρόπο σε διαταραχές στη διαπερατότητα και στη σταθερότητα της κυτταρικής μεμβράνης των μυκήτων καθώς και στη λειτουργία των ενζύμων που συνδέονται με αυτήν. Ειδικότερα, οι αζόλες αναστέλλουν τη δράση του ενζύμου 14-α-διμεθυλάσης της λανοστερόλης του κυτοχρώματος P450 (CYP51), το οποίο στα *Candida* spp. κωδικοποιείται από το γονίδιο *ERG11*, με δέσμευση της ενεργής θέσης στην ομάδα αίμης [195]. Σε αντίθεση με άλλα αντιμυκητικά, πολλά είδη αζολών διαθέτουν εξαιρετική βιοδιαθεσιμότητα και είναι διαθέσιμα τόσο για ενδοφλέβια όσο και για από του στόματος ή τοπική χορήγηση [196]. Ωστόσο, σημαντικό μειονέκτημά τους αποτελεί η υψηλή πιθανότητα αλληλεπιδράσεων με άλλα φάρμακα, καθώς οι αζόλες αναστέλλουν συγχρόνως τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450 των θηλαστικών που είναι υπεύθυνα για το μεταβολισμό των φαρμάκων [197]. Επιπλέον,

αξίζει να σημειωθεί ότι οι αζόλες παρουσιάζουν μυκητοστατική και όχι μυκητοκτόνο δράση έναντι των *Candida spp.*, επιβάλλοντας έτσι ισχυρή πίεση επιλογής και προάγοντας την ανάπτυξη αντοχής [185].

4. Τέλος, οι **εχिनοκανδίνες** (ανιντουλαφουγκίνη, κασποφουγκίνη και μикаφουγκίνη) είναι ημισυνθετικά κυκλικά λιποπεπτίδια αποτελούμενα από έναν πυρήνα κυκλικού εξαπεπτιδίου με μια πλευρική αλυσίδα λιπαρού ακυλίου συνδεδεμένη με άζωτο [185]. Πρόκειται για τη νεότερη κατηγορία αντιμυκητικών παραγόντων, η οποία δρα διαταράσσοντας την ακεραιότητα του κυτταρικού τοιχώματος των μυκήτων. Συγκεκριμένα, οι εχινοκανδίνες αναστέλλουν τη σύνθεση της (1, 3)-β-D-γλυκάνης ([1, 3]-β-D-glucan, BDG) συνδεδεμένες μη ανταγωνιστικά στην καταλυτική υπομονάδα της συνθάσης της, η οποία κωδικοποιείται από γονίδια της οικογένειας *FKS*, οδηγώντας σε ωσμωτική ευθραυστότητα και τελικά στον κυτταρικό θάνατο [198]. Επί του παρόντος, οι εχινοκανδίνες συνιστώνται ως θεραπεία πρώτης γραμμής για τη διεισδυτική καντιντίαση δεδομένης της ισχυρής μυκητοκτόνου δράσης τους έναντι των *Candida spp.*, συμπεριλαμβανομένων και των ανθεκτικών στη φλουконаζόλη κλινικών στελεχών, και διατίθενται μόνο σε ενδοφλέβια μορφή [199].



Εικόνα 16. Μηχανισμοί δράσης των κυριότερων κατηγοριών αντιμυκητικών παραγόντων [200].

1.8.2 Θεραπευτική προσέγγιση της νόσου

Ο ασυμπτωματικός κολπικός αποικισμός σε ανοσοεπαρκή άτομα που δε φέρουν ενδείξεις χρόνιας νόσου δεν απαιτεί καμία θεραπεία, ακόμη κι αν το μυκητικό φορτίο στην περιοχή είναι υψηλό. Αντιθέτως, οι συμπτωματικές λοιμώξεις χρήζουν φαρμακευτικής αντιμετώπισης με μια ποικιλία αντιμυκητικών [201], μεταξύ των οποίων διάφορες αζόλες, η νυστατίνη και η κυκλοπιροξολαμίνη, η οποία δρα αναστέλλοντας σημαντικά εξαρτώμενα από σίδηρο ένζυμα μέσω σχηματισμού χηλικών ενώσεων [202]. Σκοπό της θεραπείας της VVC αποτελούν τόσο η εξάλειψη του παθογόνου, όσο και η ανακούφιση των συμπτωμάτων της νόσου, ο έλεγχος των μη αναστρέψιμων παραγόντων κινδύνου που οδηγούν στην εμφάνισή της και η πρόληψη υποτροπής. Η πρόκληση έγκειται στην επιλογή του φαρμάκου εκείνου που μπορεί να χορηγηθεί με ασφάλεια και είναι καλά ανεκτό από την πλειοψηφία

των ασθενών, βελτιώνοντας έτσι και τη συμμόρφωσή τους με την εκάστοτε αγωγή [110]. Συγχρόνως, όμως, κάθε ασθενής που αξιολογείται, θα πρέπει ιδανικά να αντιμετωπίζεται θεραπευτικά ως ξεχωριστό περιστατικό λαμβάνοντας υπόψη την ταυτότητα και το προφίλ της *in vitro* ευαισθησίας του παθογόνου στα αντιμυκητικά. Μέχρι στιγμής, αυτό φαίνεται να μην είναι απολύτως εφικτό, καθώς δεν υπάρχουν διαθέσιμα όρια ευαισθησίας (CBPs ή ECOFFs) για την πλειοψηφία των ευρέως χρησιμοποιούμενων για τη θεραπεία της VVC αντιμυκητικών [5], ενώ παράλληλα δεν έχει μελετηθεί διεξοδικά η επίδραση συνθηκών που προσομοιώνουν το γυναικείο κόλπο, όπως το όξινο pH [6] στη διενέργεια του ελέγχου της *in vitro* ευαισθησίας στα αντιμυκητικά. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι η πιο αποτελεσματική θεραπευτική στρατηγική δεν είναι αυτή που στοχεύει στην εξάλειψη όλων των μυκήτων από το κατώτερο γεννητικό σύστημα, αλλά στη μείωση του φορτίου τους ώστε η ασθενής να παραμένει ασυμπτωματική [22].

1. Οξεία VVC

Τα περιστατικά οξείας VVC μπορούν να αντιμετωπιστούν με τη χρήση παραγώγων ημιδαζόλης, όπως εκοναζόλης, ισοκοναζόλης, κλοτριμαζόλης, οικοναζόλης, μικοναζόλης και φεντικοναζόλης, κατά την πρώτη εκδήλωση των συμπτωμάτων. Οι ουσίες αυτές είναι διαθέσιμες ως κολπικά υπόθετα και κρέμες για διάρκεια θεραπείας από 1 έως 7 ημέρες [22]. Τα CDC συνιστούν επίσης τη χρήση βουτακοναζόλης, τερκοναζόλης και τιοκοναζόλης, ωστόσο αυτές είναι διαθέσιμες σε περιορισμένο βαθμό στις περισσότερες ευρωπαϊκές χώρες [203]. Οι εναλλακτικές θεραπευτικές στρατηγικές για μη εγκυμονούσες γυναίκες περιλαμβάνουν την από του στόματος χορήγηση τριαζολών (φλουκοναζόλης, ιτρακοναζόλης, βορικοναζόλης, ποσακοναζόλης), καθώς και την τοπική χρήση νυστατίνης και κυκλοπιροξολαμίνης [22]. Τα ποσοστά επιτυχούς έκβασης μεταξύ των διαφορετικών θεραπευτικών σχημάτων είναι συγκρίσιμα και κυμαίνονται από 85% μετά από 1-2 εβδομάδες έως 75% μετά από 4-6 εβδομάδες [204] [205] [206] [207]. Αξίζει να σημειωθεί πως η τοπική θεραπεία είτε με κολπικά υπόθετα που περιείχαν 500 mg κλοτριμαζόλης είτε με κολπική κρέμα 10% κλοτριμαζόλης αποδείχθηκε εξίσου αποτελεσματική με την εφάπαξ από του στόματος χορήγηση 150 mg φλουκοναζόλης [205]. Ομοίως, δεν έχει παρατηρηθεί

σημαντική διαφορά στην ανακούφιση των συμπτωμάτων των ασθενών μεταξύ των διαφορετικών θεραπευτικών στρατηγικών [82].

Πίνακας 2. Ευρωπαϊκές κατευθυντήριες οδηγίες για την αντιμυκητική θεραπεία της οξείας VVC [82].

Τοπική θεραπεία (ήπια έως φυσιολογικά συμπτώματα)	
Κλοτριμαζόλη	κολπικό δισκίο 200 mg, μία φορά την ημέρα (3 ημέρες)
	κολπικό δισκίο 500 mg, μία φορά την ημέρα (1 ημέρα)
Επανάληψη σε περίπτωση υποτροπής	
Εκοναζόλη	κολπικό υπόθετο 150 mg, δύο φορές την ημέρα (1 ημέρα)
	κολπικό υπόθετο 150 mg, μία φορά την ημέρα (3 ημέρες)
Επανάληψη σε περίπτωση υποτροπής	
Φεντικοναζόλη	600 mg κολπική κάψουλα, μία φορά την ημέρα (1 ημέρα)
Επανάληψη σε περίπτωση υποτροπής	
Ισοκοναζόλη	κολπικό υπόθετο 150 mg, δύο φορές την ημέρα (1 ημέρα)
	κολπικό υπόθετο 150 mg, μία φορά την ημέρα (3 ημέρες)
	κολπικό υπόθετο 600 mg, μία φορά την ημέρα (1 ημέρα)
Επανάληψη σε περίπτωση υποτροπής	
Εναλλακτική θεραπεία (σοβαρά συμπτώματα, ανοσοκατασταλμένοι ασθενείς)	
Φλουκοναζόλη	150 mg από του στόματος, μία φορά την ημέρα (1 ημέρα)
	50 mg από του στόματος, μία φορά την ημέρα (7-14 ημέρες)
	100 mg από του στόματος, μία φορά την ημέρα (14 ημέρες)
Ιτρακοναζόλη	100 mg από του στόματος, 2 × 2 κάψουλες ημερησίως (1 ημέρα)
	100 mg από του στόματος 1 × 2 κάψουλες ημερησίως (3 ημέρες)
Νυστατίνη	κολπικά δισκία 100.000 μονάδων (14 ημέρες)
	κολπικά δισκία 200.000 μονάδων (6 ημέρες)
Κυκλοπιροξολαμίνη	Εφαρμογή κρέμας 50 mg, μία φορά την ημέρα (6-14 ημέρες)

Πρέπει να σημειωθεί πως η επιλογή της αντιμυκητικής θεραπείας μπορεί να καθοριστεί από το είδος του παθογόνου. Σε περιπτώσεις λοιμώξεων από *C. glabrata*, οι τυπικές τοπικές θεραπείες είναι συχνά ανεπιτυχείς, οπότε μπορεί να εξεταστεί το ενδεχόμενο της τοπικής χορήγησης νυστατίνης ή κυκλοπιροξολαμίνης [22]. Πρόσφατες μελέτες υπέδειξαν επίσης ότι η εφαρμογή κολπικών υπόθετων 600 mg βορικού οξέος για 14 ημέρες οδήγησε στην κλινική ίαση του 81% των ασθενών [208]. Ωστόσο, ο ευρωπαϊκός οργανισμός χημικών προϊόντων εξέδωσε προειδοποίηση για τη χρήση του, καθώς η συγκεκριμένη ουσία ενδέχεται να βλάψει τη γονιμότητα και μπορεί να είναι εμβρυοτοξική [209]. Επομένως, το βορικό οξύ μπορεί να θεωρηθεί ως αντιμικροβιακό έσχατης καταφυγής για την αντιμετώπιση εμμενουσών, υποτροπιαζουσών και ανθεκτικών στη συμβατική θεραπεία περιστατικών και πρέπει να συνοδεύεται πάντα από τη λήψη μέτρων αντισύλληψης όταν συνταγογραφείται σε μη έγκυες γυναίκες [22]. Επιπλέον, η χρήση κολπικής κρέμας 17% 5-φλουκυτοσίνης για 14 ημέρες αποδείχθηκε επιτυχής [210], ενώ η θεραπεία με εχινοκανδίνες πρέπει να περιορίζεται σε επίμονες περιπτώσεις με μαζικά συμπτώματα καθώς η χορήγησή τους δεν έχει εγκριθεί για τη θεραπεία της VVC [22]. Η *C. krusei* είναι ως επί το πλείστον ανθεκτική στη φλουκοναζόλη και την ιτρακοναζόλη, ενώ παρουσιάζει μέτρια ευαισθησία στην ποσακοναζόλη και ορισμένες ημιδαζόλες. Η κλοτριμαζόλη φάνηκε να είναι από τις πιο αποτελεσματικές ημιδαζόλες σε περιπτώσεις αιδοιοκολπίτιδας από *C. krusei* [36]. Η *C. dubliniensis* είναι ευαίσθητη στις ημιδαζόλες, αλλά αναπτύσσει εύκολα αντοχή στη φλουκοναζόλη, ειδικά σε περιπτώσεις μακροχρόνιας χορήγησής της [211]. Οι VVC από *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* και *C. parapsilosis* πρέπει να αντιμετωπίζονται θεραπευτικά όπως οι λοιμώξεις από *C. albicans* [22].

Σε γενικές γραμμές, τα κοινά τοπικά αντιμυκητικά σκευάσματα είναι καλά ανεκτά. Οι αζόλες και η κυκλοπιροξολαμίνη ενδέχεται να προκαλέσουν ένα ελαφρύ τοπικό αίσθημα καύσου σε < 10% των περιστατικών [22]. Εντούτοις, οι ήπιοι αυτοί ερεθισμοί οδηγούν συχνά σε μειωμένη συμμόρφωση των νοσούντων ή/και μπορεί να παρερμηνευθούν ως αντοχή στη θεραπεία [212]. Η πιθανότητα εμφάνισης αλλεργικής αντίδρασης, αν και υπαρκτή, είναι σχεδόν μηδενική. Οι τριαζόλες φλουκοναζόλη και ιτρακοναζόλη σπανίως προκαλούν παρενέργειες στις συνήθεις δόσεις. Ωστόσο, η συστηματική χορήγηση ιτρακοναζόλης μπορεί να προκαλέσει σημαντικά περισσότερες ανεπιθύμητες αντιδράσεις συγκριτικά με της

φλουκοναζόλης, συμπεριλαμβανομένων των κεφαλαλγιών και των αναφυλακτικών αντιδράσεων [213]. Σημειωτέον, κατά τη συστηματική θεραπεία με τριαζόλες είναι επίσης απαραίτητο να λαμβάνονται υπόψη οι πιθανές αλληλεπιδράσεις με άλλα φάρμακα που τυχόν λαμβάνει η ασθενής, ιδιαίτερα εάν αυτά μεταβολίζονται μέσω του κυτοχρώματος P450-3A4. Επίσης, οι ασθενείς θα πρέπει να ενημερώνονται πως η αξιοπιστία και η λειτουργικότητα των προφυλακτικών από λατέξ και των ελαστικών διαφραγμάτων μπορεί να επηρεαστούν κατά τη χρήση τοπικών αζολικών σκευασμάτων [22].

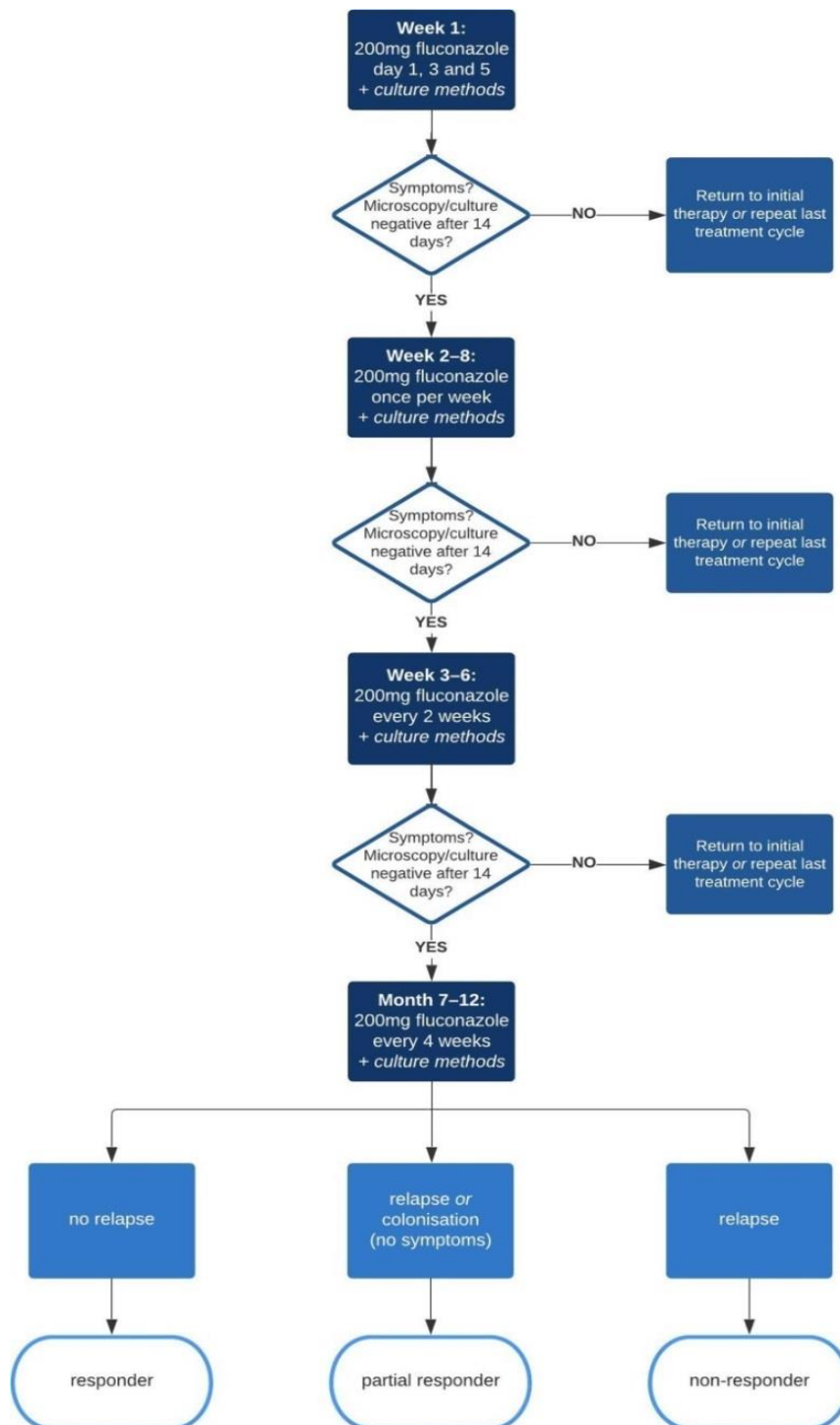
Τέλος, η τοπική χρήση αντισηπτικών που περιέχουν χλωριούχο δεκαλίνιο [214] ή οκτενιδίνη [215] δύναται να αποτελέσει εναλλακτική θεραπευτική προσέγγιση της VVC. Γενικά, δεν υπάρχει ανάγκη θεραπείας ενός ασυμπτωματικού σεξουαλικού συντρόφου, καθώς αυτό δε θα επιφέρει κάποιο όφελος στην πάσχουσα ασθενή [216]. Ωστόσο, το εάν η θεραπεία ενός αποικισμένου αλλά ασυμπτωματικού συντρόφου προσφέρει όφελος στην ασθενή παραμένει ακόμη αδιευκρίνιστο. Σε περίπτωση που ο σύντροφος εμφανίσει συμπτώματα ή αν ανιχνευθεί *Candida* στο πέος ή το σπέρμα του, ενδείκνυται να του χορηγηθεί μία δόση 150 mg φλουκοναζόλης [2].

2. Χρόνια RVVC

Αν η θεραπεία του υποκείμενου παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση της νόσου δεν έχει ακόμα επιχειρηθεί, όπως στην περίπτωση ανοσοκαταστολής, συνιστάται η χορήγηση τοπικής ή/και συστηματικής αντιμυκητικής θεραπείας συντήρησης με στόχο την πρόληψη υποτροπής. Η RVVC προσομοιάζεται ως προς τις συνέπειές της με μια χρόνια ανίατη ασθένεια. Σημειωτέον, ένα μεγάλο ποσοστό στελεχών non-*albicans Candida spp.* που έχουν απομονωθεί από γυναίκες με RVVC χαρακτηρίζονται από δοσο-εξαρτώμενη ευαισθησία ή αντοχή στη θεραπεία εκλογής, τη φλουκοναζόλη. Παράλληλα, η απομόνωση ανθεκτικών στη φλουκοναζόλη στελεχών *C. albicans* αυξάνεται εκθετικά λόγω της υπερέκθεσης στο εν λόγω φάρμακο [217]. Η αποτελεσματικότητα της θεραπείας της είτε με την εφαρμογή 500 mg κλοτριμαζόλης τοπικά είτε με την από του στόματος χορήγηση 100 mg κετοκοναζόλης ή 150 mg φλουκοναζόλης είναι συγκρίσιμα. Ωστόσο, ~50% των ασθενών θα παρουσιάσουν υποτροπή λίγο μετά το πέρας της αρχικής θεραπείας [22]. Σε μια

τυχαιοποιημένη, ελεγχόμενη με εικονικό φάρμακο μελέτη, στην οποία συμμετείχαν 387 γυναίκες με RVVC, το 43% όσων έλαβαν 150 mg φλουκοναζόλης εβδομαδιαίως για 6 μήνες και το 22% εκείνων που έλαβαν εικονικό φάρμακο ήταν απαλλαγμένες από τη νόσο μετά από πάροδο ενός έτους [218]. Επίσης, η τοπική χορήγηση νυστατίνης φαίνεται να είναι αποτελεσματική για την αντιμετώπιση της λοίμωξης, κυρίως αν το παθογόνο είναι ανθεκτικό στη φλουκοναζόλη ή ανήκει σε non-*albicans Candida* spp. [22].

Το συνηθέστερα συνιστώμενο σχήμα αντιμυκητικής θεραπείας για την αντιμετώπιση περιστατικών χρόνιας RVVC είναι η συστηματική χορήγηση 200 mg φλουκοναζόλης για διάστημα 3 ημερών την πρώτη εβδομάδα, ακολουθούμενη από θεραπεία συντήρησης με από του στόματος λήψη 200 mg φλουκοναζόλης μία φορά το μήνα για ένα έτος με την προϋπόθεση πως η ασθενής είναι πλέον ασυμπτωματική ή η καλλιέργεια της έχει αρνητικοποιηθεί για *Candida*. Ακολουθώντας το εν λόγω θεραπευτικό πρωτόκολλο, ~90% των ασθενών ήταν απαλλαγμένες από τη νόσο μετά την πάροδο 6 μηνών από την έναρξη της θεραπείας συντήρησης και το 77% ήταν ελεύθερες νόσου μετά την ολοκλήρωσή του [82]. Εντούτοις, η θεραπεία συντήρησης με φλουκοναζόλη συνήθως δεν προσφέρει μακροχρόνια ύφεση, σε αντίθεση με τη θεραπεία της οξείας VVC που διαρκεί 1-7 ημέρες και επιτυγχάνει ποσοστά κλινικής ίασης > 80%. Επιπλέον, έχουν αναφερθεί κίνδυνοι που σχετίζονται με την ασφάλεια της παρατεταμένης χορήγησης φλουκοναζόλης, όπως ηπατοτοξικότητα, αλληλεπιδράσεις με άλλα φάρμακα και επιπλοκές στη διάρκεια της εγκυμοσύνης [219]. Τέλος, η αφαίρεση IUDs θα πρέπει επίσης να λαμβάνεται υπόψη καθώς η *C. albicans* είναι πιθανό να προσκολληθεί σε συσκευές που περιέχουν λεβονοργεστρέλη. Μετά την αφαίρεσή τους και τη θεραπεία με φλουκοναζόλη, οι γυναίκες με RVVC είναι πιθανότερο να μην εμφανίσουν υποτροπή για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα [220].



Εικόνα 17. Θεραπεία συντήρησης με φλουκοναζόλη σε ασθενείς με χρόνια RVVC [22].

3. Θεραπεία στη διάρκεια της εγκυμοσύνης

Τα τελειόμηνα νεογνά που αποικίζονται με *Candida* spp. από τη μητέρα κατά τον κολπικό τοκετό παρουσιάζουν αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης συγγενούς στοματικής ή/και δερματικής καντιντίασης στη διάρκεια του πρώτου έτους ζωής τους. Ως εκ τούτου, σε ορισμένες περιπτώσεις ασυμπτωματικού αποικισμού ενδέχεται να συστηθεί η χορήγηση προφυλακτικής αντιμυκητικής αγωγής κατά τις τελευταίες εβδομάδες της εγκυμοσύνης προκειμένου να αποτραπεί η μετάδοση της *Candida* στο νεογνό ή να μειωθεί έως και 10% ο κίνδυνος εμφάνισης των προαναφερθέντων βλεννογονοδερματικών αλλοιώσεων σε αυτό [22]. Εντούτοις, τα αντιμυκητικά που μπορούν να χορηγηθούν για τοπική ή/και συστηματική χρήση στη διάρκεια της εγκυμοσύνης είναι περιορισμένα, ενώ σε περιπτώσεις χρόνιας RVVC αυξάνεται η πιθανότητα ανάπτυξης αντοχής στη θεραπεία, γεγονός που υπογραμμίζουν την ακρίβεια που απαιτείται στη διαγνωστική προσέγγιση της VVC με σκοπό τη βελτιστοποίηση των θεραπευτικών συστάσεων σε εγκύους, οι οποίες μάλιστα θεωρούνται ομάδα υψηλού κινδύνου για την εμφάνιση της νόσου [221]. Έτσι, ως θεραπεία εκλογής συνίσταται η τοπική εφαρμογή ημιδαζολών, ενώ πρέπει να αποφεύγεται η από του στόματος λήψη φλουконаζόλης καθώς έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο τετραλογίας του Fallot, αποβολών, κρανιοπροσωπικών, μυοσκελετικών ή καρδιακών ανωμαλιών και γέννησης νεκρού εμβρύου [222] [223] [224].



Εικόνα 18. Συγγενής δερματική καντιντίαση σε νεογνό [225].

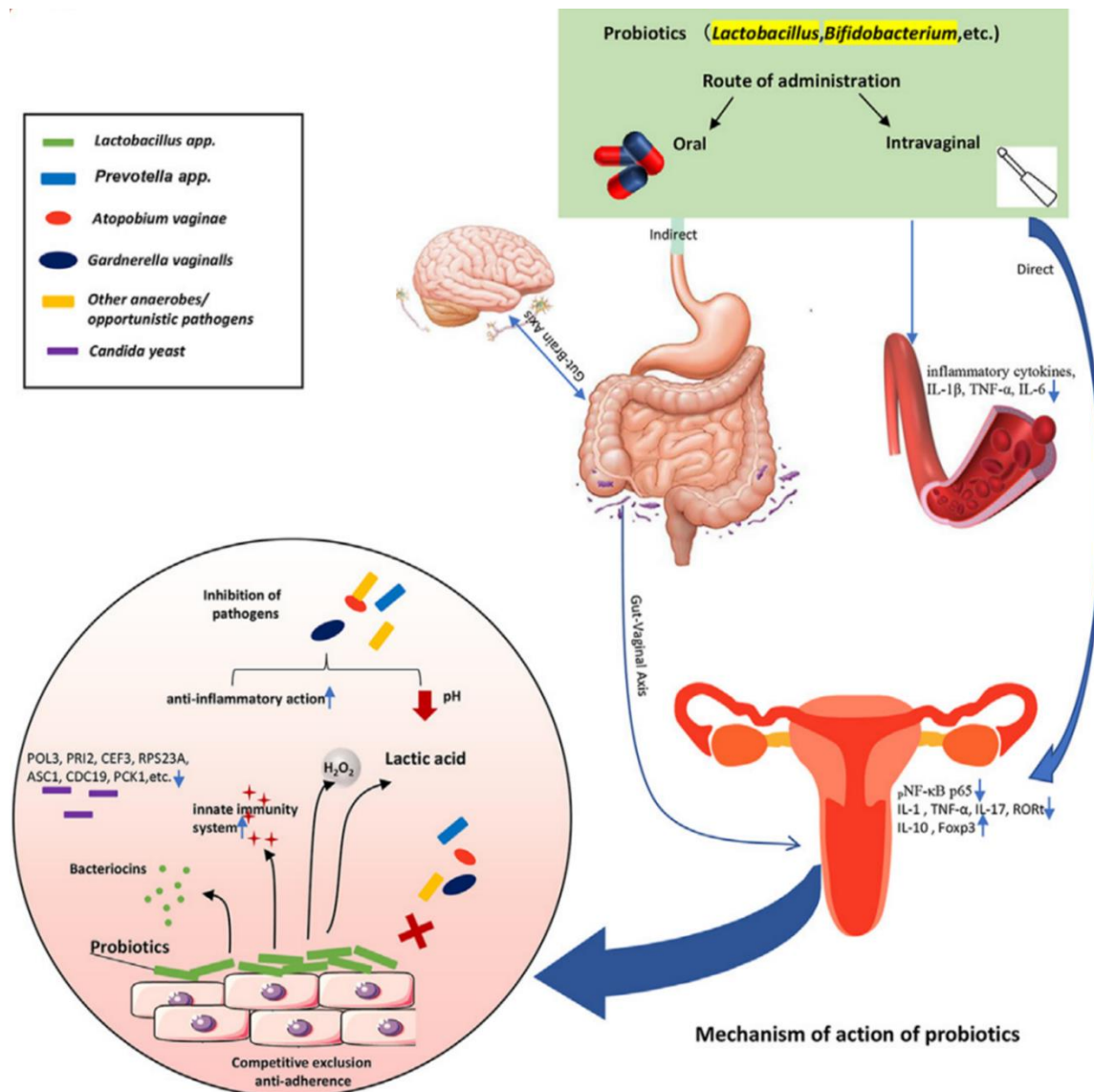
1.8.3 Ο ρόλος των προβιοτικών στην πρόληψη και την αντιμετώπιση της νόσου

Η αυξανόμενη συχνότητα θεραπευτικής αποτυχίας της VVC έχει εγείρει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας για τη χρήση των προβιοτικών ως μέσο προφύλαξης για την εμφάνιση της νόσου. Σύμφωνα με τον οργανισμό τροφίμων και γεωργίας και τον παγκόσμιο οργανισμό υγείας, τα προβιοτικά ορίζονται ως ζωντανοί μικροοργανισμοί που προσφέρουν οφέλη για την υγεία του ξενιστή όταν αυτά χορηγούνται σε επαρκείς ποσότητες [226]. Εξαιτίας της ανταγωνιστικής δράσης που παρουσιάζουν ορισμένα είδη γαλακτοβακίλλων έναντι της *Candida*, τα προβιοτικά θεωρούνται μια φυσική προσέγγιση στην προσπάθεια για πρόληψη και θεραπεία της VVC. Οι εξωγεννητικές θέσεις του σώματος, όπως το έντερο, χρησιμεύουν σαν δεξαμενή για αποικισμό και επαναμόλυνση σε γυναίκες με RVVC [227]. Ως εκ τούτου, η από του στόματος χορήγηση προβιοτικών μπορεί να εφαρμοστεί ως εναλλακτική θεραπευτική ή προληπτική στρατηγική σε ασθενείς με RVVC ή με αντενδείξεις για λήψη αντιμυκητικών [228].

Τα προβιοτικά μπορούν να εμποδίσουν τη διέλευση παθογόνων μικροοργανισμών από τη γαστρεντερική οδό στον κόλπο, να ρυθμίσουν την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή και να επηρεάσουν την επιθηλιακή άμυνα, δηλαδή την έκφραση των φλεγμονωδών γονιδίων που εκκρίνονται ως απόκριση στη VVC [229]. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα *in vitro* μελετών, οι γαλακτοβάκιλλοι παρουσιάζουν άμεση αντιμυκητική και ανοσοδιεγερτική δράση [230], ενώ ορισμένα στελέχη *Lactobacillus* μπορούν να αναστείλουν την προσκόλληση και την ανάπτυξη της *C. albicans* [231]. Επίσης, ενδέχεται να εμποδίζουν τον αποικισμό και την υπερανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών μέσω της απέκκρισης μεταβολικών παραπροϊόντων και της οξίνισης του μικροπεριβάλλοντος του κόλπου. Οι μεταβολίτες των *Lactobacillus spp.*, όπως του οργανικού οξέος, του H₂O₂ και της βακτηριοσίνης, μπορούν να συμβάλουν στην αντιμυκητική τους δράση [232]. Συγχρόνως, οι γαλακτοβάκιλλοι μπορούν να ενισχύσουν τη δράση της φλουконаζόλης *in vivo* [233]. Παράλληλα, η λακτοφερρίνη είναι μια γλυκοπρωτεΐνη, η οποία δεσμεύει το σίδηρο, ανευρίσκεται στο γάλα και τη βλέννα του τραχήλου της μήτρας και φαίνεται να μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης υποτροπής. Συγκεκριμένα, η από του στόματος χορήγηση ενός μείγματος γαλακτοβακίλλων-λακτοφερρίνης ως θεραπεία συντήρησης σε γυναίκες με RVVC που είχαν λάβει αρχικά

τοπική θεραπεία με κλοτριμαζόλη έδειξε ελπιδοφόρα αποτελέσματα, αφού οδήγησε στην 100% μείωση των συμπτωμάτων και της επανεμφάνισης υποτροπής [228].

Σε κάθε περίπτωση, πρέπει να τονιστεί πως οι δημοσιευμένες μελέτες αναφορικά με την αποτελεσματικότητα της λήψης προβιοτικών ως μέσο πρόληψης ή/και αντιμετώπισης της VVC παρουσιάζουν σημαντική ετερογένεια ως προς τα στελέχη που εξετάστηκαν, την οδό (από του στόματος ή κολπική) αλλά και τη διάρκεια της χορήγησής τους [22]. Σημειωτέον, η δράση των προβιοτικών φαίνεται να είναι στελεχο- και δοσο-εξαρτώμενη [234]. Επιπλέον, τα κλινικά δεδομένα εξακολουθούν να είναι περιορισμένα. Επομένως, παρουσιάζεται αδήριτη η ανάγκη για ποιοτικότερες, καλύτερα σχεδιασμένες, πιο τυχαιοποιημένες και μεγαλύτερου μεγέθους δείγματος μελέτες αποσκοπώντας την εξαγωγή αξιόπιστων συμπερασμάτων.



Εικόνα 19. Πιθανός μηχανισμός δράσης των προβιοτικών για την πρόληψη και τη θεραπεία της VVC και της βακτηριακής κολπίτιδας [235].

1.8.4 Νέοι αντιμυκητικοί παράγοντες και ανοσοθεραπεία για την αντιμετώπιση της VVC

Τα αυξημένα ποσοστά της ανοχής στη θεραπεία της νόσου και της εμφάνισης υποτροπών οδήγησαν στην αναζήτηση νέων αντιμυκητικών παραγόντων. Ο ibrexafungerp είναι ο πρώτος εκπρόσωπος της κατηγορίας των αναστολέων της συνθάσης της BDG, των τριτερπενοειδών, και συγκριτικά με τις εχινοκανδίνες παρουσιάζει την ευελιξία της

δυνατότητας της από του στόματος χορήγησης. Στο πλαίσιο προκλινικών μελετών, είχε επιδείξει δραστηριότητα έναντι ποικίλων *Candida* spp. και στελεχών *Candida* ανθεκτικών στις αζόλες και στις εχινοκανδίνες, καθώς και σε περιβάλλοντα χαμηλού pH, γεγονός που υποδήλωνε την πιθανή αποτελεσματικότητά του στη θεραπεία της λοίμωξης [236] [237]. Πράγματι, πρόσφατα ολοκληρώθηκαν οι κλινικές μελέτες φάσης 3 VANISH 303 και VANISH 306, σύμφωνα με τα αποτελέσματα των οποίων ο FDA ενέκρινε τη συστηματική χορήγηση συνολικά 600 mg ibrexafungerp για μια ημέρα για τη θεραπεία της οξείας VVC [238]. Από την άλλη πλευρά, η οτεσεκοναζόλη (VT-1161) είναι ένας εκλεκτικός αναστολέας της CYP51A1, ο οποίος ελαχιστοποιεί περιορισμούς αποτελεσματικότητας και συγκεκριμένα ζητήματα ασφάλειας που παρουσιάζουν άλλες αζόλες, ενώ έχει υποδείξει ισχυρή δραστηριότητα έναντι ανθεκτικών στις αζόλες *C. albicans* και non-*albicans Candida* spp. στελεχών [239]. Μάλιστα, στα τέλη της προηγούμενης χρονιάς ο FDA ενέκρινε την από του στόματος χορήγηση της για τη θεραπεία της RVVC [240].

Στα τέλη της δεκαετίας του 1970 έγιναν γνωστά τα πρώτα ενθαρρυντικά αποτελέσματα σχετικά με τη συμβολή της ανοσοθεραπείας υπό τη μορφή της μεθόδου της υποευαισθητοποίησης στην αντιμετώπιση της RVVC [241]. Σαράντα χρόνια μετά, παρουσιάστηκαν τα πρώτα δεδομένα μιας τυχαίοποιημένης, διπλά-τυφλής και ελεγχόμενης με εικονικό φάρμακο κλινικής μελέτης φάσης 2 αναφορικά με την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας του νέου εμβολίου NDV-3A στην πρόληψη της RVVC. Μια εφάπαξ ενδομυϊκή δόση του NDV-3A, στο οποίο περιέχεται μια ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη προσκολλητίνης/ινβαζίνης της *C. albicans*, ήταν ασφαλής, ενεργοποίησε ισχυρές και ταχείες ανοσοαποκρίσεις B- και T-λεμφοκυττάρων και ελάττωσε τη συχνότητα εμφάνισης συμπτωματικών επεισοδίων RVVC για έως και 12 μήνες σε γυναίκες ηλικίας < 40 ετών [242].

1.9 Προοπτικές για μελλοντική έρευνα

Παρά την αξιοσημείωτη πρόοδο που επιτεύχθηκε τα τελευταία χρόνια γύρω από την κατανόηση και τη διαχείριση της VVC, ιδίως σε ότι αφορά τη θεραπευτική αντιμετώπισή της, σημαντικά ερωτήματα εξακολουθούν να υπάρχουν και χρήζουν διερεύνησης σε επίπεδο

τόσο βασικής όσο και εφαρμοσμένης έρευνας. Από τη μία πλευρά, σημαίνουσες παράμετροι, οι οποίες σχετίζονται με την καταπολέμηση των παραγόντων λοιμογόνου δράσης των *Candida* spp., την παθογένεια της νόσου, τον εν δυνάμει μηχανισμό που αναστέλλει την προσκόλληση των μυκητικών κυττάρων στο κολπικό επιθήλιο προκειμένου να αντιμετωπιστεί η λοίμωξη ήδη από τα αρχικά της στάδια, τη βελτίωση της αντίστασης του κόλπου (διέγερση T λεμφοκυττάρων, χυμικοί παράγοντες), τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ *Candida* spp.-κολπικής χλωρίδας, το ρόλο της διατροφής στην εμφάνιση της νόσου και την αποτελεσματικότητα εναλλακτικών θεραπευτικών επιλογών που δε βασίζονται στη λήψη αντιμυκητικών παραγόντων, παραμένουν αδιευκρίνιστες. Από την άλλη πλευρά, η άμεση γεφύρωση μεταξύ της έρευνας και της εργαστηριακής καθώς και της κλινικής πρακτικής στην καθ' ημέρα πράξη είναι κρίσιμης σημασίας. Ως εκ τούτου, η συστηματική επικαιροποίηση της παγκόσμιας αλλά και της τοπικής επιδημιολογίας της νόσου σε συνδυασμό με τη βελτιστοποίηση του *in vitro* ελέγχου ευαισθησίας των παθογόνων στα κοινώς χορηγούμενα αντιμυκητικά θα βοηθήσουν στην καθοδήγηση της ενδεδειγμένης για κάθε περίπτωση εμπειρικής ή/και στοχευμένης θεραπείας αποσκοπώντας στη μέγιστη θεραπευτική αποτελεσματικότητα και κατ' επέκταση στη σημαντική βελτίωση της ποιότητας ζωής των γυναικών με VVC.

2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Σκοπός

Επί του παρόντος παρουσιάζεται μια ασαφής επιδημιολογική εικόνα της VVC σε παγκόσμιο επίπεδο, ενώ παρατηρούνται εξίσου ανεπάρκειες όσον αφορά τον προσδιορισμό της *in vitro* ευαισθησίας των υπεύθυνων παθογόνων στα αντιμυκητικά. Τα κενά αυτά πρέπει να αντιμετωπιστούν, καθώς η κατανόηση αυτών των πτυχών αποτελεί κρίσιμη προϋπόθεση για την ανάπτυξη αποτελεσματικών στρατηγικών διαχείρισης της νόσου. Η παρούσα διπλωματική εργασία διατυπώνει, αφενός, μια λεπτομερή περιγραφή της σύγχρονης επιδημιολογίας της VVC στη χώρα μας και, αφετέρου, ερευνά παραμέτρους που συντελούν στη βελτιστοποίηση του ελέγχου της *in vitro* δραστηριότητας αντιμυκητικών παραγόντων έναντι των *Candida spp.* Τα αποτελέσματα αναμένεται να συνεισφέρουν στην καλύτερη θεραπευτική προσέγγιση των ασθενών.

2.2 Υλικά και Μέθοδοι

2.2.1 Ανασκόπηση της βιβλιογραφίας

Πραγματοποιήθηκε ανασκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας σχετικά με την επιδημιολογία της VVC στον ελλαδικό χώρο. Οι δημοσιεύσεις ανακτήθηκαν μέσω αναζητήσεων στην ελεύθερη ψηφιακή βάση βιοϊατρικών δεδομένων Pubmed, χρησιμοποιώντας τις λέξεις-κλειδιά "vulvovaginal", "vaginal", "vulvovaginitis", "vaginitis" σε συνδυασμό με "Greece" και/ή "Greek". Ακολούθως, έλαβαν χώρα επιπλέον αναζητήσεις στις βιβλιογραφίες των μελετών που ανακτήθηκαν. Αξιολογήθηκαν μόνο άρθρα γραμμένα στην αγγλική γλώσσα, χωρίς περιορισμό ως προς το έτος δημοσίευσής τους. Συγκεκριμένα, εξήχθησαν διαθέσιμα δεδομένα αναφορικά με τον τόπο και το χρόνο διεξαγωγής της μελέτης, τα δημογραφικά στοιχεία των ασθενών, τους παράγοντες κινδύνου και τη

συχνότητα εμφάνισης της νόσου, καθώς και το παθογόνο και το προφίλ της *in vitro* ευαισθησίας του στα αντιμυκητικά.

2.2.2 Ασθενείς και ορισμοί

Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν 1.300 ενήλικες γυναίκες με ύποπτη συμπτωματολογία για VVC κατόπιν κλινικής γυναικολογικής εξέτασης, οι οποίες επισκέφθηκαν το ιδιωτικό διαγνωστικό εργαστήριο ειδικών λοιμώξεων-μυκητιάσεων και μικροβιολογικών εξετάσεων «Mycolab» κατά το διάστημα 01/10/2019-01/11/2021. Η VVC επιβεβαιώθηκε με μικροσκοπική ανίχνευση δομών ζυμομύκητα σε νωπό παρασκεύασμα κολπικών εκκρίσεων και την εν συνεχεία θετική για *Candida* spp. καλλιέργειά τους. Ως μεικτή VVC ορίστηκε η απομόνωση ≥ 2 *Candida* spp. από το ίδιο δείγμα, ενώ ως RVVC ορίστηκε η εμφάνιση ≥ 3 συμπτωματικών οξέων επεισοδίων ανά έτος [2]. Στην περίπτωση ασθενών που πραγματοποίησαν μεταγενέστερες επισκέψεις γίνονταν καταγραφή της εκάστοτε θεραπείας και της έκβασης του περιστατικού, με την κλινική ίαση να ορίζεται ως η απουσία συμβατών με VVC συμπτωμάτων σε συγκεκριασμό με αρνητικοποίηση της καλλιέργειας κολπικών εκκρίσεων για *Candida* spp.

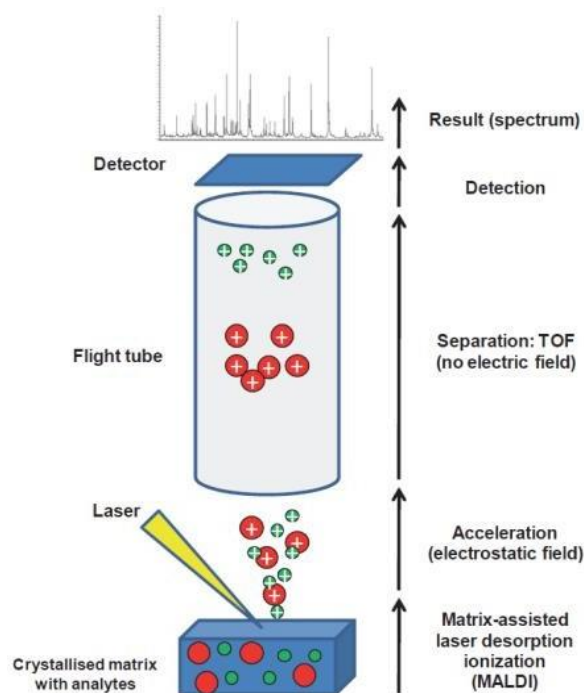
2.2.3 Κλινικά στελέχη

Ελέγχθηκαν στελέχη *Candida* spp., τα οποία είχαν απομονωθεί από δείγματα κολπικών εκκρίσεων των προαναφερθεισών ασθενών. Η ταυτοποίηση τους σε επίπεδο είδους είχε πραγματοποιηθεί με χρωματομετρική ανάλυση απορρόφησης σακχάρων (Auxacolor™ 2, Biorad, Αθήνα, Ελλάδα). Τα στελέχη ήταν αποθηκευμένα στους -70°C σε στείρο διάλυμα 10% γλυκερόλης (AppliChem, Ντάρμστατ, Γερμανία) μέχρι τη χρήση τους. Αρχικά, ανακαλλιεργήθηκαν σε διαφοροποιητικό χρωμογόνο θρεπτικό υλικό ελεύθερο αντιβιοτικών (*Brilliance Candida Agar*, Oxoid, Αθήνα, Ελλάδα) στους 30°C για τουλάχιστον 48 ώρες προκειμένου να διαπιστωθεί η καθαρότητά τους και η ύπαρξη μεικτών καλλιεργειών. Κατόπιν και πριν τον εκάστοτε έλεγχο, ανακαλλιεργήθηκαν σε άγαρ δεξτρόζης Sabouraud

(Sabouraud dextrose agar, SDA) εμπλουτισμένο με χλωραμφενικόλη και γενταμυκίνη (Οxoid, Αθήνα, Ελλάδα) στους 30°C για 24 ώρες.

2.2.4 Ταυτοποίηση στελεχών *Candida* spp. με MALDI-ToF MS

Η αξιοποίηση της μεθόδου της φασματοφωτομετρίας μάζας με μηχανισμό ιοντισμού εκρόφησης με λέιζερ, υποβοηθούμενου από μήτρα, και αναλυτή χρόνου/πτήσης (matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, MALDI-ToF MS) για την ταυτοποίηση ζυμομυκήτων στο σύγχρονο μικροβιολογικό εργαστήριο παρουσιάζει πλέον εξαιρετική δυναμική, κυρίως λόγω της ευκολίας στην εκτέλεσή της και της γρήγορης παροχής αποτελεσμάτων υψηλής αξιοπιστίας. Η συγκεκριμένη εφαρμογή της στηρίζεται στον ιονισμό των πρωτεϊνών του δείγματος, με τα παραγόμενα ιόντα να επιταχύνονται στη συνέχεια προς τον ανιχνευτή σε περιβάλλον κενού και να προκύπτουν τελικά φάσματα μάζας των μακρομορίων σύμφωνα με την αναλογία μάζας προς φορτίο, τα οποία είναι μοναδικά για κάθε μικροοργανισμό και λειτουργούν ως το δακτυλικό του αποτύπωμα. Η τελική ταυτοποίηση του ζυμομύκητα πραγματοποιείται με σύγκριση του αποκτηθέντος φάσματος με πρότυπα φάσματα μαζών που βρίσκονται καταχωρημένα σε βιβλιοθήκες αναφοράς στο λογισμικό του αναλυτή [243].



Εικόνα 20. Σχηματική αναπαράσταση της αρχής μεθόδου της MALDI-ToF MS [244].

Στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης, τα απομονωθέντα στελέχη *Candida* spp. ταυτοποιήθηκαν εκ νέου σε επίπεδο είδους χρησιμοποιώντας το σύστημα MALDI Biotyper® (Bruker Daltonics, Βρέμη, Γερμανία) και ακολουθώντας τα παρακάτω βήματα.

1. Επεξεργασία και ανάλυση του δείγματος

1. Προστίθεται 1 µL πρότυπου πρωτεϊνικού εκχυλίσματος βακτηρίου (Bruker bacterial test standard, Bruker Daltonics, Βρέμη, Γερμανία), το οποίο λειτουργεί ως μάρτυρας ποιοτικού ελέγχου, σε 2 θέσεις της ειδικής για τον αναλυτή ανοξειδωτής πλάκας 96-θέσεων.

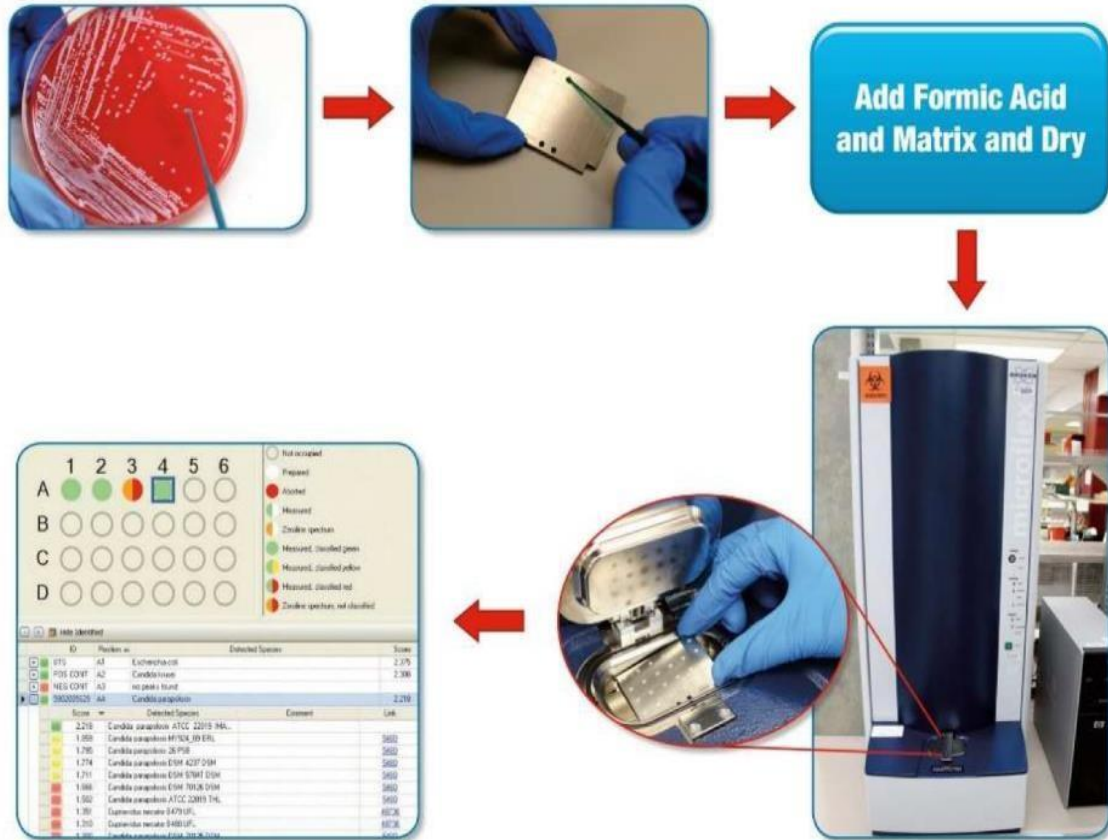
2. Ακολουθεί η απευθείας προσθήκη των δειγμάτων, συγκεκριμένα μιας μικρής ποσότητας από τις αποικίες του εκάστοτε προς εξέταση ζυμομύκητα, στις ελεύθερες θέσεις της πλάκας. Κατόπιν, προστίθεται στις ίδιες θέσεις 1 µL φορμικού οξέος και η πλάκα αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου.

3. Αυστηρά πριν την πάροδο 30 λεπτών, οι προαναφερθείσες θέσεις υπερκαλύπτονται με 1μL διαλύματος μήτρας (HAAC matrix, Bruker Daltonics, Βρέμη, Γερμανία) και η πλάκα αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου.

4. Κατόπιν, η πλάκα εισάγεται στο φασματογράφο μάζας για την πραγματοποίηση της ανάλυσης.

2. Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Τα αποκτηθέντα πρωτογενή φάσματα κατεργάζονται και αναλύονται αυτομάτως με τη βοήθεια λογισμικού του αναλυτή. Η σύγκρισή τους με πρότυπα πρωτεϊνικά φάσματα μικροοργανισμών που είναι αποθηκευμένα στις βιβλιοθήκες του, οδηγεί τελικά στην ταυτοποίηση του δείγματος, η οποία συνοδεύεται από μια τιμή (score) που είναι ενδεικτική της αξιοπιστίας του αποτελέσματος. Ειδικότερα, τιμή $\geq 2,0$ υποδεικνύει αποτέλεσμα υψηλής εμπιστοσύνης και τιμή $\geq 1,7$ και $< 2,0$ φανερώνει αποτέλεσμα χαμηλής εμπιστοσύνης, ενώ για τιμές $< 1,7$ η ταυτοποίηση δεν είναι εφικτή.



Εικόνα 21. Σχηματική αναπαράσταση της πορείας που ακολουθείται για την ταυτοποίηση ζυμομυκήτων με το σύστημα MALDI Biotyper® της Bruker Daltonics [245].

2.2.5 Έλεγχος *in vitro* ευαισθησίας αντιμυκητικών παραγόντων έναντι *Candida spp.*

Η μέθοδος των μικροαραιώσεων σε ζωμό αποτελεί το χρυσό πρότυπο για τον έλεγχο της *in vitro* ευαισθησίας αντιμικροβιακών παραγόντων, επιτρέποντας τον προσδιορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσής τους (minimum inhibitory concentration, MIC), δηλαδή της χαμηλότερης συγκέντρωσής τους που απαιτείται για την αναστολή της ανάπτυξης του παθογόνου σε καθορισμένο βαθμό. Στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης, ο έλεγχος της *in vitro* ευαισθησίας στα αντιμυκητικά πραγματοποιήθηκε ακολουθώντας τις κατευθυντήριες οδηγίες της EUCAST, όπως αναγράφονται στο αναθεωρημένο πρότυπο EUCAST E.DEF 7.3.2. [246].

1. Θρεπτικό υλικό

Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε περιείχε RPMI-1640, με γλουταμίνη και κόκκινο της φαινόλης ως δείκτη pH, χωρίς διττανθρακικό νάτριο (Sigma-Aldrich, Αθήνα, Ελλάδα), εμπλουτισμένο με γλυκόζη (PanReac Applichem, Αθήνα, Ελλάδα) σε τελική συγκέντρωση 2% και ρυθμισμένο σε pH 7,0 με 3-(N-μορφολινο) προπανοσουλφονικό οξύ (MOPS) σε τελική συγκέντρωση 0,165 M. Σημειωτέον, το υλικό παρασκευάζεται αρχικά σε διπλάσια ισχύ (2×), γιατί αναμένεται να αραιωθεί σε αναλογία 1:1 με το εναιώρημα του μύκητα που προστίθεται στο τελικό στάδιο της δοκιμασίας του ελέγχου ευαισθησίας.

Συγκεκριμένα, για την παρασκευή 1 L θρεπτικού υλικού ακολουθούνται τα εξής βήματα [246]:

1. Σε ευρύλαιμη κωνική φιάλη ή ποτήρι ζέσεως προστίθενται τα στερεά υλικά στις απαιτούμενες ποσότητες και 900 mL αποσταγμένου νερού.

Πίνακας 3. Σύσταση του θρεπτικού υλικού RPMI 1640 εμπλουτισμένο με 2% γλυκόζη.

Συστατικό	Ποσότητα
Αποσταγμένο νερό	900 mL
RPMI 1640	20,8 g
MOPS	69,06 g
Γλυκόζη	36 g

2. Το διάλυμα τίθεται υπό ανάδευση, χωρίς θέρμανση, μέχρι να διαλυτοποιηθούν πλήρως τα στερεά υλικά και να διαυγάσει.

3. Ενώ το διάλυμα αναδεύεται, προστίθεται στάγδην υδροξείδιο του νατρίου (NaOH) 1 M και το pH ρυθμίζεται στο 7,0 με τη χρήση πεχαμέτρου.



Εικόνα 22. Ρύθμιση του pH του θρεπτικού υλικού στο 7,0 με NaOH 1 M, υπό ανάδευση.

4. Στη συνέχεια, προστίθεται αποσταγμένο νερό σε τελικό όγκο 1 L.
5. Ακολουθεί αποστείρωση χρησιμοποιώντας αποστειρωμένο φίλτρο μιας χρήσης με μέγεθος πόρων 0,22 μm .

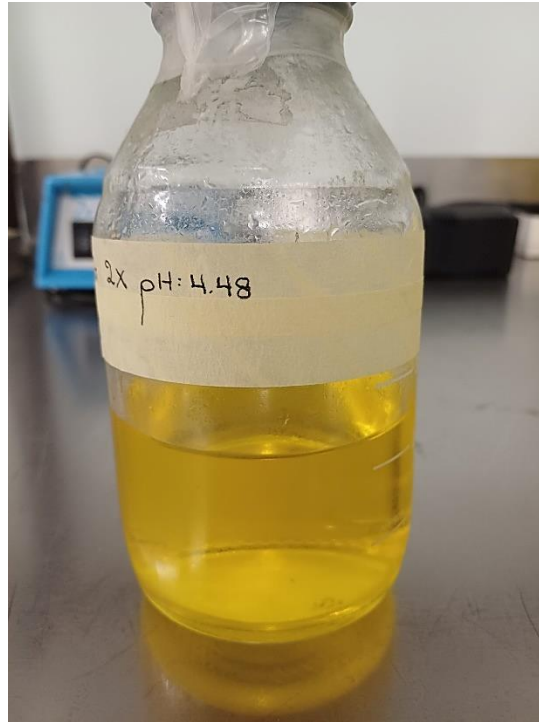


Εικόνα 23. Αποστείρωση του θρεπτικού υλικού (pH 7,0) μέσω φιλτραρίσματος.

Το θρεπτικό μέσο φυλάσσεται σε συνθήκες ψύξης (≤ 4 °C) για διάστημα έως και 6 μηνών. Για λόγους ποιοτικού ελέγχου συνιστάται η χρήση ποσότητάς του για έλεγχο στεριότητας, για επανέλεγχο του pH (αποδεκτό εύρος τιμών 6,9 - 7,1) καθώς και για έλεγχο ανάπτυξης ενός πρότυπου στελέχους.

Αξίζει να σημειωθεί πως το φυσιολογικό pH του κόλπου κυμαίνεται μεταξύ 3,8 και 4,5. Προηγούμενες έρευνες υπέδειξαν ότι το pH του θρεπτικού υλικού μπορεί να μεταβάλλει τις MICs των αζολών σε στελέχη *Candida spp.* όταν αυτές προσδιορίζονται με την πρότυπη μέθοδο μικροαραιώσεων σε ζωμό σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες του ινστιτούτου κλινικών και εργαστηριακών προτύπων (clinical and laboratory standards institute, CLSI) [46]. Ωστόσο, ο αντίκτυπος του pH στην αντίστοιχη δοκιμασία κατά EUCAST δεν έχει ακόμη διερευνηθεί. Επομένως, στην παρούσα μελέτη αξιολογήθηκε η επίδραση του περιβάλλοντος χαμηλού pH στην *in vitro* δραστηριότητα των αζολών που χορηγούνται σαν συστηματικές θεραπείες πρώτης και δεύτερης γραμμής για τη VVC χρησιμοποιώντας την EUCAST μεθοδολογία αναφοράς. Για την παρασκευή του θρεπτικού υλικού ακολουθήθηκαν τα προαναφερθέντα βήματα, με τη διαφορά ότι σε αυτή την περίπτωση το pH του ρυθμίστηκε

στο 4,5 με την προσθήκη υδατικού διαλύματος υδροχλωρίου όπου και παρατηρήθηκε αλλαγή στο χρώμα του από ερυθρό σε κίτρινο.



Εικόνα 24. Θρεπτικό υλικό (pH 4,5) που χρησιμοποιήθηκε για τον *in vitro* έλεγχο ευαισθησίας στελεχών *Candida spp.* έναντι αζολών προσομοιώνοντας τις συνθήκες pH του κόλπου.

2. Αντιμυκητικά φάρμακα

Στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης εξετάστηκε η *in vitro* δραστικότητα 8 αντιμυκητικών παραγόντων, εκ των οποίων ορισμένα χορηγούνται τοπικά και άλλα συστηματικά για τη θεραπεία της VVC. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν καθαρές ουσίες φλουконаζόλης, ιτρακοναζόλης, μικοναζόλης, κετοκοναζόλης, φεντικοναζόλης, εκοναζόλης, κλοτριμαζόλης και βορικού οξέος (TCI Chemicals, Αθήνα, Ελλάδα). Ο έλεγχος της *in vitro* ευαισθησίας πραγματοποιήθηκε στις καθιερωμένες εργαστηριακές συνθήκες, δηλαδή σε pH 7,0, για όλα τα αντιμυκητικά. Ωστόσο, για τη φλουконаζόλη και την ιτρακοναζόλη, οι οποίες χρησιμοποιούνται ως θεραπεία εκλογής και δεύτερης γραμμής για τη VVC, αντίστοιχα [247] [217] ο έλεγχος διενεργήθηκε ταυτόχρονα και σε pH 4,5.

3. Αρχικά (stock) διαλύματα αντιμυκητικών φαρμάκων

Κατά κανόνα, κατά την παρασκευή πυκνών μητρικών διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης φαρμάκου θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η καθαρότητα της παρτίδας παραγωγής του, καθώς συχνά σε αυτό εμπεριέχονται έκδοχα. Παράλληλα, θα πρέπει να ελέγχονται το μέσο διάλυσης και η μέγιστη διαλυτότητά του. Η ποσότητα φαρμάκου ή διαλύτη που απαιτείται για την παρασκευή ενός τυπικού stock διαλύματος μπορεί να υπολογιστεί σύμφωνα με τις ακόλουθες εξισώσεις:

$$\text{Βάρος (g)} = \frac{\text{Όγκος (L)} \times \text{Συγκέντρωση } \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}}\right)}{\text{Καθαρότητα } \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}}\right)}$$

$$\text{Όγκος (L)} = \frac{\text{Βάρος (g)} \times \text{Καθαρότητα } \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}}\right)}{\text{Συγκέντρωση } \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}}\right)}$$

Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της EUCAST, το stock διάλυμα θα πρέπει να έχει συγκέντρωση τουλάχιστον 200 φορές μεγαλύτερη από την υψηλότερη τελική συγκέντρωση του φαρμάκου που θα ελεγχθεί στην πλάκα μικροτιτλοδότησης [246]. Ως εκ τούτου, πραγματοποιήθηκε αρχικά ανασκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας αναφορικά με το προφίλ ευαισθησίας απομονωθέντων στελεχών *Candida* spp. από δείγματα κολπικών εκκρίσεων στους υπό μελέτη 8 αντιμυκητικούς παράγοντες και ορίστηκαν τα προς εξέταση εύρη τελικών συγκεντρώσεων τους στην πλάκα 96-βοθρίων. Συγκεκριμένα, τα εύρη θα πρέπει να είναι ενδεικτικά για τα παθογόνα που μελετώνται και να περιλαμβάνουν τα όρια ευαισθησίας του εκάστοτε αντιμυκητικού έναντι αυτών, εάν υπάρχουν, καθώς και τα αναμενόμενα αποτελέσματα για τα στελέχη ποιοτικού ελέγχου [246]. Λαμβάνοντας υπόψη τα προαναφερθέντα, παρασκευάστηκαν τα μητρικά διαλύματά τους στην ανάλογη συγκέντρωση.

Για την παρασκευή των 8 επιμέρους stock διαλυμάτων, ποσότητα του εκάστοτε αντιμυκητικού ζυγίστηκε σε αναλυτικό ζυγό που είχε βαθμονομηθεί με εγκεκριμένα βάρη

αναφοράς από πιστοποιημένο μετρολογικό οργανισμό. Σημειωτέον, η ποσότητα του φαρμάκου που ζυγίζεται θα πρέπει να υπερβαίνει την ακρίβεια του ζυγού κατά τουλάχιστον 10 - 100 φορές. Ακολούθως, οι καθαρές ουσίες διαλύθηκαν στον ενδεδειγμένο διαλύτη, συγκεκριμένα σε στείρο διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO, Chem-Lab, Αθήνα, Ελλάδα), εκτός του βορικού οξέος που διαλύθηκε σε αποσταγμένο νερό. Πρέπει να σημειωθεί πως η στερεή ουσία θα πρέπει να διαλύεται πλήρως πριν την κατάψυξη του διαλύματος, καθώς η ύπαρξη συσσωματωμάτων έχει συνδεθεί με ψευδώς αυξημένες τιμές MIC.

Πίνακας 4. Εύρος των εξεταζόμενων συγκεντρώσεων των αντιμυκητικών παραγόντων στην παρούσα μελέτη, συγκέντρωση των εκάστοτε stock διαλυμάτων και διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή τους.

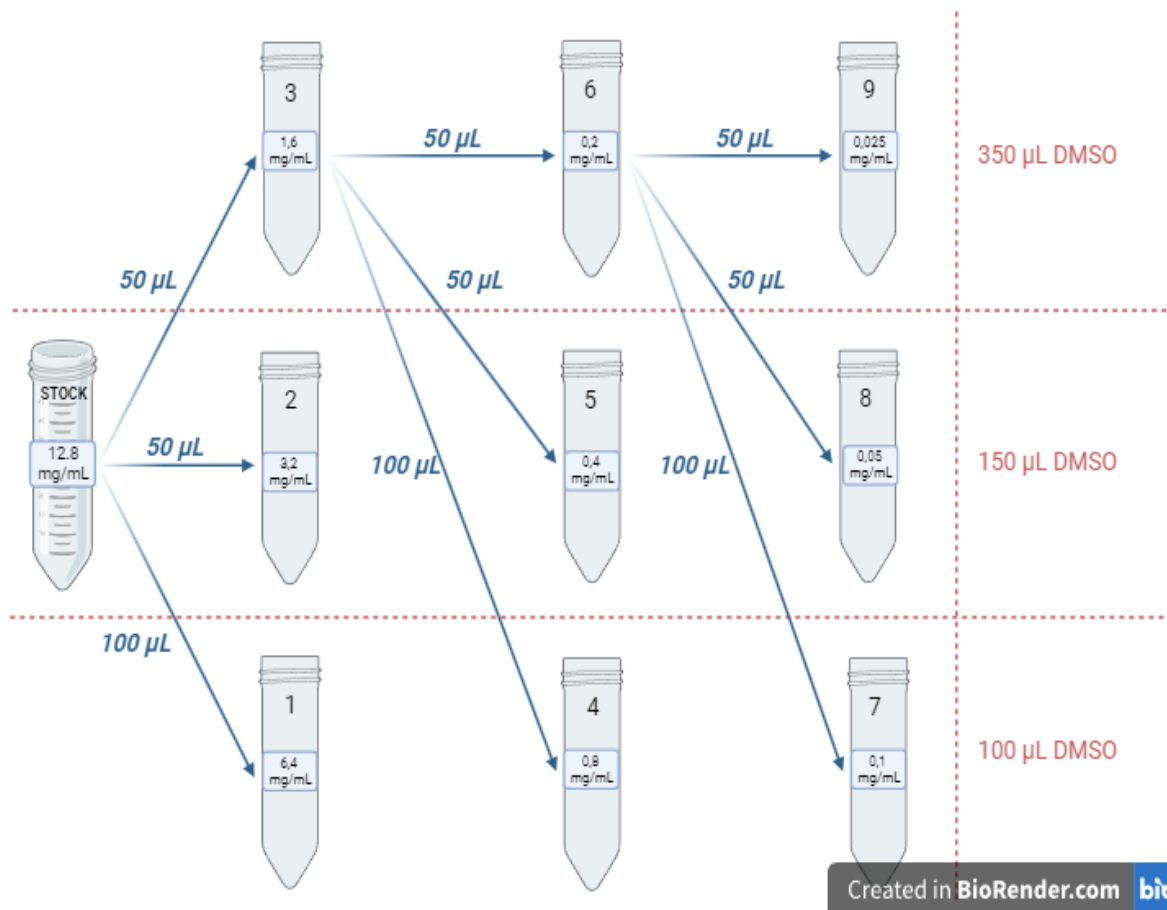
Αντιμυκητικός παράγοντας	Διαλύτης	Εύρος εξεταζόμενων συγκεντρώσεων (mg/L)	Συγκέντρωση stock διαλύματος (mg/mL)
Φλουκοναζόλη	DMSO	64 - 0,06	12,8
Ιτρακοναζόλη	DMSO	2 - 0,002	0,4
Μικοναζόλη	DMSO	2 - 0,002	0,4
Κετοκοναζόλη	DMSO	2 - 0,002	0,4
Φεντικοναζόλη	DMSO	2 - 0,002	0,4
Εκοναζόλη	DMSO	4 - 0,004	0,8
Κλοτριμαζόλη	DMSO	4 - 0,004	0,8
Βορικό οξύ	Νερό	6.400 - 6,25	25,6

Τα stock διαλύματα διατηρούνται σε μικρές ποσότητες σε αποστειρωμένα φιαλίδια πολυπροπυλενίου ή πολυαιθυλενίου σε συνθήκες βαθιάς κατάψυξης (≤ -70 °C) για διάστημα έως και 6 μηνών. Μόλις το διάλυμα ξεπαγώσει, θα πρέπει να χρησιμοποιείται την ίδια μέρα,

διαφορετικά να απορρίπτεται, καθώς είναι πιθανό η ουσία να έχει χάσει μέρος της δραστηριότητάς της [246].

4. Διαλύματα εργασίας αντιμυκητικών φαρμάκων

Για την παρασκευή των διαλυμάτων εργασίας των αντιμυκητικών που διαλύθηκαν με οργανικό διαλύτη χρησιμοποιήθηκε το πρότυπο ISO. Σύμφωνα με αυτό, πραγματοποιήθηκαν κατά ISO αραιώσεις του stock διαλύματος με το διαλύτη που αραιώθηκε εξ αρχής η καθαρή ουσία με σκοπό την παρασκευή μίας σειράς διαλυμάτων με συγκεντρώσεις 200 φορές υψηλότερες από τις τελικά εξεταζόμενες. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 100 μL από την εκάστοτε συγκέντρωση του φαρμάκου σε σωληνάρια που περιείχαν 9,9 mL θρεπτικού υλικού 2x. Με τον τρόπο αυτό το φάρμακο και ο διαλύτης αραιώνονται 1:100 στο θρεπτικό υλικό. Συνεπώς, στο στάδιο αυτό η συγκέντρωση του διαλύτη στα σωληνάρια θα είναι 1% και η συγκέντρωση του αντιμυκητικού θα είναι 2 φορές υψηλότερη από την τελικά εξεταζόμενη [246].

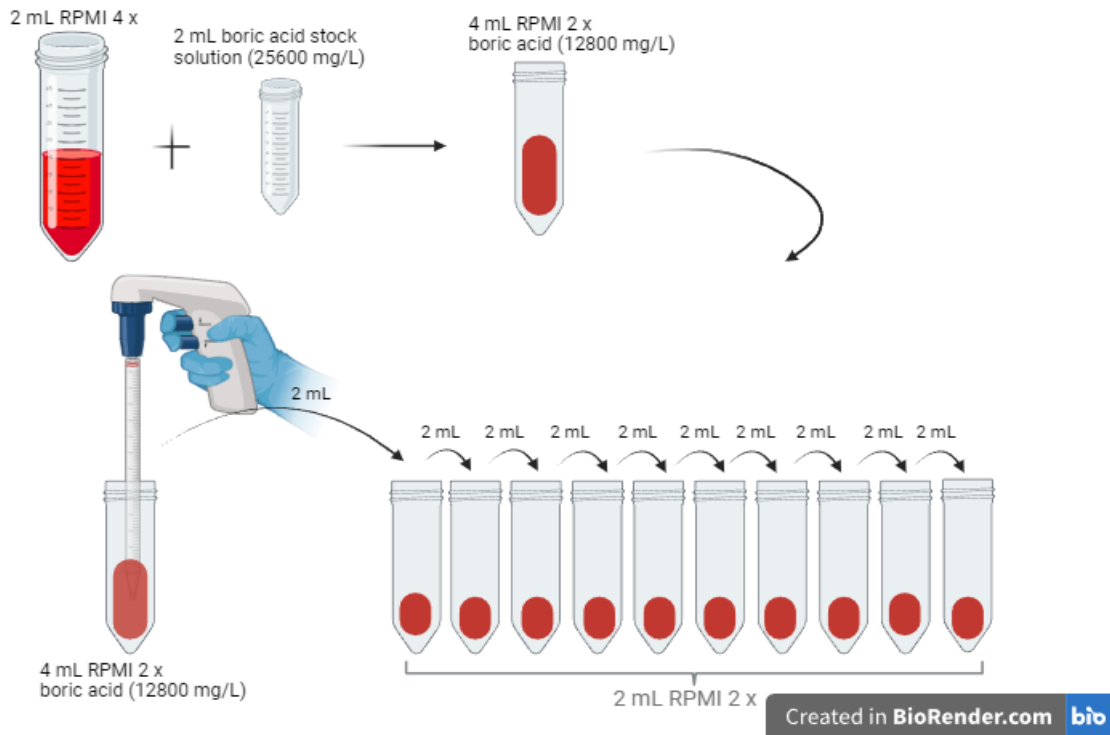


Εικόνα 25. Σχηματική αναπαράσταση της παρασκευής των κατά ISO αραιώσεων stock διαλύματος αντιμυκητικού, το οποίο διαλύεται σε οργανικό διαλύτη, με επιθυμητό εύρος εξεταζόμενων συγκεντρώσεων 64 - 0,125 mg/L.

Πίνακας 5. Πρότυπο ISO για την παρασκευή διαλυμάτων εργασίας αντιμυκητικού, το οποίο διαλύεται σε οργανικό διαλύτη, με επιθυμητό εύρος εξεταζόμενων συγκεντρώσεων 64 - 0,125 mg/L.

Βήμα	Συγκέντρωση (mg/L)	Πηγή	Όγκος φαρμάκου και διαλύτη (μL)	Ενδιάμεση συγκέντρωση (mg/L)	Συγκέντρωση κατόπιν 1:100 αραιώσης με θρεπτικό υλικό (mg/L)
1	12.800	Stock	200 + 0	12.800	128
2	12.800	Stock	100 + 100	6.400	64
3	12.800	Stock	50 + 150	3.200	32
4	12.800	Stock	50 + 350	1.600	16
5	1.600	Βήμα 4	100 + 100	800	8
6	1.600	Βήμα 4	50 + 150	400	4
7	1.600	Βήμα 4	50 + 350	200	2
8	200	Βήμα 7	100 + 100	100	1
9	200	Βήμα 7	50 + 150	50	0,5
10	200	Βήμα 7	50 + 350	25	0,25

Για την παρασκευή των διαλυμάτων εργασίας βορικού οξέος χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υλικό τετραπλάσιας ισχύος (4x) καθώς η αρχική διάλυση της ουσίας πραγματοποιήθηκε με νερό. Σύμφωνα με τα προαναφερθέντα, ως επιθυμητό εύρος των εξεταζόμενων συγκεντρώσεων του ορίστηκε το 6.400-6,25 mg/L. Έτσι, αραιώθηκαν αρχικά 2 mL stock διαλύματός του (25.600 mg/L) με 2 mL θρεπτικού υλικού 4x, οπότε και προέκυψε διάλυμα 12.800 mg/L σε θρεπτικό υλικό 2x. Έπειτα πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές υποδιπλάσιες αραιώσεις του νέου διαλύματος με θρεπτικό υλικό 2x μέχρι τη συγκέντρωση των 12,5 mg/L.



Εικόνα 26. Σχηματική αναπαράσταση της παρασκευής διαλυμάτων εργασίας βορικού οξέος.

5. Προετοιμασία των πλακών μικροαραιώσεων

Χρησιμοποιήθηκαν αποστειρωμένες πλάκες μικροτιτλοδότησης 96-βοθρίων, μιας χρήσης, ειδικά επεξεργασμένες για κυτταροκαλλιέργεια (tissue-culture treated), με επίπεδο πυθμένα και ονομαστική χωρητικότητα βοθρίου ~300 μ L (Thermo Scientific™, Αθήνα, Ελλάδα). Οι πλάκες έφεραν σε οριζόντια διάταξη τις διαδοχικές υποδιπλάσιες αραιώσεις του εκάστοτε αντιμυκητικού, ξεκινώντας από την υψηλότερη συγκέντρωση στη στήλη 1 και φτάνοντας στη χαμηλότερη στη στήλη 11. Τα βοθρία της στήλης 12 χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες ελέγχου της ανάπτυξης (growth control, GC) και περιείχαν θρεπτικό υλικό 2x χωρίς φάρμακο. Για την πλήρωση των πλακών με τα διαλύματα εργασίας χρησιμοποιήθηκαν πολυκάναλες πιπέτες ακριβείας, με τις οποίες διανεμήθηκαν 100 μ L από την εκάστοτε συγκέντρωση φαρμάκου.



Εικόνα 27. Διάταξη των πλακών μικροαραιώσεων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

Για την συντήρησή τους, οι πλάκες μπορούν να σφραγιστούν σε πλαστικές σακούλες ή αλουμινόχαρτο και να αποθηκευτούν σε συνθήκες κατάψυξης (≤ -70 °C για διάστημα έως και 6 μηνών ή -20 °C για όχι περισσότερο από 1 μήνα) χωρίς απώλεια της δραστηριότητας του φαρμάκου. Μετά την απόψυξή τους, δεν πρέπει να επανακαταψυχθούν, ενώ θα πρέπει να ενοφθαλμίζονται άμεσα, διότι σε περίπτωση παρατεταμένης παραμονής τους σε θερμοκρασία δωματίου υπάρχει η πιθανότητα ψευδούς αύξησης των τιμών MIC [246].

6. Προετοιμασία του εναιωρήματος και εμβολιασμός των πλακών μικροαραιώσεων

Η τυποποίηση του εναιωρήματος του μύκητα εξασφαλίζει ακρίβεια και επαναληψιμότητα στη δοκιμασία. Στην περίπτωση στελεχών *Candida* spp., ακολουθούνται τα εξής βήματα για την παρασκευή του [246]:

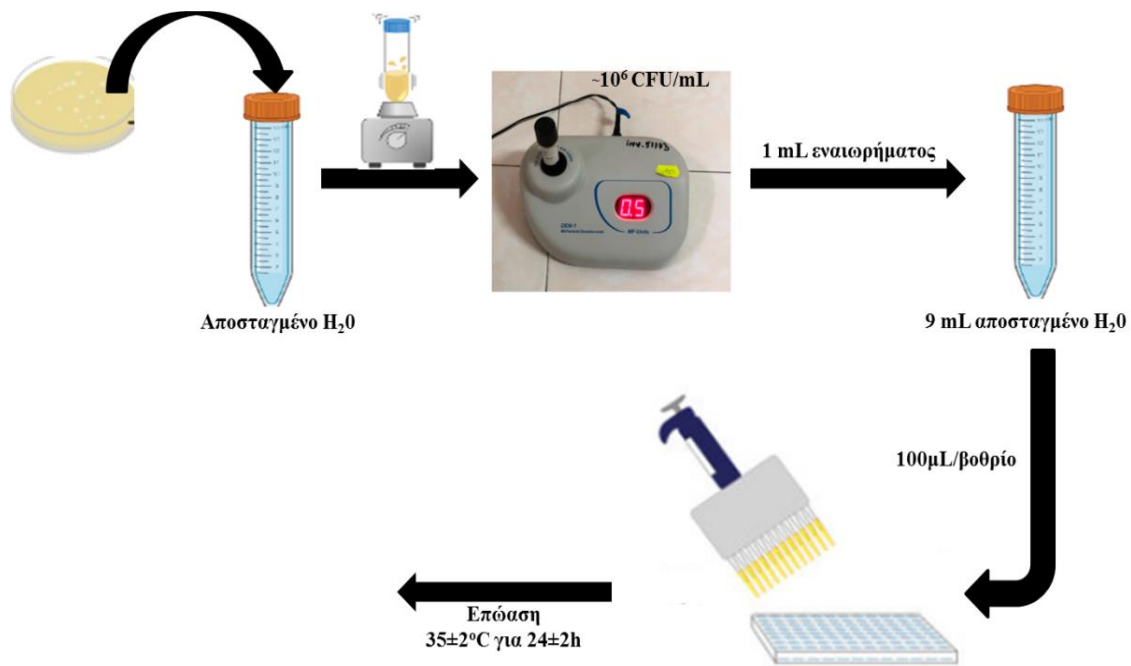
1. Τα στελέχη ανακαλλιεργούνται σε SDA ή άγαρ πατάτας στους 34-37 °C σε ατμοσφαιρικό αέρα για 18-48 ώρες.
2. Για την παρασκευή του εναιωρήματος χρησιμοποιούνται πέντε διακριτές αποικίες του κάθε στελέχους, διαμέτρου ≥ 1 mm, από καλλιέργειες 24 ωρών, οι οποίες ενοφθαλμίζονται σε τουλάχιστον 3 mL αποσταγμένου νερού.

3. Ακολουθεί ομογενοποίησή του με ανάδευση σε αναδευτήρα τύπου vortex (~2.000 rpm, 15 sec).

4. Στη συνέχεια, η πυκνότητά του προσαρμόζεται ώστε να αντιστοιχεί σε αυτή ενός πρότυπου διαλύματος 0,5 McFarland ($1-5 \times 10^6$ CFU/mL) είτε φωτομετρικά σε μήκος κύματος 530 nm είτε με τη χρήση θολωσίμετρου.

5. Τέλος, το εναιώρημα αραιώνεται 1:10 με αποσταγμένο νερό.

Το εναιώρημα θα πρέπει να ενοφθαλμίζεται στις πλάκες εντός 30 λεπτών από την παρασκευή του, προκειμένου να παραμείνει σταθερή η βιωσιμότητα των κυττάρων του μύκητα σε αυτό. Κατόπιν ανάδυσής του, ενοφθαλμίζονται με τη βοήθεια πολυκάναλης πιπέτας ακριβείας 100 μ L του σε μία σειρά βοθρίων που περιέχουν τις διαδοχικές υποδιπλάσιες αραιώσεις του φάρμακο σε θεραπευτικό υλικό 2 \times σε συγκεντρώσεις διπλάσιες από τις τελικά εξεταζόμενες (100 μ L ανά βοθρίο) και στο αντίστοιχο βοθρίο GC (100 μ L θεραπευτικού υλικού 2 \times). Έτσι, στο στάδιο αυτό η συγκέντρωση του οργανικού διαλύτη στα βοθρία θα είναι 0,05%, η συγκέντρωση του αντιμυκητικού θα είναι η τελικά εξεταζόμενη, η συγκέντρωση του εναιωρήματος θα είναι $0,5-2,5 \times 10^5$ CFU/mL και η συγκέντρωση του θεραπευτικού υλικού θα είναι 1 \times . Τέλος, οι πλάκες μικροαραιώσεων επωάζονται, χωρίς ανάδευση, στους 35 ± 2 °C σε ατμοσφαιρικό αέρα για 24 ± 2 ώρες [246].



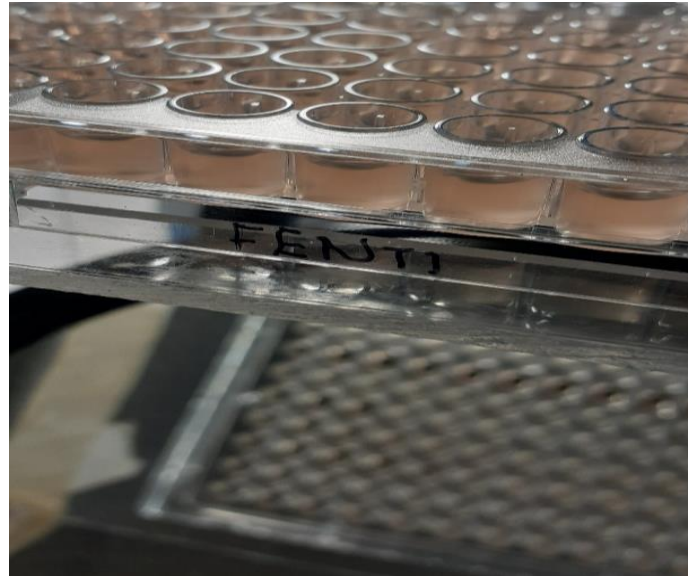
Εικόνα 28. Σχηματική αναπαράσταση της παρασκευής εναιωρήματος στελεχών *Candida spp.* και του ενοφθαλμισμού των πλακών μικροαραιώσεων.

7. Προσδιορισμός των τιμών MIC και ερμηνεία τους

Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της EUCAST, οι MICs αντιμυκητικών παραγόντων έναντι ζυμομυκήτων προσδιορίζονται φωτομετρικά. Συνιστάται η μέτρηση της απορρόφησης των πλακών μικροαραιώσεων στα 530 nm, αν και μπορούν εναλλακτικά να χρησιμοποιηθούν και διαφορετικά μήκη κύματος, όπως για παράδειγμα αυτά των 405 ή 450 nm [246]. Η αντικειμενικότητα, η ταχύτητα και η ευκολία είναι τα κύρια πλεονεκτήματα της αυτοματοποιημένης αυτής μεθόδου ανάγνωσης των πλακών.

Στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης, χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Infinite® M200 (Tecan, Αθήνα, Ελλάδα) που διαθέτει μονοχρωμάτορα έναντι οπτικών φίλτρων για την επιλογή του επιθυμητού μήκους κύματος και οι μετρήσεις έλαβαν χώρα στα 540 nm. Το συνοδευτικό πακέτο λογισμικού Magellan PRO επιτρέπει την αποθήκευση των δεδομένων των μετρήσεων και το σχεδιασμό προγραμμάτων λειτουργίας. Ταυτόχρονα, η μυκητική ανάπτυξη συναξιολογήθηκε και οπτικά παρατηρώντας τον πυθμένα των πλακών με τη βοήθεια ανάστροφου καθρέφτη για την αποφυγή τυχαίων σφαλμάτων κατά τη

φωτομέτρησή τους, τα οποία οφείλονται συνήθως στη δημιουργία συσσωματωμάτων των μυκήτων ή σε επιμολύνσεις από βακτήρια.



Εικόνα 29. Οπτική αξιολόγηση της ανάπτυξης *Candida spp.* σε πλάκα μικροαραιώσεων φεντικοναζόλης με τη βοήθεια ανάστροφου καθρέφτη.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι τιμές απορρόφησης $\leq 0,2$ υποδηλώνουν ανεπαρκή ανάπτυξη του παθογόνου. Σε αυτή την περίπτωση, οι πλάκες 96-βοθρίων θα πρέπει να επωάζονται για επιπλέον 12 - 24 ώρες και να φωτομετρούνται εκ νέου. Αποτυχία επίτευξης τιμής απορρόφησης τουλάχιστον 0,2 μετά από 48 ώρες επώασης υποδεικνύει ανεπιτυχή δοκιμασία [246].

Στην περίπτωση των ζυμομυκήτων, η MIC των αντιμυκητικών, με εξαίρεση αυτή της αμφοτερικίνης Β, ορίζεται ως η χαμηλότερη συγκέντρωση φαρμάκου που προκαλεί $\geq 50\%$ αναστολή της μυκητικής ανάπτυξης συγκριτικά με την ανάπτυξη που καταγράφεται στο GC. Συγκεκριμένα, το ποσοστό της ανάπτυξης του μύκητα στο εκάστοτε βοθρίο που περιέχει φάρμακο υπολογίζεται σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\% \text{ Ανάπτυξη} = \frac{A \text{ βοθρίου} - A \text{ υποβάθρου}}{A \text{ βοθρίου χωρίς φάρμακο} - A \text{ υποβάθρου}} \times 100$$

όπου A: απορρόφηση και υπόβαθρο: βοθρίο που περιέχει 100 μL φαρμάκου σε θρεπτικό υλικό 2x και 100 μL αποσταγμένου νερού (τυφλό δείγμα).

Υπόβαθρο													
	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	GC	
Στέλεχος 1	0,0863	0,0866	0,0882	0,086	0,0861	0,0863	0,0858	0,0883	0,0863	0,0853	0,0862	0,0862	
Στέλεχος 2	0,0862	0,0887	0,0863	0,0859	0,0866	0,087	0,0864	0,0867	0,0857	0,0882	0,0862	0,0858	
Στέλεχος 3	0,086	0,0867	0,0868	0,0919	0,087	0,0868	0,0864	0,0882	0,0872	0,0871	0,0863	0,0851	
Στέλεχος 4	0,0867	0,0859	0,0878	0,0905	0,0907	0,0877	0,087	0,0882	0,0886	0,0871	0,09	0,0866	
Ενοφθαλμισμένη πλάκα													
	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	GC	
Στέλεχος 1	0,0888	0,0872	0,0931	0,0887	0,0902	0,1362	0,2815	0,4102	0,4755	0,6288	0,6481	0,6852	
Στέλεχος 2	0,0916	0,0883	0,088	0,0897	0,0911	0,1177	0,2026	0,3339	0,3771	0,4325	0,4246	0,4868	
Στέλεχος 3	0,0876	0,0864	0,089	0,0938	0,1195	0,2241	0,3479	0,4226	0,4523	0,5108	0,5025	0,5848	
Στέλεχος 4	0,0867	0,0872	0,0922	0,1264	0,1527	0,2084	0,2554	0,2863	0,3324	0,3698	0,3578	0,3861	
Ενοφθαλμισμένη πλάκα - Υπόβαθρο													
	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	GC	
Στέλεχος 1	0,0025	0,0006	0,0049	0,0027	0,0041	0,0499	0,1957	0,3219	0,3892	0,5435	0,5619	0,599	
Στέλεχος 2	0,0054	-0,0004	0,0017	0,0038	0,0045	0,0307	0,1162	0,2472	0,2914	0,3443	0,3384	0,401	
Στέλεχος 3	0,0016	-0,0003	0,0022	0,0019	0,0325	0,1373	0,2615	0,3344	0,3651	0,4237	0,4162	0,4997	
Στέλεχος 4	0	0,0013	0,0044	0,0359	0,062	0,1207	0,1684	0,1981	0,2438	0,2827	0,2678	0,2995	
	MIC (mg/L)												
% Ανάπτυξη	0%	0%	1%	0%	1%	8%	33%	54%	65%	91%	94%	100%	1
	1%	0%	0%	1%	1%	8%	29%	62%	73%	86%	84%	100%	1
	0%	0%	0%	0%	7%	27%	52%	67%	73%	85%	83%	100%	2
	0%	0%	1%	12%	21%	40%	56%	66%	81%	94%	89%	100%	2

Εικόνα 30. Φωτομετρικός προσδιορισμός EUCAST MICs ζυμομυκήτων λαμβάνοντας υπόψη το ποσοστό ανάπτυξης των παθογόνων σε διαδοχικές υποδιπλάσιες αραιώσεις αντιμυκητικού.

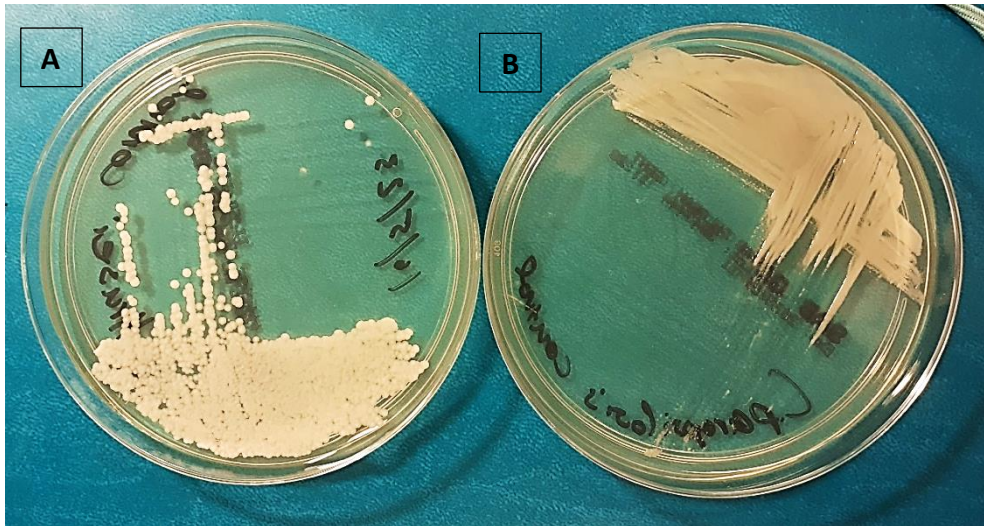
Οι τιμές MIC που λαμβάνονται χρησιμοποιούνται για την κατηγοριοποίηση των στελεχών σύμφωνα με τα CBPs και τα ECOFFs που έχει θεσπίσει η EUCAST για τον εκάστοτε συνδυασμό *Candida spp.*-αντιμυκητικού παράγοντα [5].

8. Ποιοτικός έλεγχος των πλακών μικροαραιώσεων

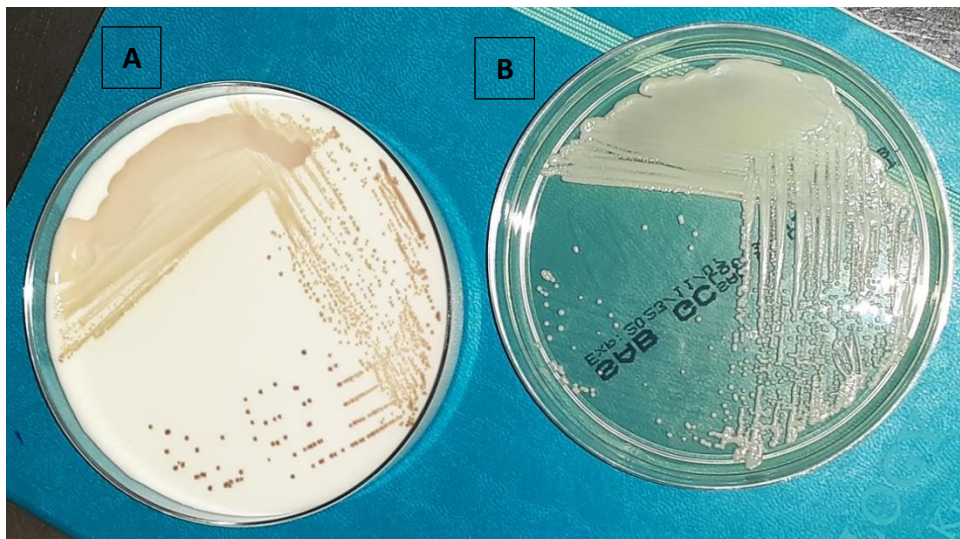
Η αξιοπιστία των εξαγόμενων αποτελεσμάτων θα πρέπει να ελέγχεται πάντα συμπεριλαμβάνοντας σε κάθε δοκιμασία πρότυπα στελέχη. Πρόκειται για καλά χαρακτηρισμένα στελέχη, με σταθερά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά και καθορισμένα προφίλ ευαισθησίας στα αντιμυκητικά. Ειδικότερα, συνιστάται η χρήση τουλάχιστον ενός τέτοιου στελέχους ανά δοκιμασία, με τις τιμές MIC να πρέπει να βρίσκονται εντός του καθιερωμένου εύρους συγκεντρώσεων. Εάν για περισσότερες από 1/20 δοκιμασίες η MIC είναι εκτός εύρους, η πηγή του σφάλματος πρέπει να διερευνηθεί. Επιπλέον, κάθε νέα παρτίδα θρεπτικού υλικού και πλακών μικροαραιώσεων θα πρέπει να ελέγχεται με τουλάχιστον δύο πρότυπα στελέχη [246].

Η EUCAST προτείνει ως πρότυπα στελέχη μεταξύ άλλων τις *C. krusei* ATCC 6258 και *C. parapsilosis* ATCC 22019 [248]. Τα συγκεκριμένα συμπεριλήφθηκαν στην παρούσα μελέτη αφενός γιατί ανήκουν στα *Candida* spp. που απομονώνονται από τον κόλπο γυναικών με VVC και αφετέρου επειδή καλύπτουν ένα αντιπροσωπευτικό εύρος τιμών MIC των υπό μελέτη αντιμυκητικών παραγόντων για τα οποία έχουν καθιερωθεί όρια ευαισθησίας.

Κατά κανόνα, τα πρότυπα στελέχη αποθηκεύονται σε συνθήκες βαθιάς κατάψυξης (≤ -60 °C). Οι ανακαλλιέργειες τους σε SDA ή άγαρ πατάτας μπορούν να διατηρηθούν σε συνθήκες ψύξης (2-8 °C) για διάστημα έως και 2 εβδομάδων, μετά το πέρας των οποίων συστήνεται η εκ νέου ανακαλλιέργεια κατεψυγμένου δείγματος. Συγχρόνως, συνιστάται και η ταυτόχρονη ανακαλλιέργεια τους σε χρωμογόνα θρεπτικά υλικά προκειμένου να διασφαλιστεί η καθαρότητά τους [246].



Εικόνα 31. Ανακαλλιέργειες των πρότυπων στελεχών (A) *C. krusei* ATCC 6258 και (B) *C. parapsilosis* ATCC 22019 σε SDA μετά από επώαση στους 35 ± 2 °C για 24 ώρες.



Εικόνα 32. Ανακαλλιέργειες του πρότυπου στελέχους *C. parapsilosis* ATCC 22019 σε A) χρωμογόνο θρεπτικό υλικό και B) SDA μετά από επώαση στους 35 ± 2 °C για 48 ώρες.

2.2.6 Ανάλυση δεδομένων

Η συχνότητα εμφάνισης των VVC και RVVC εκφράστηκε ως η αναλογία των αντίστοιχων περιστατικών ως προς το συνολικό αριθμό των γυναικών που επισκέφτηκαν το

διαγνωστικό κέντρο στη διάρκεια της μελέτης. Η σύγκριση των κατηγορικών μεταβλητών πραγματοποιήθηκε με την ακριβή δοκιμασία του Fisher (Fisher's exact test), ενώ οι ποσοτικές μεταβλητές συγκρίθηκαν με t-test. Σε κάθε περίπτωση, μια τιμή $p < 0,05$ θεωρήθηκε ότι υποδεικνύει μια στατιστικά σημαντική διαφορά. Επιπλέον, υπολογίστηκαν το εύρος τιμών των MICs, η επικρατούσα τιμή τους, ο γεωμετρικός μέσος όρος τους (geometric mean, GM), οι τιμές MIC₅₀ και MIC₉₀ (οι MICs που ανέστειλαν την ανάπτυξη του 50% και του 90% των στελεχών, αντίστοιχα) και το ποσοστό ανοχής/non-WT φαινοτύπου για κάθε συνδυασμό *Candida* spp.-αντιμυκητικού παράγοντα σύμφωνα με τα EUCAST CBPs και ECOFFs [5]. Για όσους συνδυασμούς δεν υπήρχαν διαθέσιμα όρια ευαισθησίας, προσδιορίστηκε η αντίστοιχη τιμή ECOFF για όρια εμπιστοσύνης 97,5% και 99% χρησιμοποιώντας το δωρεάν διαθέσιμο στην ιστοσελίδα της EUCAST πρόγραμμα ECOFFinder [249]. Τέλος, για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων που ελήφθησαν κατά τον *in vitro* έλεγχο ευαισθησίας σε pH 7,0 και 4,5, υπολογίστηκαν η βασική συμφωνία (essential agreement, EA) τους εντός ± 1 διαδοχικής διπλής (\log_2) αραίωσης και η κατηγορική συμφωνία τους (categorical agreement, CA) [5]. Προκειμένου να συμβεί αυτό, οι υψηλές τιμές MIC εκτός κλίμακας (off-scale) μετατράπηκαν στην επόμενη υψηλότερη διαδοχική διπλή συγκέντρωση, ενώ οι χαμηλές τιμές MIC εκτός κλίμακας παρέμειναν αμετάβλητες.

Τα δεδομένα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το στατιστικό λογισμικό πρόγραμμα GraphPad Prism, έκδοση 8.0, για Windows (GraphPad Software, Σαν Ντιέγκο, Καλιφόρνια, ΗΠΑ).

Πίνακας 6. EUCAST CBPs και ECOFFs για όσους από τους συνδυασμούς *Candida spp.*-αντιμυκητικού που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη είναι διαθέσιμα [5].

<i>Candida spp.</i>	Αντιμυκητικό	ECOFF (mg/L)		CBP (mg/L)	
		WT (\leq)	S \leq	I	R >
<i>C. albicans</i>	Φλουконаζόλη	0,5	2	4	4
	Ιτρακοναζόλη	0,03	0,06		0,06
<i>C. glabrata</i>	Φλουконаζόλη	16	0,001	≤ 16	16
	Ιτρακοναζόλη	2	ΜΔ		ΜΔ
<i>C. krusei</i>	Φλουконаζόλη	128	ΜΔ		ΜΔ
	Ιτρακοναζόλη	1	ΜΔ		ΜΔ
<i>C. parapsilosis</i>	Φλουконаζόλη	2	2	2	4
	Ιτρακοναζόλη	0.125	0.125		0.125
<i>C. lusitaniae</i>	Ιτρακοναζόλη	0.125	ΜΔ		ΜΔ

Συντμήσεις: ΜΔ μη διαθέσιμο, S (susceptible) ευαίσθητο, I (susceptible, increased exposure) ευαίσθητο σε αυξημένη έκθεση, R (resistant) ανθεκτικό.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Βιβλιογραφική ανασκόπηση της επιδημιολογίας της VVC στην Ελλάδα

Η ανασκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας με σκοπό την αποτύπωση της επιδημιολογικής εικόνας της VVC στη χώρα μας οδήγησε στην ανάκτηση 8 δημοσιεύσεων [250] [251] [96] [252] [253] [254] [255] [256]. Συγκεκριμένα, μια εξ αυτών αφορούσε αποκλειστικά στον προσδιορισμό της *in vitro* ευαισθησίας κλινικών στελεχών *Candida spp.*, τα οποία είχαν απομονωθεί από ελληνίδες ασθενείς, σε συγκεκριμένους αντιμυκητικούς παράγοντες, χωρίς να παρέχονται περαιτέρω πληροφορίες [256]. Λαμβάνοντας, λοιπόν, υπόψη τις εναπομείνουσες 7, οι περίοδοι διεξαγωγής τους κάλυψαν τα έτη 1986 έως 2020 (4/7 πριν από το 2010). Στη συντριπτική πλειοψηφία (6/7) τους ανέφεραν δεδομένα από μεμονωμένα κέντρα, εκ των οποίων 5 στην περιοχή της Αττικής και 1 στην Κρήτη, ενώ υπήρξε 1 μελέτη δύο κέντρων εντοπισμένων στην Αθήνα και στην Κρήτη. Επιπλέον, 6/7 μελέτες πραγματοποιήθηκαν σε πανεπιστημιακά νοσοκομεία τριτοβάθμιας φροντίδας, ενώ 1 διενεργήθηκε σε ιδιωτική γυναικολογική κλινική.

Αναφορικά με τον υπό μελέτη πληθυσμό, 2/7 διεξήχθησαν σε συμπτωματικές ανήλικες γυναίκες, 2/7 σε συμπτωματικές ενήλικες γυναίκες, 1/7 σε συμπτωματικές γυναίκες ανεξαρτήτου ηλικίας, 1/7 σε γυναίκες με επιβεβαιωμένη αιδοιοκολπίτιδα ανεξαρτήτου ηλικίας και 1/7 σε συμπτωματικές γυναίκες ηλικίας 15-60 έτη. Η συχνότητα εμφάνισης της VVC ανεξαρτήτως πληθυσμιακής ομάδας κυμαινόταν μεταξύ 7% και 32% (μέσος όρος 14%). Ειδικότερα, η συχνότητα εμφάνισης της νόσου ήταν παρόμοια σε συμπτωματικές ενήλικες (12-32%, μέσος όρος 15%) και ανήλικες (7-20%, μέσος όρος 13%) ασθενείς. Τα αντίστοιχα διαθέσιμα ποσοστά για RVVC ήταν περιορισμένα, με μόλις 2/7 μελέτες να αναφέρουν συχνότητα εμφάνισης 5% και 8% σε συμπτωματικές ενήλικες και ανεξαρτήτου ηλικίας γυναίκες, αντίστοιχα.

Πίνακας 7. Συχνότητα εμφάνισης της VVC στην Ελλάδα όπως περιγράφεται σε διάφορες μελέτες, οι οποίες παρουσιάζονται με χρονολογική σειρά.

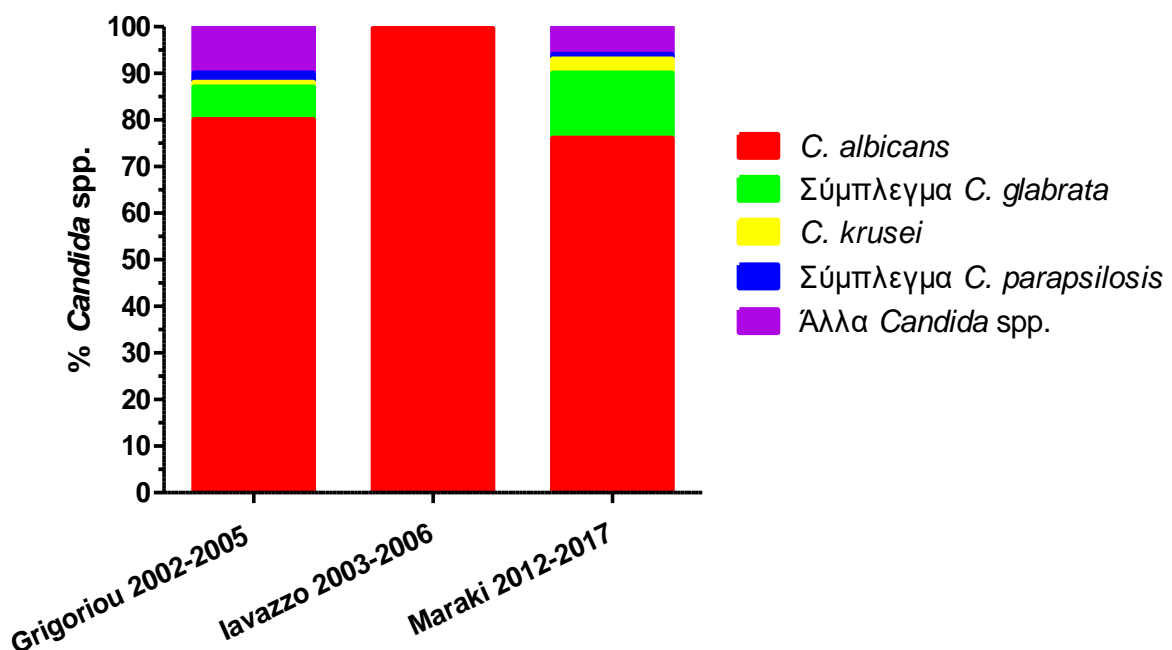
Αναφορά	Είδος μελέτης (χρονική περίοδος, τόπος)	Πληθυσμιακή ομάδα (αριθμός ασθενών)	Συχνότητα εμφάνισης VVC RVVC
[250]	Ενός κέντρου (1986, Αθήνα)	Συμπτωματικές γυναίκες 15 - 60 ετών, χωρίς παράγοντες κινδύνου (n = 238)	58/238 (24%) ΔΑ
[251]	Δύο κέντρων (1997, Αθήνα-Κρήτη)	Συμπτωματικές γυναίκες 0,08 - 18 ετών (n = 2.076)	409/2.076 (20%) ΔΑ
[96]	Ενός κέντρου (2002-2005, Αθήνα)	Συμπτωματικές γυναίκες ανεξαρτήτου ηλικίας (n = 4.743)	576/4.743 (12%) 49/576 (8%)
[252]	Ενός κέντρου (2003-2006, Αθήνα)	Συμπτωματικές γυναίκες 18 - 57 ετών (n = 1.632)	530/1.632 (32%) ΔΑ
[253]	Ενός κέντρου (2015-2016, Αθήνα)	Γυναίκες με επιβεβαιωμένη αιδοιοκολπίτιδα ανεξαρτήτου ηλικίας (n = 163)	36/163 (22%) ΔΑ
[254]	Ενός κέντρου (2012-2017, Κρήτη)	Συμπτωματικές γυναίκες 18 - 89 ετών (n = 10.256)	1.217/10.256 (12%) 62/1.217 (5%)
[255]	Ενός κέντρου (2009-2020, Αθήνα)	Συμπτωματικές γυναίκες 2 - 16 ετών (n = 2.314)	152/2.314 (7%) ΔΑ

Συντμήσεις: ΔΑ δεν αναφέρεται.

Αξίζει να σημειωθεί πως διεξοδική συγκριτική ανάλυση της επίδρασης μιας σειράς παραγόντων για την εμφάνιση της νόσου από *C. albicans* ή non-*albicans Candida* spp.

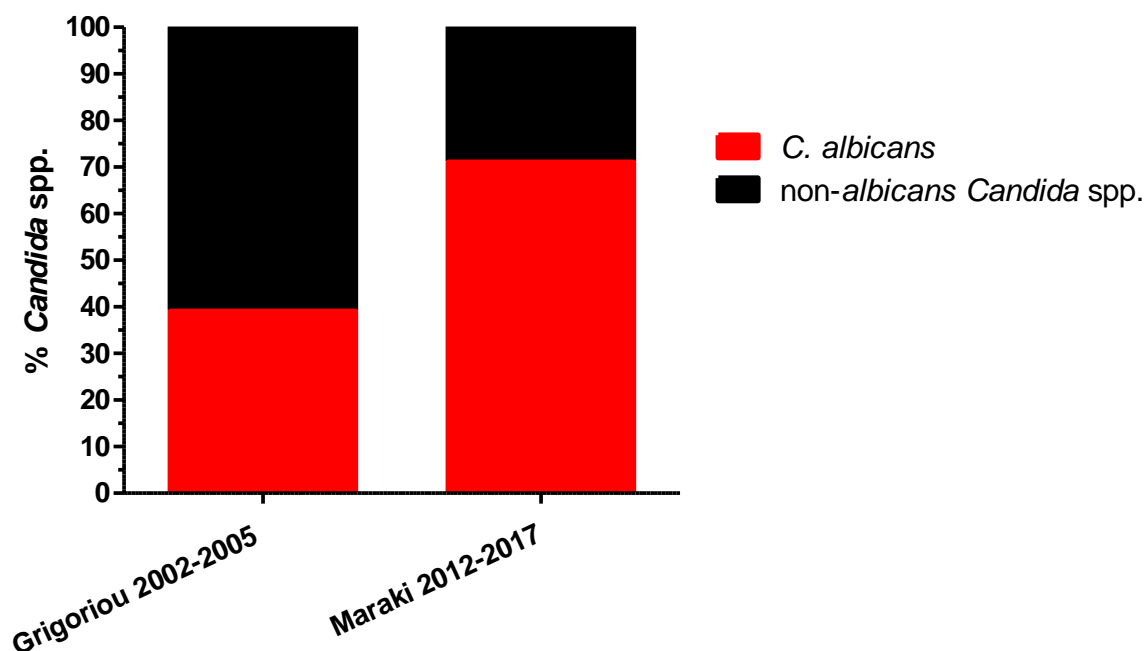
πραγματοποιήθηκε σε μόλις μια μελέτη [96]. Έτσι, λοιμώξεις από non-*albicans Candida* spp. απαντήθηκαν σε μεγαλύτερη μερίδα γυναικών που είχαν λάβει αντιβιοτικά πρόσφατα (63% έναντι 59%), χρησιμοποιούσαν κάποια μέθοδο αντισύλληψης (54% έναντι 45%) ή έπασχαν από ΣΔ (18% έναντι 8%). Από την άλλη πλευρά, έγκυες ασθενείς παρουσίαζαν συχνότερα VVC από *C. albicans* (49% έναντι 43%), ενώ το προηγούμενο ιστορικό καρκίνου και η εμμηνόπαυση φάνηκε να μην επηρεάζουν τη διασπορά του είδους του παθογόνου (συχνότητα εμφάνισης 9-10% και 5% ανεξαρτήτως του είδους του παθογόνου, αντίστοιχα).

Επιπλέον, λεπτομερής καταγραφή της ταυτότητας του παθογόνου πραγματοποιήθηκε σε μόλις 3/7 μελέτες [96] [252] [254]. Συνολικά, ο κύριος αιτιολογικός παράγοντας της VVC ήταν η *C. albicans* (76-99,6%), ακολουθούμενη από είδη του συμπλέγματος *C. glabrata* (0,2-14%), *C. krusei* (0-3%) και είδη του συμπλέγματος *C. parapsilosis* (0-2%). Τα καταγεγραμμένα περιστατικά VVC από άλλα *Candida* spp., όπως *C. ciferrii*, *C. dubliniensis*, *C. famata*, *C. inconspicua*, *C. kefyr*, *C. lipolytica*, *C. lusitaniae*, *C. norvegiensis*, *C. rugosa* και *C. tropicalis*, ήταν σπάνια (< 1% ανά είδος).



Εικόνα 33. Κατανομή *Candida* spp. σε καταγεγραμμένα περιστατικά VVC στην Ελλάδα.

Από την άλλη πλευρά, η εικόνα της κατανομής των *Candida* spp. σε περιπτώσεις RVVC δεν ήταν ξεκάθαρη. Συγκεκριμένα, οι Maraki et al. ανέφεραν πως η *C. albicans* ήταν το πρώτο (71%) σε συχνότητα απομόνωσης παθογόνο σε συμπτωματικές ενήλικες γυναίκες [254] σε αντίθεση με τους Grigoriou et al. που έδειξαν πως είδη non-*albicans* ευθύνονταν για την πλειοψηφία (61%) των περιστατικών σε συμπτωματικές γυναίκες ανεξαρτήτου ηλικίας [96].



Εικόνα 34. Κατανομή *Candida* spp. σε καταγεγραμμένα περιστατικά RVVC στην Ελλάδα.

Σημειωτέον, η ταυτοποίηση των προαναφερθέντων κλινικών στελεχών είχε βασιστεί σε δοκιμασίες ζύμωσης/αφομοίωσης σακχάρων με τη χρήση χειροκίνητων (API 20, BioMérieux) ή αυτοματοποιημένων (Vitek 2, BioMérieux) συστημάτων.

Τέλος, τα δεδομένα της *in vitro* ευαισθησίας ελληνικών στελεχών σε αντιμυκητικούς παράγοντες είναι περιορισμένα και ορισμένα από αυτά αντικρουόμενα. Ειδικότερα, οι Maraki et al. ανέφεραν ποσοστά αντοχής στη φλουконаζόλη 4% για *C. albicans* και 1% για *C. glabrata* [254], ενώ οι Antonopoulou et al. έδειξαν πως τα ποσοστά των ανθεκτικών στη φλουконаζόλη στελεχών *C. albicans* και *C. glabrata* ήταν 7% και 45%, αντίστοιχα [256]. Επίσης, τα ποσοστά αντοχής/non-WT φαινότυπου της *C. albicans* στην αμφοτερικίνη Β, στη βορικοναζόλη και στη φλουκυτοσίνη ήταν 0,2%, 1% και 3%, αντίστοιχα. Δεν εντοπίστηκαν

στελέχη που ανήκαν σε είδη non-*albicans* και ήταν non-WT στην αμφοτεरिकίνη, ενώ το 3% και 1% των στελεχών *C. glabrata* ήταν ανθεκτικά/non-WT στη βορικοναζόλη και στη φλουκυτοσίνη, αντίστοιχα [254]. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί πως κανένα από τα 3 προαναφερθέντα αντιμυκητικά δεν έχει ένδειξη για τη θεραπεία της VVC.

3.2 Δημογραφικά στοιχεία των ασθενών της παρούσας μελέτης, προδιαθεσικοί παράγοντες και συχνότητα εμφάνισης της λοίμωξης

Η συχνότητα εμφάνισης των VVC και RVVC μεταξύ των 1.300 συμπτωματικών ενήλικων γυναικών που συμπεριλήφθηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν 18% (233/1.300) και 5% (11/233), αντίστοιχα. Η μέση (εύρος) ηλικία των ασθενών ήταν τα 37 (20 - 69) έτη, με την πλειονότητα (185/233, 79%) αυτών να βρίσκονται σε αναπαραγωγική ηλικία (< 48 ετών) [257]. Εγκυμοσύνη υπήρξε σε μια μικρή μερίδα των ασθενών (7/233, 3%).

Αξίζει να σημειωθεί πως σε περισσότερες από τις μισές γυναίκες (156/233, 67%) παρατηρήθηκε διαταραχή της φυσιολογικής μικροχλωρίδας του κόλπου, με ανίχνευση περιορισμένου αριθμού γαλακτοβακίλλων κατά τη μικροσκόπηση των κολπικών εκκρίσεων. Επίσης, σε ένα μεγάλο ποσοστό των ασθενών (168/233, 72%) διαπιστώθηκε συνλοίμωξη με άλλα μικρόβια, ως επί το πλείστον βακτήρια. Συγκεκριμένα, απομονώθηκαν *Ureaplasma urealyticum* (51/233, 22%), αναερόβια βακτήρια (48/233, 21%), *Enterobacterales* (46/233, 20%), *Streptococcus agalactiae* (42/233, 18%), *Chlamydia trachomatis* (31/233, 13%), *Staphylococcus* spp. (22/233, 9%), *Enterococcus* spp. (15/233, 6%) και *Mycoplasma genitalium* (6/233, 3%). Σε μικρότερο βαθμό παρατηρήθηκε συνλοίμωξη με ιογενή ΣΜΝ [2/233, 0,9% ιός των ανθρώπινων θηλωμάτων (human papillomavirus, HPV) και 1/233, 0,4% ιός του απλού έρπητα τύπου 2 (herpes simplex virus type 2, HSV-2)].

Σημειωτέον, οι μισές γυναίκες (130/233, 56%) είχαν πρόσφατα λάβει φαρμακευτική αγωγή με αντιβιοτικά (έως 1 μήνα πριν την επίσκεψή τους στο εργαστήριο). Επιπροσθέτως, 43/233 (18%) είχαν λάβει προηγούμενη αντιμυκητική θεραπεία, με ή χωρίς ιατρική συνταγή. Ειδικότερα, 26/43 (60%) είχαν λάβει από του στόματος φλουκοναζόλη [15/26 (58%) ως μονοθεραπεία, 7/26 (27%) σε συνδυασμό με τοπικά σκευάσματα αζολών και 4/26 (15%) σε συνδυασμό με από του στόματος ιτρακοναζόλη και/χωρίς τοπικά σκευάσματα αζολών].

Επιπλέον, 7/43 (16%) είχαν λάβει από του στόματος ιτρακοναζόλη [4/7 (57%) σε συνδυασμό με από του στόματος φλουκοναζόλη και/χωρίς τοπικά σκευάσματα αζολών, 2/7 (29%) ως μονοθεραπεία και 1/7 (14%) σε συνδυασμό με τοπική χρήση φεντικοναζόλης]. Τέλος, 24/43 (56%) είχαν χρησιμοποιήσει τοπικά αντιμυκητικά σκευάσματα [23/24 (96%) αζολών και 1/24 (4%) κυκλοπιροξολαμίνης]. Λαμβάνοντας υπόψη μόνο τα 11 περιστατικά RVVC, μόλις 6/11 (55%) ασθενείς ανέφεραν προηγούμενη λήψη αντιμυκητικής θεραπείας, συγκεκριμένα συστηματική χορήγηση φλουκοναζόλης είτε ως μονοθεραπεία (2/6, 33%) είτε συνδυαστικά με τοπικά σκευάσματα αζολών (3/6, 50%) ή από του στόματος ιτρακοναζόλη (1/6, 17%).

Πίνακας 8. Χαρακτηριστικά των ασθενών της παρούσας μελέτης.

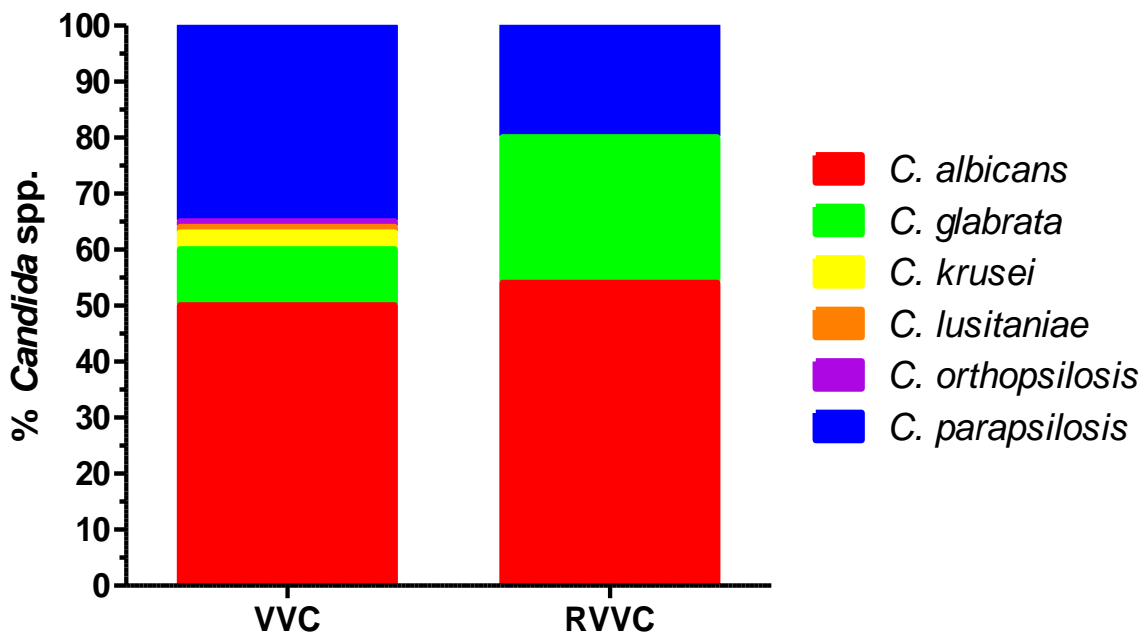
Παράγοντας	Συχνότητα εμφάνισης
Ηλικία	
Αναπαραγωγική ηλικία (< 48 ετών)	185/233 (79%)
Περι-/Μετ-εμμηνόπαυση	48/233 (21%)
Εγκυμοσύνη	7/233 (3%)
Κολπική μικροχλωρίδα	
Φυσιολογική	77/233 (33%)
Διαταραγμένη	156/233 (67%)
Συνλοίμωξη	168/233 (72%)
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	51/233 (22%)
Αναερόβια βακτήρια	48/233 (21%)
<i>Enterobacterales</i>	46/233 (20%)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	42/233 (18%)
<i>Chlamydia trachomatis</i>	31/233 (13%)
<i>Staphylococcus</i> spp.	22/233 (9%)
<i>Enterococcus</i> spp.	15/233 (6%)
<i>Mycoplasma genitalium</i>	6/233 (3%)
HPV	2/233 (0,9%)
HSV-2	1/233 (0,4%)
Λήψη αντιβιοτικών προ μηνός	130/233 (56%)
Προηγούμενη λήψη αντιμυκητικών	43/233 (18%)
Από του στόματος φλουконаζόλη	26/43 (60%)
Από του στόματος ιτρακοναζόλη	7/43 (16%)
Τοπικά αντιμυκητικά σκευάσματα	24/43 (56%)

3.3 Κατανομή των *Candida* spp.

Απομονώθηκαν συνολικά 302 στελέχη *Candida* spp. από 283 δείγματα κολπικών εκκρίσεων. Συγκεκριμένα, VVC με ≥ 2 διαφορετικά *Candida* spp. προσδιορίστηκε σε 19/283 (7%) περιπτώσεις, με την *C. albicans* να είναι το είδος που απομονώθηκε συχνότερα (17/19,

90%) σε συνδυασμό με άλλα. Αναλυτικότερα, υπήρχαν 11 (58%) μεικτές καλλιέργειες με *C. albicans* και *C. parapsilosis*, 5 (27%) με *C. albicans* και *C. glabrata*, 1 (5%) με *C. albicans* και *C. krusei*, 1 (5%) με *C. parapsilosis* και *C. glabrata* καθώς και 1 (5%) με *C. parapsilosis* και *C. orthopsilosis*.

Συνολικά, η *C. albicans* ήταν το είδος που απομονώθηκε πιο συχνά (152/302, 50%), ακολουθούμενη από *C. parapsilosis* (105/302, 35%), *C. glabrata* (31/302, 10%), *C. krusei* (8/302, 3%), *C. orthopsilosis* (5/302, 1,5%) και *C. lusitaniae* (1/302, 0,5%). Εξετάζοντας μεμονωμένα τις ασθενείς με RVVC, από τις καλλιέργειες των οποίων ανακτήθηκαν συνολικά 39 στελέχη, η *C. albicans* εξακολουθούσε να κρατά τα πρωτεία (21/39, 54%). Ωστόσο, η συχνότητα απομόνωσης *C. glabrata* (10/39, 26%) ήταν στατιστικά υψηλότερη ($p = 0,003$, ενώ της *C. parapsilosis* (8/39, 20%) χαμηλότερη ($p = 0,04$). Ειδικότερα, ο κύριος αιτιολογικός παράγοντας των 11 περιστατικών RVVC ήταν η *C. albicans* (6/11, 54%), ακολουθούμενη από *C. glabrata* (4/11, 37%) και *C. parapsilosis* (1/11, 9%).



Εικόνα 35. Κατανομή των *Candida* spp. σε περιστατικά VVC και RVVC στην παρούσα μελέτη.

Η διασπορά *C. albicans* και non-*albicans Candida* spp. δε διέφερε ανάλογα με παράγοντες όπως η διατάραξη της φυσιολογικής χλωρίδα του κόλπου, η λήψη αντιβιοτικών

και η ύπαρξη εγκυμοσύνης ($p > 0,71$). Εντούτοις, η συχνότητα εμφάνισης λοιμώξεων από non-*albicans Candida* spp. ήταν σημαντική υψηλότερη σε περι-/μετα-εμμηνοπαυσιακές γυναίκες ($p = 0,02$), ενώ τα περιστατικά VVC από *C. albicans* επικρατούσαν σε ασθενείς με συνλοίμωξη με ιούς ή/και βακτήρια ($p < 0,0001$).

Πίνακας 9. Χαρακτηριστικά των ασθενών με VVC από *C. albicans* και non-*albicans Candida* spp.

Παράγοντας	<i>C. albicans</i> (n = 152)	non- <i>albicans Candida</i> spp. (n = 150)	p
Εμμηνόπαυση	22 (14%)	38 (25%)	0,02
Διαταραγμένη χλωρίδα κόλπου	103 (68%)	105 (70%)	0,71
Λήψη αντιβιοτικών	90 (59%)	88 (59%)	1,00
Εγκυμοσύνη	5 (3%)	3 (2%)	0,72
Συνλοίμωξη	109 (72%)	72 (48%)	< 0,0001

Το ποσοστό συμφωνίας μεταξύ MALDI-ToF MS και Auhacolor™ 2 αναφορικά με την ταυτοποίηση των *Candida* spp. ήταν 91% (275/302). Συγκεκριμένα, 8/31 (26%) στελέχη *C. glabrata* είχαν ταυτοποιηθεί λανθασμένα με τη συμβατική μέθοδο είτε σαν *C. krusei* (6/8) είτε σαν *C. albicans* (2/8), 7/105 (7%) στελέχη *C. parapsilosis* ως *C. glabrata* (2/7), *C. krusei* (2/7), *C. albicans* (2/7) ή *C. tropicalis* (1/7), 4/152 (3%) στελέχη *C. albicans* είτε σαν *C. krusei* (1/4) είτε σαν *C. parapsilosis* (3/4) και το μοναδικό στέλεχος *C. lusitaniae* ως *C. krusei*. Επιπλέον, όλα τα στελέχη *C. orthopsilosis* είχαν ταυτοποιηθεί με το Auhacolor™ 2 ως *C. parapsilosis*. Σημειωτέον, η *C. orthopsilosis* ανήκει μαζί με τις *C. metapsilosis* και *C. parapsilosis sensu stricto* στο σύμπλεγμα των ειδών *C. parapsilosis*. Ωστόσο, οι συμβατικές δοκιμασίες ταυτοποίησης ζυμομυκήτων δεν είναι σε θέση να διαχωρίσουν κρυπτικά είδη που ανήκουν στο ίδιο σύμπλεγμα. Τέλος, 3/9 (33%) μεικτές καλλιέργειες *C. albicans* και *C. parapsilosis* είχαν ταυτοποιηθεί με Auhacolor™ 2 ως μονοκαλλιέργεια *C. albicans*.

3.4 Προφίλ της *in vitro* ευαισθησίας των *Candida spp.* στα αντιμυκητικά

Αναφορικά με τα στελέχη *C. albicans*, οι επικρατούσες τιμές (εύρη) MIC φλουκοναζόλης, ιτρακοναζόλης, μικοναζόλης, κετοκοναζόλης, φεντικοναζόλης, εκοναζόλης, κλοτριμαζόλης και βορικού οξέος ήταν 0,25 ($\leq 0,06 - 16$) mg/L, 0,008 (0,002 - 0,06) mg/L, 0,016 (0,002 - 2) mg/L, 0,004 (0,002 - > 2) mg/L, 0,5 (0,125 - > 2) mg/L, 0,03 (0,008 - 2) mg/L, 0,008 (0,004 - 0,125) mg/L και 1.600 (400 - 3.200) mg/L, αντίστοιχα. Μεταξύ των αζολών, η ιτρακοναζόλη, η κετοκοναζόλη και η κλοτριμαζόλη παρουσίασαν την υψηλότερη *in vitro* δραστηριότητα (GM MICs 0,01 mg/L), ακολουθούμενες από τη μικοναζόλη και την εκοναζόλη (GM MICs 0,03 mg/L), τη φλουκοναζόλη (GM MIC 0,29 mg/L) και τη φεντικοναζόλη (GM MIC 0,36 mg/L). Δεν παρατηρήθηκε αντοχή στην ιτρακοναζόλη, ενώ 3/152 (2%) και 6/152 (4%) στελέχη ήταν ευαίσθητα σε αυξημένη έκθεση και ανθεκτικά στη φλουκοναζόλη, αντίστοιχα.

Πίνακας 10. Προφίλ *in vitro* ευαισθησίας της *C. albicans* ($n = 152$) στα αντιμυκητικά.

Αντιμυκητικό	Επικρατούσα τιμή (εύρος) MIC (mg/L)	GM MIC (mg/L)	MIC ₅₀ /MIC ₉₀ (mg/L)	% αντοχή
Φλουκοναζόλη	0,25 ($\leq 0,06 - 16$)	0,29	0,25/2	4% (6/152)
Ιτρακοναζόλη	0,008 (0,002 - 0,06)	0,01	0,008/0,016	0%
Μικοναζόλη	0,016 (0,002 - 2)	0,03	0,016/0,5	-*
Κετοκοναζόλη	0,004 (0,002 - > 2)	0,01	0,004/0,125	-*
Φεντικοναζόλη	0,5 (0,125 - > 2)	0,36	0,5/1	-*
Εκοναζόλη	0,03 (0,008 - 2)	0,03	0,016/0,25	-*
Κλοτριμαζόλη	0,008 (0,004 - 0,125)	0,01	0,008/0,016	-*
Βορικό οξύ	1.600 (400 - 3.200)	1.459	1.600/1.600	-*

*: δεν υπάρχουν διαθέσιμα EUCAST CBPs και ECOFFs [5].

Σχετικά με τα στελέχη *C. parapsilosis*, οι επικρατούσες τιμές (εύρη) MIC φλουκοναζόλης, ιτρακοναζόλης, μικοναζόλης, κετοκοναζόλης, φεντικοναζόλης, εκοναζόλης, κλοτριμαζόλης και βορικού οξέος ήταν 1 (0,25 - 1) mg/L, 0,008 (0,004 - 0,06) mg/L, 0,25 (0,125 - 0,5) mg/L, 0,016 (0,008 - 0,06) mg/L, 1 (0,5 - > 2) mg/L, 0,5 (0,125 - 2) mg/L, 0,03 (0,016 - 0,06) mg/L και 1.600 (200 - 3.200) mg/L, αντίστοιχα. Η *in vitro* δραστηριότητα των αζολών κατά

αύξουσα σειρά ήταν φεντικοναζόλη (GM MIC 1,18 mg/L) < φλουκοναζόλη (GM MIC 0,80 mg/L) < εκοναζόλη (GM MIC 0,43 mg/L) < μικοναζόλη (GM MIC 0,31 mg/L) < κλοτριμαζόλη (GM MIC 0,03 mg/L) < κετοκοναζόλη (GM MIC 0,02 mg/L) < ιτρακοναζόλη (GM MIC 0,01 mg/L). Όλα τα εξεταζόμενα στελέχη ήταν ευαίσθητα τόσο στη φλουκοναζόλη όσο και στην ιτρακοναζόλη.

Πίνακας 11. Προφίλ *in vitro* ευαισθησίας της *C. parapsilosis* ($n = 105$) στα αντιμυκητικά.

Αντιμυκητικό	Επικρατούσα τιμή (εύρος) MIC (mg/L)	GM MIC (mg/L)	MIC ₅₀ /MIC ₉₀ (mg/L)	% αντοχή
Φλουκοναζόλη	1 (0,25 - 1)	0,80	1/1	0%
Ιτρακοναζόλη	0,008 (0,004 - 0,06)	0,01	0,008/0,03	0%
Μικοναζόλη	0,25 (0,125 - 0,5)	0,31	0,25/0,5	-*
Κετοκοναζόλη	0,016 (0,008 - 0,06)	0,02	0,016/0,016	-*
Φεντικοναζόλη	1 (0,5 - > 2)	1,18	1/2	-*
Εκοναζόλη	0,5 (0,125 - 2)	0,43	0,5/0,5	-*
Κλοτριμαζόλη	0,03 (0,016 - 0,06)	0,03	0,03/0,06	-*
Βορικό οξύ	1.600 (200 - 3.200)	1.160	1.600/1.600	-*

*: δεν υπάρχουν διαθέσιμα EUCAST CBPs και ECOFFs [5].

Αξίζει να σημειωθεί ότι η *C. orthopsilosis* ($n = 5$), η οποία και αυτή ανήκει στο σύμπλεγμα των ειδών *C. parapsilosis* [34], παρουσίασε παρόμοιο προφίλ *in vitro* ευαισθησίας στα αντιμυκητικά με αυτό της *C. parapsilosis*. Συγκεκριμένα, οι επικρατούσες τιμές (εύρη) MIC φλουκοναζόλης, ιτρακοναζόλης, μικοναζόλης, κετοκοναζόλης, φεντικοναζόλης, εκοναζόλης, κλοτριμαζόλης και βορικού οξέος ήταν 0,5/2 (0,5 - 2) mg/L, 0,03/0,06 (0,008 - 0,06) mg/L, 0,5 (0,5 - 2) mg/L, 0,016 (0,016 - 0,03) mg/L, 2/ >2 (1 - > 2) mg/L, 0,5/1 (0,25 - 1) mg/L, 0,125 (0,03 - 0,125) mg/L και 1.600 (1.600 - 3.200) mg/L, αντίστοιχα. Η *in vitro* δραστηριότητα των αζολών ακολουθούσε παρεμφερή σειρά με αυτή που προσδιορίστηκε για τα στελέχη *C. parapsilosis*, με τις μόνες διαφορές ότι η κετοκοναζόλη (GM MIC 0,02 mg/L) προηγείτο της ιτρακοναζόλης (GM MIC 0,03 mg/L) και η εκοναζόλη (GM MIC 0,57 mg/L) προηγείτο της μικοναζόλης (GM MIC 0,87 mg/L). Ταξινομώντας τα στελέχη

σύμφωνα με τα EUCAST CBPs για την *C. parapsilosis*, και σε αυτή την περίπτωση δεν παρατηρήθηκε αντοχή είτε στη φλουконаζόλη είτε στην ιτρακοναζόλη.

Όσον αφορά τα στελέχη *C. glabrata*, οι επικρατούσες τιμές (εύρη) MIC φλουконаζόλης, ιτρακοναζόλης, μικοναζόλης, κετοκοναζόλης, φεντικοναζόλης, εκοναζόλης, κλοτριμαζόλης και βορικού οξέος ήταν 16 (4 - > 64) mg/L, 0,25 (0,125 - > 2) mg/L, 0,5 (0,03 - 1) mg/L, 0,5 (0,03 - > 2) mg/L, 1 (0,5 - > 2) mg/L, 0,125 (0,03 - 1) mg/L, 0,25 (0,6 - 4) mg/L και 3.200 (400 - 6.400) mg/L, αντίστοιχα. Μεταξύ των αζολών, η εκοναζόλη (GM MIC 0,21 mg/L) παρουσίασε την υψηλότερη *in vitro* δραστηριότητα, ακολουθούμενη από τη μικοναζόλη (GM MIC 0,22 mg/L), την κετοκοναζόλη (GM MIC 0,29 mg/L), την ιτρακοναζόλη (GM MIC 0,31 mg/L), την κλοτριμαζόλη (GM MIC 0,64 mg/L), τη φεντικοναζόλη (GM MIC 0,91 mg/L) και τη φλουконаζόλη (GM MIC 14,25 mg/L). Αντοχή στη φλουконаζόλη παρατηρήθηκε σε 12/31 (39%) στελέχη, με τα εναπομείναντα (19/31, 61%) να χαρακτηρίζονται ως ευαίσθητα σε αυξημένη έκθεση. Συγχρόνως, 6/31 (19%) στελέχη ήταν non-WT στην ιτρακοναζόλη.

Πίνακας 12. Προφίλ *in vitro* ευαισθησίας της *C. glabrata* ($n = 31$) στα αντιμυκητικά.

Αντιμυκητικό	Επικρατούσα τιμή (εύρος) MIC (mg/L)	GM MIC (mg/L)	MIC ₅₀ /MIC ₉₀ (mg/L)	% αντοχή/non-WT
Φλουконаζόλη	16 (4 - > 64)	14,25	16/> 64	39% (12/31)
Ιτρακοναζόλη	0,25 (0,125 - > 2)	0,31	0,25/> 2	19% (6/31)
Μικοναζόλη	0,5 (0,03 - 1)	0,22	0,25/0,5	- *
Κετοκοναζόλη	0,5 (0,03 - > 2)	0,29	0,5/> 2	- *
Φεντικοναζόλη	1 (0,5 - > 2)	0,91	1/2	- *
Εκοναζόλη	0,125 (0,03 - 1)	0,21	0,25/1	- *
Κλοτριμαζόλη	0,25 (0,6 - 4)	0,64	0,5/4	- *
Βορικό οξύ	3.200 (400 - 6.400)	2.691	3.200/6.400	- *

*: δεν υπάρχουν διαθέσιμα EUCAST CBPs και ECOFFs [5].

Σχετικά με τα στελέχη *C. krusei*, οι επικρατούσες τιμές (εύρη) MIC φλουконаζόλης, ιτρακοναζόλης, μικοναζόλης, κετοκοναζόλης, φεντικοναζόλης, εκοναζόλης, κλοτριμαζόλης και βορικού οξέος ήταν 32 (8 - 64) mg/L, 0,03 (0,03 - 0,25) mg/L, 2 (0,125 - 2) mg/L, 0,125/0,5

(0,125 - 0,5) mg/L, 2 (1 - 2) mg/L, 1 (0,5 - 2) mg/L, 0,06 (0,03 - 0,25) mg/L και 800 (200 - 1.600) mg/L, αντίστοιχα. Η *in vitro* δραστηριότητα των αζολών κατά αύξουσα σειρά ήταν φλουκοναζόλη (GM MIC 26,91 mg/L) < φεντικοναζόλη (GM MIC 1,68 mg/L) < εκοναζόλη και μικοναζόλη (GM MICs 0,92 mg/L) < κετοκοναζόλη (GM MIC 0,25 mg/L) < κλοτριμαζόλη (GM MIC 0,08 mg/L) < ιτρακοναζόλη (GM MIC 0,07 mg/L). Όλα τα εξεταζόμενα στελέχη ταξινομήθηκαν ως WT τόσο στη φλουκοναζόλη όσο και στην ιτρακοναζόλη.

Πίνακας 13. Προφίλ *in vitro* ευαισθησίας της *C. krusei* ($n = 8$) στα αντιμυκητικά.

Αντιμυκητικό	Επικρατούσα τιμή (εύρος) MIC (mg/L)	GM MIC (mg/L)	MIC ₅₀ /MIC ₉₀ (mg/L)	% non-WT
Φλουκοναζόλη	32 (8 - 64)	26,91	32/64	0%
Ιτρακοναζόλη	0,03 (0,03 - 0,25)	0,07	0,06/0,25	0%
Μικοναζόλη	2 (0,125 - 2)	0,92	2/2	-*
Κετοκοναζόλη	0,125/0,5 (0,125 - 0,5)	0,25	0,25/0,5	-*
Φεντικοναζόλη	2 (1 - 2)	1,68	2/2	-*
Εκοναζόλη	1 (0,5 - 2)	0,92	1/2	-*
Κλοτριμαζόλη	0,06 (0,03 - 0,25)	0,08	0,06/0,25	-*
Βορικό οξύ	800 (200 - 1.600)	800	800/1.600	-*

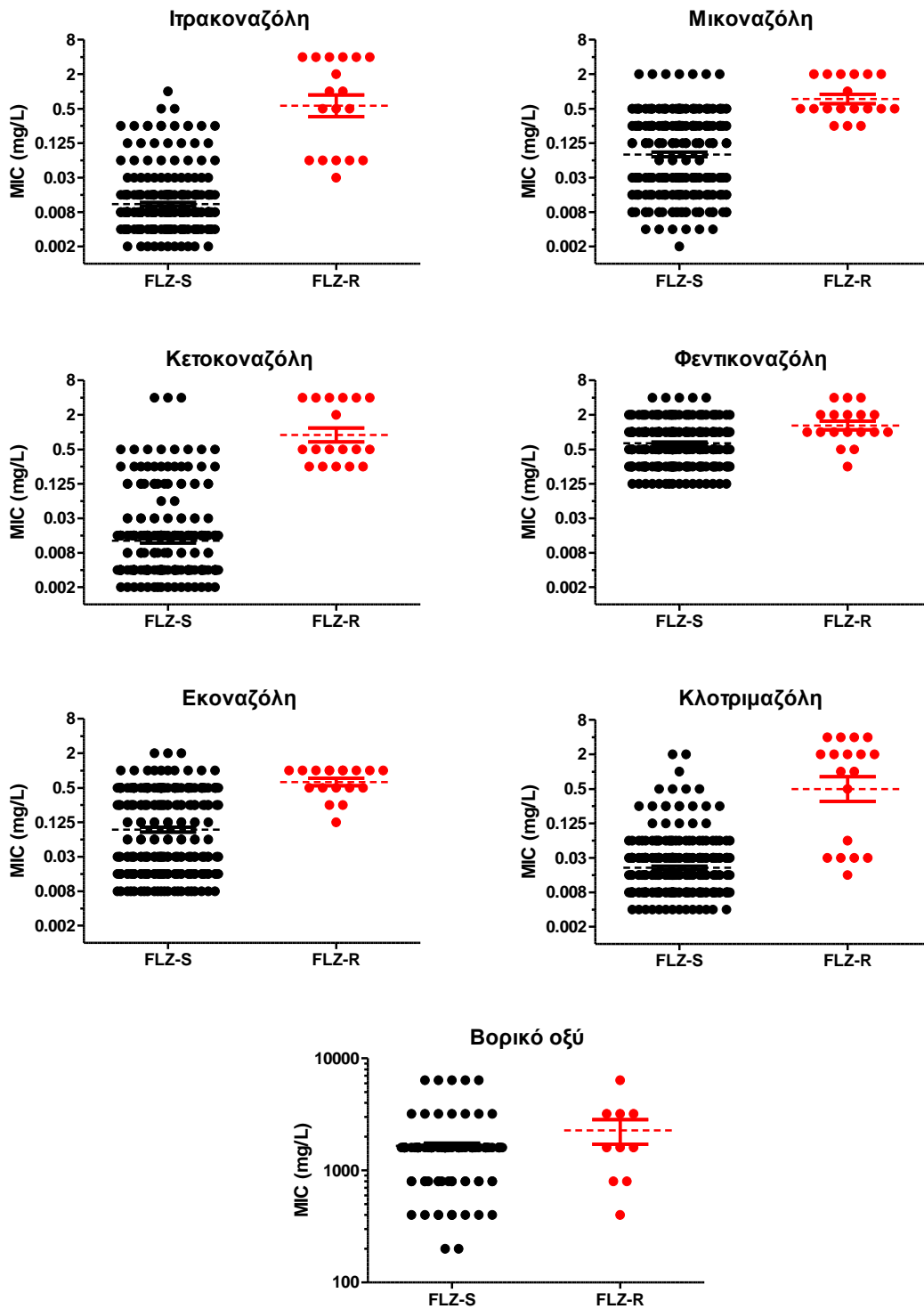
*: Δεν υπάρχουν διαθέσιμα EUCAST CBPs και ECOFFs [5].

Το μοναδικό στέλεχος *C. lusitaniae* είχε MIC κετοκοναζόλης 0,004 mg/L, ιτρακοναζόλης 0,008 mg/L (WT), μικοναζόλης και κλοτριμαζόλης 0,016 mg/L, εκοναζόλης 0,06 mg/L, φλουκοναζόλης 0,25 mg/L και φεντικοναζόλης 0,5 mg/L.

Σύμφωνα με τα προαναφερθέντα, βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των τιμών MIC της φλουκοναζόλης και των τιμών MIC των υπολοίπων αζολών για τις *C. albicans* ($r = 0,28 - 0,66$, $p = < 0,0001 - 0,0004$) και *C. glabrata* ($r = 0,68 - 0,81$, $p < 0,001$), όχι όμως για την *C. parapsilosis* ($p = 0,12 - 0,92$), ενώ για την *C. krusei* σημαντική συσχέτιση υπήρξε μόνο για την κετοκοναζόλη, την εκοναζόλη και την ιτρακοναζόλη ($r = 0,72 - 0,99$, $p <$

0,0001 - 0,04). Επιπλέον, το βορικό οξύ παρουσίασε την υψηλότερη και τη λιγότερο ισχυρή *in vitro* δραστηριότητα έναντι της *C. krusei* και της *C. glabrara*, αντίστοιχα.

Το συνολικό ποσοστό αντοχής στη φλουκοναζόλη ήταν 6% (18/302 στελέχη). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι τιμές MIC των αζολών για τα ευαίσθητα και τα ανθεκτικά στη φλουκοναζόλη στελέχη ήταν σημαντικά διαφορετικές ($p = < 0,0001 - 0,0002$), σε αντίθεση με αυτές του βορικού οξέος που υπέδειξαν ομοιόμορφη κατανομή για όλα τα στελέχη ανεξαρτήτως του προφίλ της *in vitro* ευαισθησίας τους στη φλουκοναζόλη ($p = 0,10$).



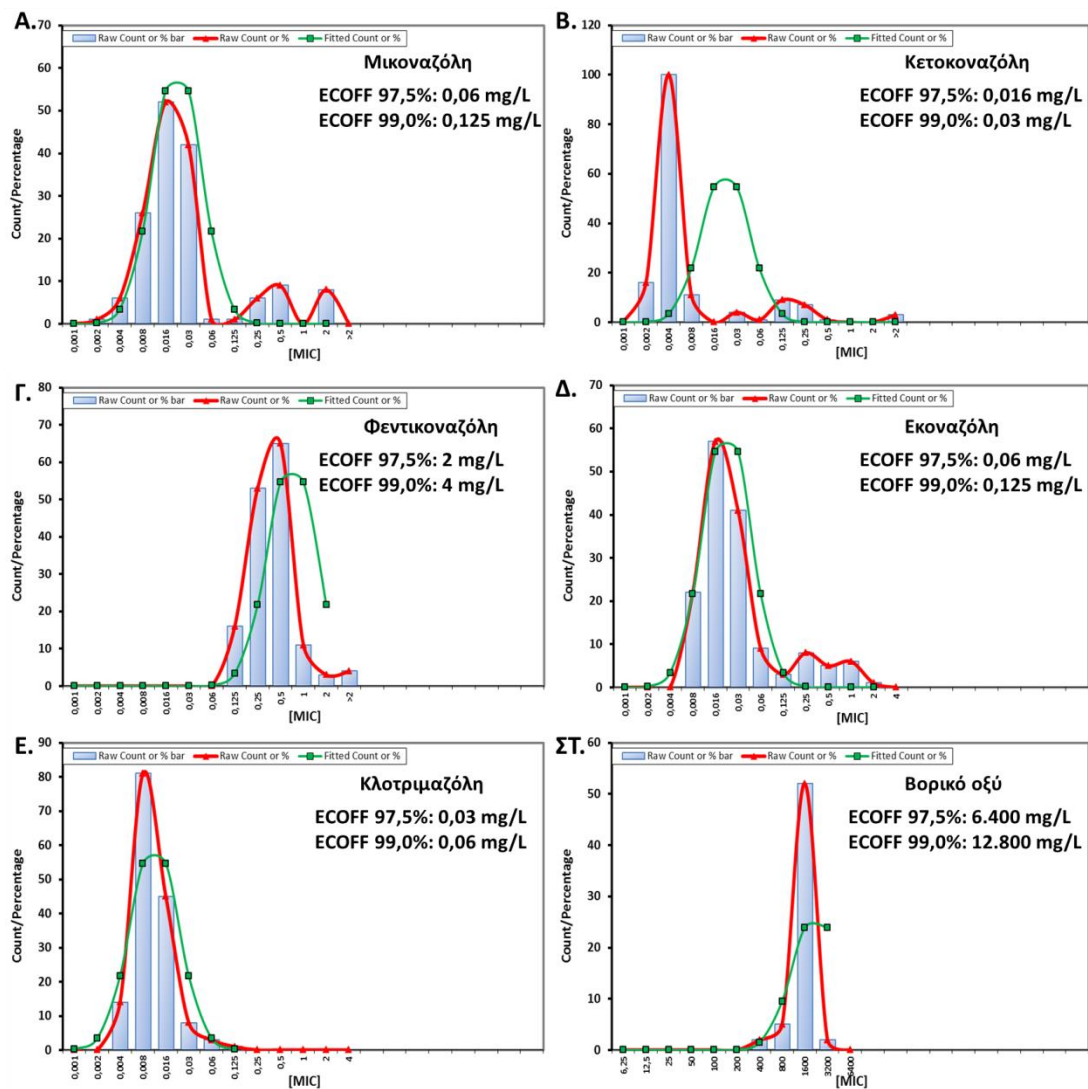
Εικόνα 36. Σύγκριση των τιμών MIC των αζολών και του βορικού οξέος μεταξύ ευαίσθητων (FLZ-S) και ανθεκτικών (FLZ-R) στη φλουκοναζόλη στελεχών *Candida* spp.

Τα 18 ανθεκτικά στη φλουκοναζόλη στελέχη (6 *C. albicans* και 12 *C. glabrata*) απομονώθηκαν από 11/233 (5%) ασθενείς, εκ των οποίων 4/11 (36%) είχαν διαγνωστεί με RVVC. Συνολικά, μόλις οι μισές (6/11, 55%) είχαν εκτεθεί προηγουμένως σε αντιμυκητική θεραπεία. Ειδικότερα, 5/6 στελέχη *C. albicans* απομονώθηκαν από 31χρονη ασθενή σε διάστημα 7 μηνών (RVVC), η οποία δεν είχε κάνει προηγουμένως χρήση αντιμυκητικών φαρμάκων. Κατόπιν της αρχικής διάγνωσης, η ασθενής έλαβε ιτρακοναζόλη συνδυαστικά με φεντικοναζόλη, ακολούθησε κύκλος θεραπειών με φλουκοναζόλη και τέλος λήψη προβιοτικών και βορικού οξέος, χωρίς ωστόσο να επέλθει κλινική ίαση. Το εναπομένον στέλεχος *C. albicans* απομονώθηκε από μεικτή με ανθεκτική στη φλουκοναζόλη *C. glabrata* καλλιέργεια 35χρονης ασθενούς, που είχε αναφέρει προηγούμενη λήψη ιτρακοναζόλης σε συνδυασμό με φεντικοναζόλη. Η ασθενής δεν πραγματοποίησε μεταγενέστερη επίσκεψη στο εργαστήριο και η έκβαση του περιστατικού παραμένει άγνωστη. Τα υπόλοιπα 11/12 στελέχη *C. glabrata* απομονώθηκαν από 9 ασθενείς, εκ των οποίων 5/9 είχαν δηλώσει προηγούμενη χρήση αντιμυκητικών, συγκεκριμένα φλουκοναζόλης (4/5), ιτρακοναζόλης (2/5), κετοκοναζόλης (1/5), εκοναζόλης (1/5), μικοναζόλης (1/5) και φεντικοναζόλης (1/5). Στη διαθέσιμη επακόλουθη παρακολούθηση των 7/9 ασθενών, όλες (συμπεριλαμβανομένων των 3 με RVVC) ήταν ελεύθερες συμπτωμάτων και είχαν καλλιέργεια αρνητική για *Candida* spp. κατόπιν λήψης προβιοτικών και βορικού οξέος (5/7) ή συνδυασμού τους με ιτρακοναζόλη (2/7).

3.5 Προσδιορισμός τιμών EUCAST ECOFF αντιμυκητικών παραγόντων για *Candida* spp.

Λαμβάνοντας υπόψη τις προαναφερθείσες κατανομές MIC των υπό μελέτη αντιμυκητικών παραγόντων, προσδιορίστηκαν ακολούθως οι τιμές EUCAST ECOFF ανά *Candida* spp. για όσα από τα αντιμυκητικά δεν έχουν ακόμη θεσπιστεί. Συγκεκριμένα, προσδιορίστηκαν τιμές ECOFF μικοναζόλης, κετοκοναζόλης, φεντικοναζόλης, εκοναζόλης, κλοτριμαζόλης και βορικού οξέος για *C. albicans*, *C. parapsilosis* και *C. glabrata*. Αντίστοιχη ανάλυση για *C. krusei*, *C. lusitaniae* και *C. orthopsilosis* δεν πραγματοποιήθηκε εξαιτίας του περιορισμένου αριθμού των στελεχών που απομονώθηκαν ($n = 8, 1$ και 5 , αντίστοιχα).

Οι τιμές ECOFF μικοναζόλης, κετοконаζόλης, φεντικοναζόλης, εκοναζόλης, κλοτριμαζόλης και βορικού οξέος που περιλαμβάνουν το > 97,5% / > 99% των WT MIC για *C. albicans* ήταν 0,06/0,125 mg/L, 0,016/0,03 mg/L, 2/4 mg/L, 0,06/0,125 mg/L, 0,03/0,06 mg/L και 6.400/12.800 mg/L, αντίστοιχα.

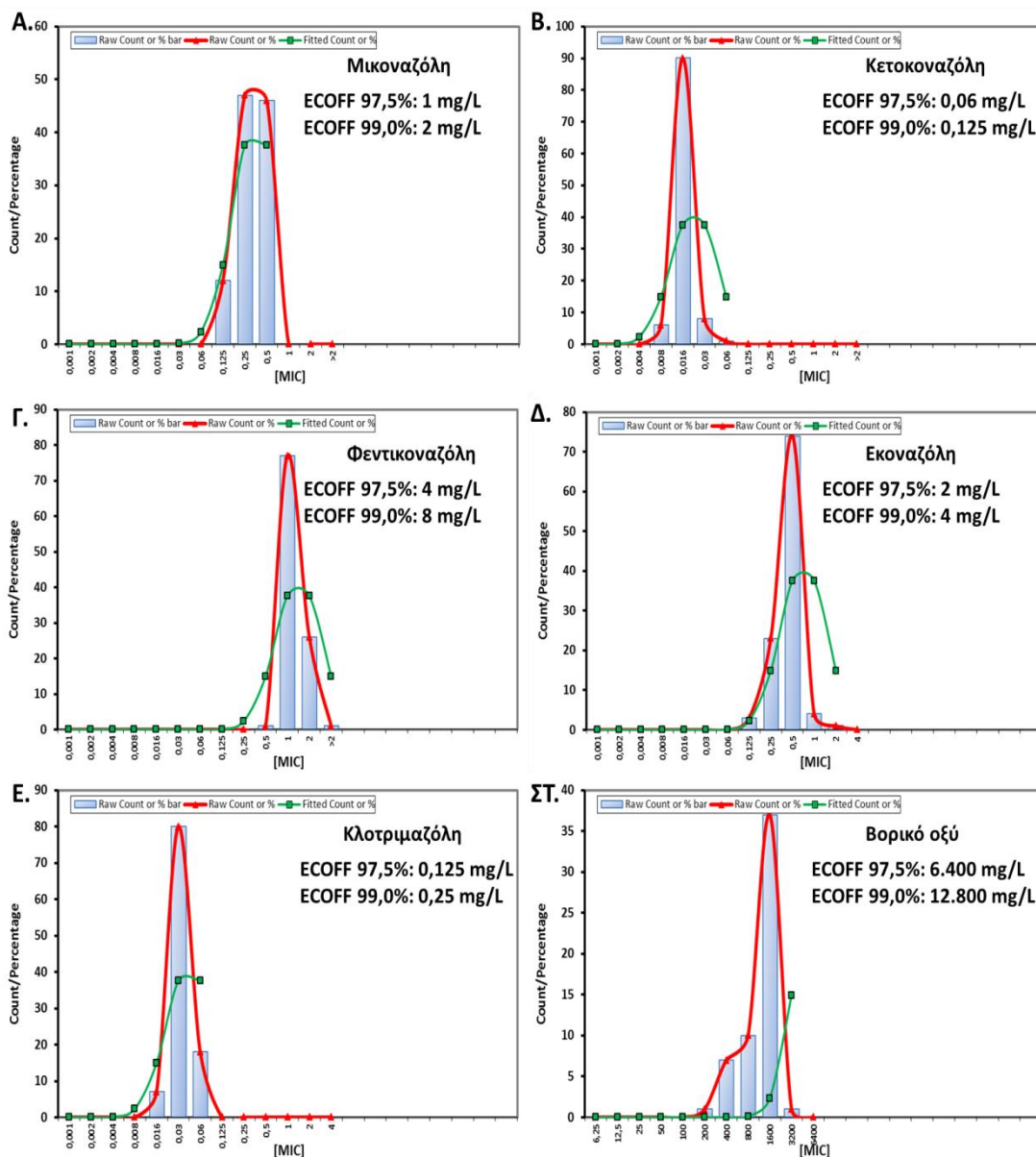


Εικόνα 37. Τιμές EUCAST ECOFF αζολών και βορικού οξέος που περιλαμβάνουν το > 97,5% και το > 99% των WT MIC για στελέχη *C. albicans*.

Σύμφωνα με αυτά, 23/152 (15%) στελέχη ήταν non-WT στη μικοναζόλη (MIC 0,25 - 2 mg/L) και είχαν απομονωθεί από 7 ασθενείς. Σημειωτέον, 8 εξ αυτών είχαν MIC μικοναζόλης

2 mg/L και παρουσίαζαν διασταυρούμενη αντοχή/non-WT φαινότυπο στη φλουκοναζόλη (MICs 4 - 16 mg/L), στην κετοконаζόλη (MICs 0,06 - 0,25 mg/L), στην εκοναζόλη (MICs 0,5 - 1 mg/L), αλλά όχι στην ιτρακοναζόλη (MICs 0,03 - 0,06 mg/L), στη φεντικοναζόλη (MICs 0,25 - 1 mg/L) και στην κλοτριμαζόλη (MICs 0,016 - 0,06 mg/L). Τα συγκεκριμένα στελέχη είχαν απομονωθεί από 4 ασθενείς, εκ των οποίων 1/4 (25%) είχε RVVC και 3/4 (75%) είχαν δηλώσει προηγούμενη λήψη φλουκοναζόλης (3/3), ιτρακοναζόλης (3/3) και φεντικοναζόλης (2/3). Και στις 4 αυτές περιπτώσεις παρατηρήθηκε κλινική ίαση κατόπιν της χορήγησης βορικού οξέος και προβιοτικών (2/4), φεντικοναζόλης (1/4) ή φεντικοναζόλης και ιτρακοναζόλης (1/4). Επίσης, μόλις 1/152 (0,7%) στελέχη ήταν non-WT στην κλοτριμαζόλη (MIC 0,125 mg/L) και είχε απομονωθεί από 28χρονη ασθενή που δεν είχε κάνει προηγούμενη χρήση αντιμυκητικών φαρμάκων. Ωστόσο, το συγκεκριμένο στέλεχος παρουσίαζε διασταυρούμενη αντοχή/non-WT φαινότυπο στη φλουκοναζόλη (MIC 4 mg/L), στην κετοконаζόλη (MIC 0,06 mg/L), στην εκοναζόλη (MIC 0,5 mg/L), αλλά όχι στην ιτρακοναζόλη (MIC 0,06 mg/L), στη φεντικοναζόλη (MIC 0,5 mg/L) και στη μικοναζόλη (MIC 0,06 mg/L). Η ασθενής έλαβε βορικό οξύ και προβιοτικά και παρατηρήθηκε κλινική ίαση. Επιπροσθέτως, 4/152 (3%) στελέχη ήταν non-WT μόνο στη φεντικοναζόλη (MIC > 2 mg/L) και είχαν απομονωθεί από 3 ασθενείς που δεν είχαν λάβει προηγουμένως αντιμυκητικά. Τέλος, δεν εντοπίστηκαν non-WT στο βορικό οξύ στελέχη *C. albicans*.

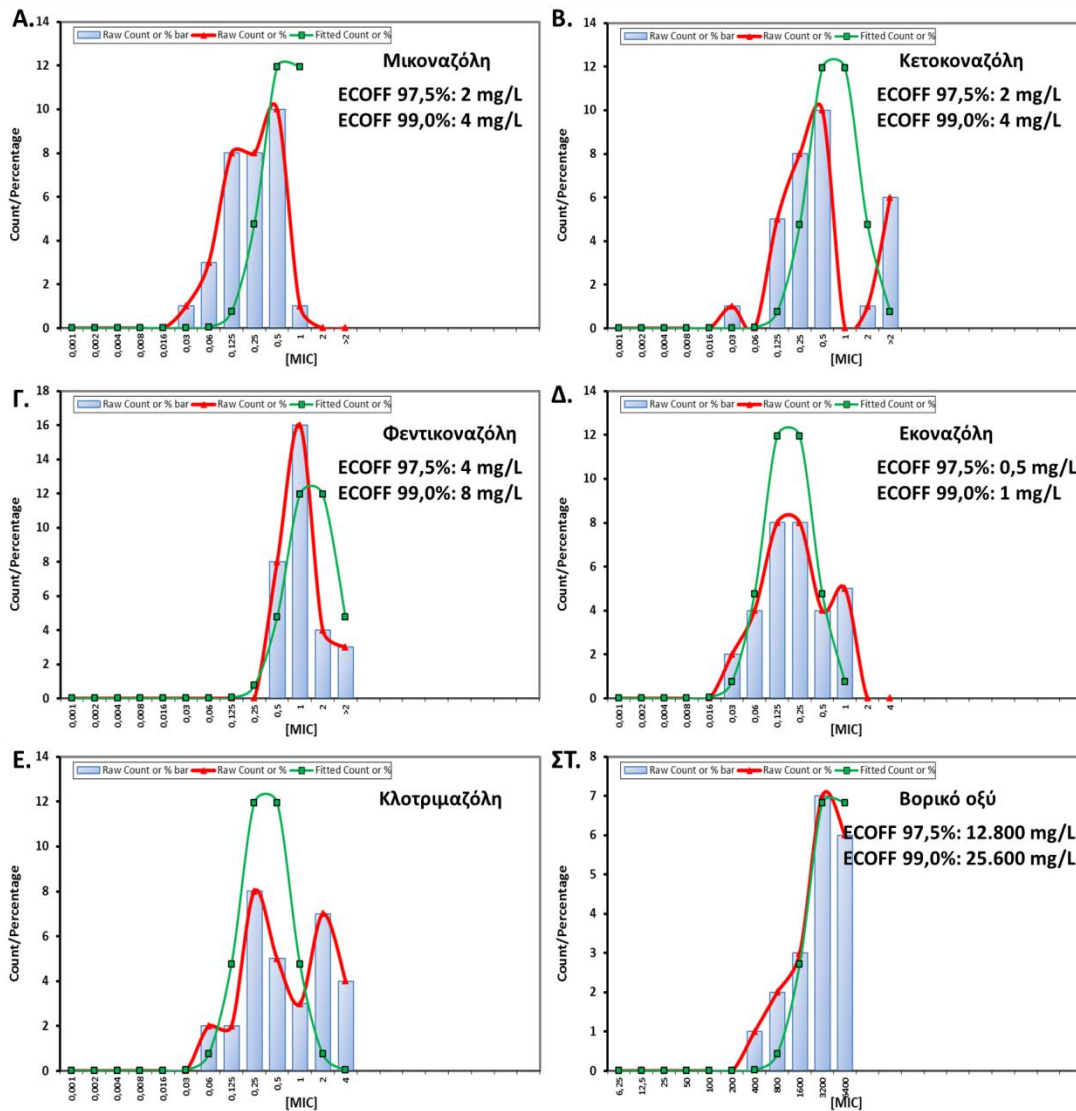
Οι τιμές ECOFF μικοναζόλης, κετοконаζόλης, φεντικοναζόλης, εκοναζόλης, κλοτριμαζόλης και βορικού οξέος που περιλαμβάνουν το > 97,5%/> 99% των WT MIC για *C. parapsilosis* ήταν 1/2 mg/L, 0,06/0,125 mg/L, 4/8 mg/L, 2/4 mg/L, 0,125/0,25 mg/L και 6.400/12.800 mg/L, αντίστοιχα. Σύμφωνα με αυτά, δεν υπήρχαν στελέχη non-WT σε κανένα από τα υπό μελέτη αντιμυκητικά. Αξίζει να σημειωθεί πως παρατηρήθηκε μειωμένη *in vitro* δραστηριότητα της φεντικοναζόλης σε μόλις 1/105 (1%) στελέχη (MIC > 2 mg/L), όμως η ερμηνεία της MIC είναι αβέβαιη αφού δεν είναι γνωστή η ακριβής τιμή της και η τιμή ECOFF 97,5% προσδιορίστηκε στα 4 mg/L. Το συγκεκριμένο στέλεχος είχε απομονωθεί από 39χρονη ασθενή που δεν είχε κάνει προηγούμενη χρήση αντιμυκητικών φαρμάκων.



Εικόνα 38. Τιμές EUCAST ECOFF αζολών και βορικού οξέος που περιλαμβάνουν το > 97,5% και το > 99% των WT MIC για στελέχη *C. parapsilosis*.

Οι τιμές ECOFF μικοναζόλης, κετοконаζόλης, φεντιконаζόλης, εκοναζόλης, και βορικού οξέος που περιλαμβάνουν το > 97,5%/> 99% των WT MIC για *C. glabrata* ήταν 2/4 mg/L, 2/4 mg/L, 4/8 mg/L, 0,5/1 mg/L και 12.800/25.600 mg/L, αντίστοιχα. Στην περίπτωση της κλοτριμαζόλης η κατανομή των MICs ήταν δικόρυφη έχοντας δύο σχεδόν ίδιες

επικρατούσες τιμές (bimodal) και ως εκ τούτου δεν μπορούσαν να εξαχθούν με ασφάλεια οι αντίστοιχες τιμές ECOFF.

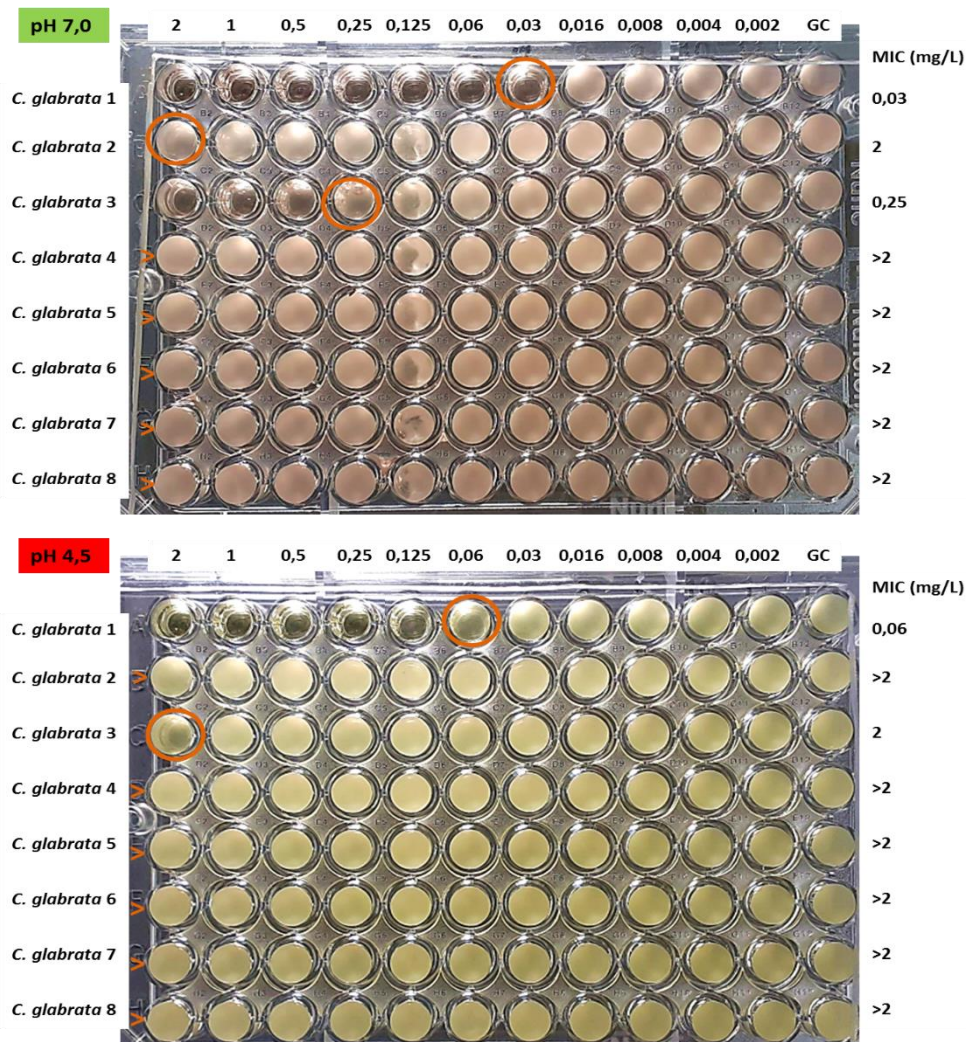


Εικόνα 39. Τιμές EUCAST ECOFF αζολών και βορικού οξέος που περιλαμβάνουν το > 97,5% και το > 99% των WT MIC για στελέχη *C. glabrata*. Οι τιμές ECOFF της κλοτριμαζόλης δεν μπορούσαν να εξαχθούν με ασφάλεια δεδομένου ότι η κατανομή των MICs παρουσίαζε δύο σχεδόν ίδιες επικρατούσες τιμές.

Σύμφωνα με αυτά, 6/31 (19%) στελέχη ήταν non-WT στην κετοконаζόλη (MIC > 2 mg/L),), εκ των οποίων όλα ήταν συγχρόνως ανθεκτικά/non-WT στη φλουконаζόλη (MICs > 64 mg/L), στην ιτρακοναζόλη (MICs > 2 mg/L) και στην εκοναζόλη (MICs 1 mg/L). Τα συγκεκριμένα στελέχη είχαν απομονωθεί από 4 ασθενείς, εκ των οποίων 1/4 (25%) είχε RVVC και όλες είχαν δηλώσει προηγούμενη λήψη αντιμυκητικών, συγκεκριμένα φλουконаζόλης (3/4), ιτρακοναζόλης (1/4), εκοναζόλης (1/4), κλοτριμαζόλης (1/4) και φεντικοναζόλης (1/4). Σημειωτέον, και στις 4 αυτές περιπτώσεις παρατηρήθηκε κλινική ίαση κατόπιν της χορήγησης βορικού οξέος και προβιοτικών. Επίσης, παρατηρήθηκε μειωμένη *in vitro* δραστικότητα της φεντικοναζόλης σε 3/31 (10%) στελέχη (MIC > 2 mg/L), ωστόσο δεν μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα με βεβαιότητα αναφορικά με την κατηγοριοποίησή τους μιας και δεν είναι γνωστή η ακριβής MIC και η τιμή ECOFF 97,5% προσδιορίστηκε στα 4 mg/L. Ωστόσο, τα συγκεκριμένα στελέχη είχαν απομονωθεί από τις 2/4 προαναφερθείσες ασθενείς με λοίμωξη από *C. glabrata* με διασταυρούμενη αντοχή/φαινότυπο non-WT σε διάφορες αζόλες. Τέλος, δεν εντοπίστηκαν non-WT στη μικοναζόλη και στο βορικό οξύ στελέχη *C. glabrata*.

3.6 Επίδραση του pH στον έλεγχο της *in vitro* δραστικότητας των αζολών έναντι *Candida* spp. χρησιμοποιώντας τη μεθοδολογία αναφοράς κατά EUCAST

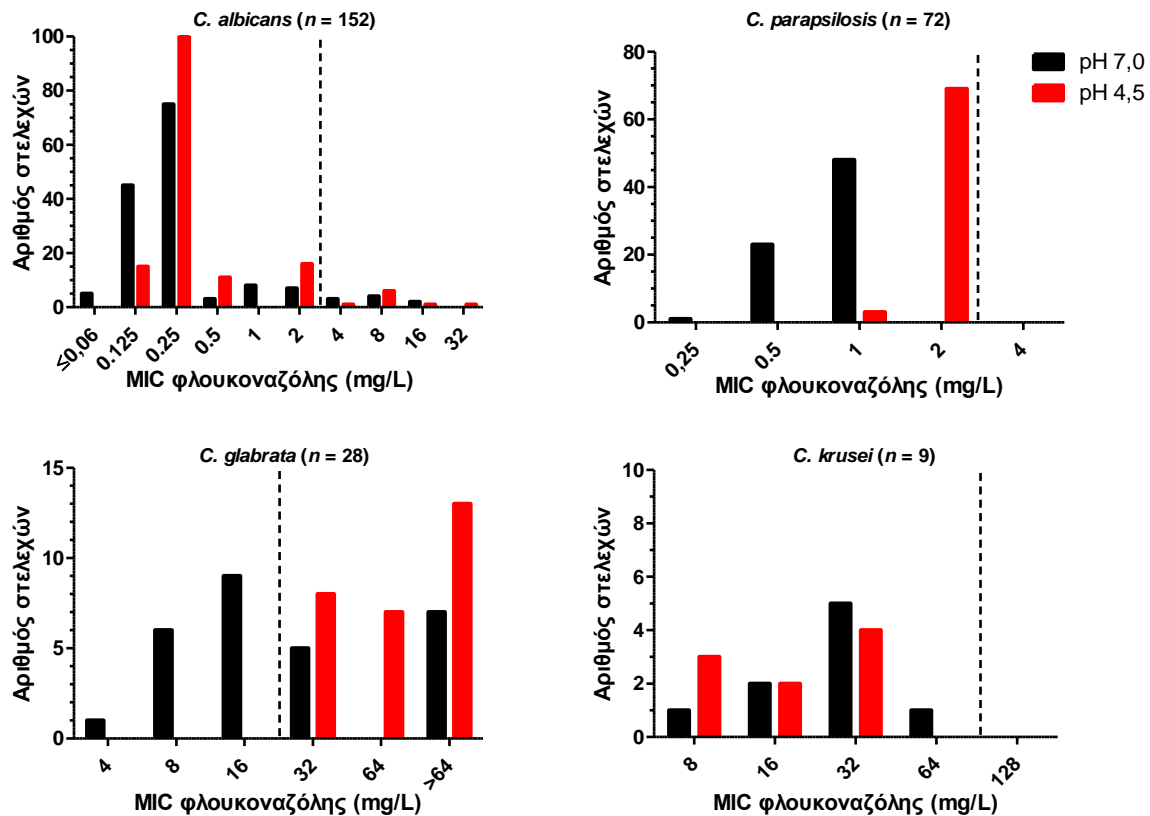
Ο έλεγχος της *in vitro* ευαισθησίας στη φλουконаζόλη και στην ιτρακοναζόλη πραγματοποιήθηκε συγχρόνως σε pH 7,0 και 4,5 για μια μερίδα των στελεχών που απομονώθηκαν. Συγκεκριμένα, εξετάστηκαν συνολικά 261/302 (86%) στελέχη *Candida* spp., εκ των οποίων 152 *C. albicans*, 72 *C. parapsilosis*, 28 *C. glabrata* και 9 *C. krusei*.



Εικόνα 40. Έλεγχος της *in vitro* ευαισθησίας της ιτρακοναζόλης έναντι στελεχών *C. glabrata* σε pH 7,0 (πάνω) και 4,5 (κάτω).

Παρατηρήθηκε μια εξαρτώμενη από το είδος του παθογόνου επίπτωση του pH στις τιμές MIC της φλουκοναζόλης. Ειδικότερα, οι MICs της φλουκοναζόλης για στελέχη *C. parapsilosis* και *C. glabrata* ήταν σημαντικά υψηλότερες σε όξινο pH συγκριτικά με τις αντίστοιχες σε ουδέτερο pH ($p < 0,0001$), σε αντίθεση με τις MICs του φαρμάκου για στελέχη *C. albicans* ($p = 0,06$) και *C. krusei* ($p = 0,16$) που κατά κύριο λόγο παρέμειναν σταθερές ή μειώθηκαν σε pH 4,5. Η ΕΑ εντός $\pm 1 \log_2$ αραιώσης μεταξύ των τιμών MIC που ελήφθησαν σε διαφορετικά περιβάλλοντα pH ήταν 94% για την *C. albicans*, 69% για την *C. parapsilosis*, 36% για την *C. glabrata* και 78% για την *C. krusei*, που αντιστοιχεί σε μέση διαφορά 0, 1, 2

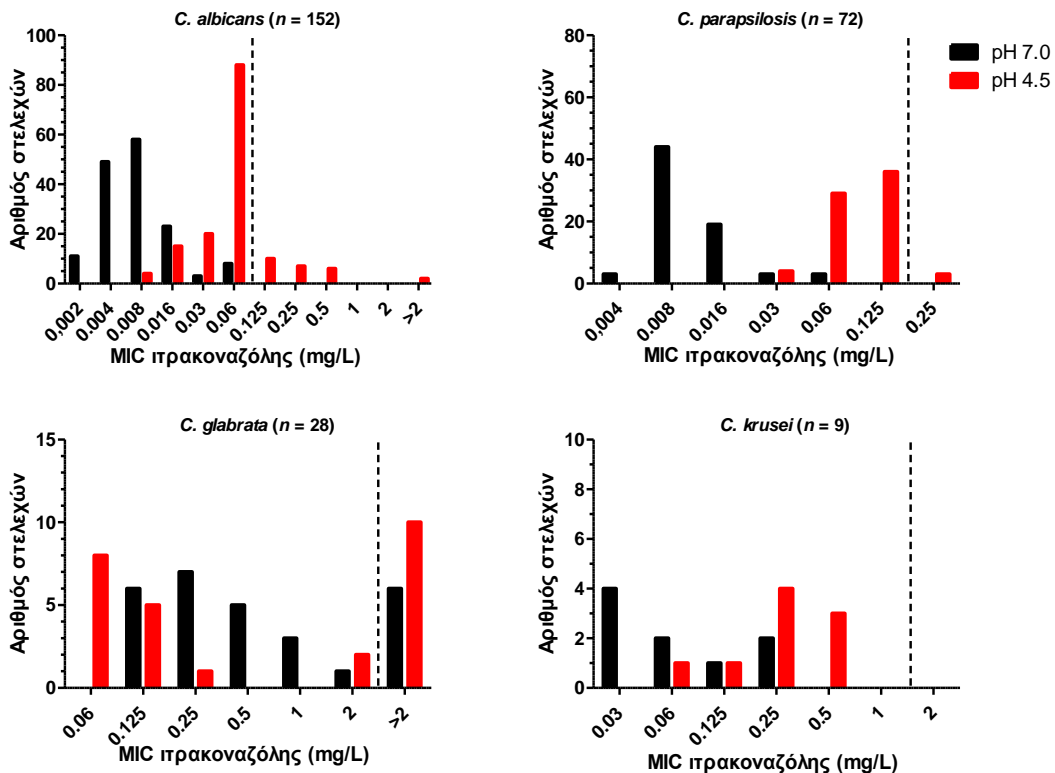
και 0 διαδοχικών διπλών αραιώσεων, αντίστοιχα. Ενώ 6/152 (4%) *C. albicans* και 12/28 (43%) *C. glabrata* ήταν ανθεκτικές στη φλουконаζόλη σε pH 7,0, 8/152 (5%) *C. albicans* και 28/28 (100%) *C. glabrata* εμφάνισαν αντοχή στη φλουконаζόλη σε pH 4,5. Έτσι, η CA για στελέχη *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* και *C. krusei* ήταν 99%, 100%, 43% και 100%, αντίστοιχα (συνολική CA 91%, $p < 0,0001$).



Εικόνα 41. Κατανομές EUCAST MICs φλουконаζόλης, οι οποίες προσδιορίστηκαν σε pH 7,0 και 4,5. Οι διακεκομμένες γραμμές υποδεικνύουν τα CBPs ή ECOFFs (εάν δεν υπάρχουν διαθέσιμα CBPs) για κάθε *Candida* spp. [5].

Από την άλλη πλευρά, οι MICs της ιτρακοναζόλης αυξήθηκαν σημαντικά σε pH 4,5 για όλα τα *Candida* spp. ($p \leq 0,02$). Η ΕΑ εντός $\pm 1 \log_2$ αραιώσης μεταξύ των τιμών MIC που ελήφθησαν σε pH 7,0 και 4,5 ήταν 5% για την *C. albicans*, 4% για την *C. parapsilosis*, 25% για την *C. glabrata* και 33% για την *C. krusei*, που αντιστοιχεί σε μέση διαφορά 3, 3, 2 και 2

διαδοχικών διπλών αραιώσεων. Μόνο 6/28 (21%) *C. glabrata* επέδειξαν non-WT φαινότυπο σε ουδέτερο pH, σε αντίθεση με 24/152 (16%) *C. albicans*, 3/72 (4%) *C. parapsilosis* και 12/28 (43%) στελέχη *C. glabrata* που ήταν ανθεκτικά/non-WT στην ιτρακοναζόλη σε όξινο pH. Συνεπώς, η CA για στελέχη *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* και *C. krusei* ήταν 84%, 96%, 79% και 100%, αντίστοιχα (συνολική CA 87%, $p < 0,0001$).



Εικόνα 42. Κατανομές EUCAST MICs ιτρακοναζόλης, οι οποίες προσδιορίστηκαν σε pH 7,0 και 4,5. Οι διακεκομμένες γραμμές υποδεικνύουν τα CBPs ή ECOFFs (εάν δεν υπάρχουν διαθέσιμα CBPs) για κάθε *Candida* spp. [5].

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Κατά τη διάρκεια της παρούσας τριετούς επιδημιολογικής μελέτης (2018-2021), καταγράφηκαν συνολικά 283 περιστατικά VVC, εκ των οποίων 11 αφορούσαν RVVC. Η συχνότητα εμφάνισης της VVC υπολογίστηκε στο 18%, με αντίστοιχα ποσοστά (15-18%) να έχουν καταγραφεί σε άλλες χώρες της Ευρώπης [258] [259] και του κόσμου [260] [261]. Ο επιπολασμός της χρόνιας και υποτροπιάζουσας μορφής της νόσου βρέθηκε να είναι χαμηλότερος (5%) από εκείνον που παρουσίασε μελέτη του 2011 στην οποία συμμετείχαν πέντε χώρες της Ευρώπης (9%) [262]. Σε κάθε περίπτωση πρέπει να υπογραμμιστεί πως τα αποτελέσματα της προαναφερθείσας έρευνας προήλθαν από μια διαδικτυακή δημοσκόπηση στην οποία μερίδα των ασθενών είχαν καταφύγει σε αυτοδιάγνωση, χωρίς εργαστηριακή επιβεβαίωση της νόσου, και ως ετούτου η αξιοπιστία τους είναι αμφίβολη. Ωστόσο, η συχνότητα εμφάνισης της RVVC, όπως αυτή προέκυψε στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης, βρίσκεται σε πλήρη συμφωνία με αυτή που αναφέρει η παγκόσμια βιβλιογραφία (5%) [263] [264].

Σημειωτέον, τα διαθέσιμα δεδομένα για τη VVC στην Ελλάδα αδυνατούν να περιγράψουν τη σύγχρονη επιδημιολογική εικόνα της. Όπως υπέδειξε η ανασκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας, οι σχετικές δημοσιευμένες μελέτες είναι περιορισμένες, ελλιπείς και συνάμα αναχρονιστικές, καθιστώντας την επικαιροποίησή τους αδήριτη ανάγκη. Πρέπει να τονιστεί πως τα ευρήματά μας μπορούν να συγκριθούν ως προς τον επιπολασμό της νόσου μόνο με 2/7 μελέτες που ανακτήθηκαν, καθώς μόνο με αυτές υπάρχει αντιστοιχία στον εξεταζόμενο πληθυσμό (συμπτωματικές ενήλικες γυναίκες). Ειδικότερα, η συχνότητα εμφάνισης της VVC στην Ελλάδα το διάστημα 2003-2006 βρέθηκε να είναι σχεδόν διπλάσια (32%) από αυτή που καταγράψαμε [252]. Η παρατηρούμενη διακύμανση δεν είναι σαφές εάν οφείλεται στις νέες, πιο ακριβείς και βελτιωμένες διαγνωστικές μεθόδους που καθιστούν εφικτή τη διαφοροδιάγνωση της νόσου από άλλες καταστάσεις με παρόμοια συμπτωματολογία ή εάν πράγματι αντανακλά σε μείωση του επιπολασμού της νόσου στις μέρες μας. Συγχρόνως, ο πληθυσμός της προαναφερθείσας μελέτης αφορούσε συμπτωματικές γυναίκες υψηλής κοινωνικοοικονομικής θέσης, γεγονός που θα μπορούσε να επηρεάσει παράγοντες κινδύνου, όπως την προσωπική τους υγιεινή και τη σεξουαλική

τους συμπεριφορά, και κατ' επέκταση την εμφάνιση της VVC, με αποτέλεσμα τα συμπεράσματα της ενδεχομένως να μην μπορούν να μεταφραστούν με ασφάλεια στο γενικό πληθυσμό. Από την άλλη πλευρά, μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε το διάστημα 2012-2017 ανέφερε 12% συχνότητα εμφάνισης της νόσου στη χώρα μας [254], υποδεικνύοντας μια ενδεχόμενη αύξηση τη σήμερον ημέρα. Ίσως, η αύξηση αυτή να οφείλεται στο σύγχρονο τρόπο ζωής, ο οποίος χαρακτηρίζεται από αυξημένη δημοτικότητα μεθόδων αντισύλληψης, όπως τα IUDs και το OCP και από την ευρεία χρήση αντιβιοτικών για την αντιμετώπιση μια μεγάλης ποικιλίας παθήσεων, παράγοντες που αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης νόσου [10] [7].

Στο ίδιο διάστημα, ο επιπολασμός της RVVC βρέθηκε να είναι 5% [254], ποσοστό που συμβαδίζει με τα ευρήματα μας. Η ενημέρωση και η εκπαίδευση των γυναικών σε θέματα σχετικά με την προσωπική τους υγιεινή, ο ρόλος της σωστής διατροφής στη διατήρηση της γενικότερης υγείας του οργανισμού, η γνώση και η αποφυγή των παραγόντων κινδύνου ίσως να περιόρισε τον αριθμό των γυναικών που καταφεύγουν στην αυτοδιάγνωση. Έτσι, μέσω της αναζήτησης ιατρικής βοήθειας, η νόσος επιβεβαιώνεται εργαστηριακά και καθίσταται εφικτή η καλύτερη διαγνωστική και θεραπευτική προσέγγιση της. Αν και στην περίπτωση της RVVC οι διαθέσιμες θεραπευτικές επιλογές είναι πιο περιορισμένες, εντούτοις θεραπευτικές στρατηγικές που αποσκοπούν όχι μόνο στην εξάλειψη του υπεύθυνου μικροβιακού παράγοντα, αλλά και στην ταυτόχρονη αντιμετώπιση της υποκείμενης αιτίας φαίνεται να είναι καίριας σημασίας στην πρόληψη των υποτροπών [265].

Η πλειοψηφία των περιστατικών (79%) που καταγράφηκαν στη μελέτη μας αφορούσε γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας (< 48 ετών), εύρημα που επιβεβαιώνουν και άλλες μελέτες [259] [266] [267]. Το γεγονός αυτό πιθανώς να οφείλεται στα αυξημένα επίπεδα οιστρογόνων που χαρακτηρίζουν τη γόνιμη περίοδο της ζωής μιας γυναίκας, τα οποία ενισχύουν την προσκόλληση και την υπερανάπτυξη της *Candida* στο κολπικό επιθήλιο, ή/και στην πιο ενεργή σεξουαλική δραστηριότητα των γυναικών που ανήκουν στην ηλικιακή αυτή ομάδα [268] [269]. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε σημαντικό ποσοστό των ασθενών (67%) διαπιστώθηκε διαταραχή της φυσιολογικής κολπικής μικροχλωρίδας τους, ενώ ένα μεγάλο μέρος αυτών (56%) είχε λάβει αντιβιοτική αγωγή έως 1 μήνα πριν την εκδήλωση της νόσου. Κύρια αιτία της εμφάνισης VVC στις περιπτώσεις αυτές φάνηκε να είναι ο περιορισμένος

αριθμός γαλακτοβακίλλων. Πράγματι, ορισμένες κατηγορίες αντιβιοτικών δύνανται να καταστρέψουν, εκτός από τα παθογόνα βακτήρια, τους ωφέλιμους γαλακτοβακίλλους, οι οποίοι δρουν ως προστατευτικός μηχανισμός έναντι της υπερανάπτυξης της *Candida* στο περιβάλλον του κόλπου [270] [271]. Επιπλέον, σε μια μεγάλη μερίδα των ασθενών (72%) ανιχνεύθηκε συνλοίμωξη με άλλα μικρόβια, ως επί το πλείστον βακτήρια. Τα διαθέσιμα βιβλιογραφικά δεδομένα αναφορικά με περιστατικά συνλοίμωξης VVC με άλλες κολπικές μικροβιακές λοιμώξεις είναι περιορισμένα. Ωστόσο, ορισμένα είδη βακτηρίων ενδέχεται να παρουσιάζουν συνεργικές αλληλεπιδράσεις με τη *Candida* ενισχύοντας το ένα την παθογονικότητα και τη λοιμογόνο δράση του άλλου [128] [126].

Κύριος αιτιολογικός παράγοντας της λοίμωξης ήταν η *C. albicans* (50%). Αν και παλαιότερες χρονολογικά μελέτες κατέγραψαν υψηλότερα ποσοστά απομόνωσης της *C. albicans* (63-90%) [272] [273] [274], πρόσφατες μελέτες αναφέρουν ποσοστά παρόμοια με τα δικά μας (44-59%) [275] [276] [277] [278] [279]. Σημειωτέον, η σταδιακή αύξηση στη συχνότητα απομόνωσης non-*albicans Candida* spp. αντανακλάται σε πολλές έρευνες τα τελευταία χρόνια [13] [275] [279] [278]. Ενδεχομένως η αλόγιστη χρήση αντιμυκητικών παραγόντων να έχει οδηγήσει σε επιβίωση των non-*albicans Candida* spp, τα οποία είναι ανθεκτικότερα στη θεραπεία πρώτης γραμμής συγκριτικά με την *C. albicans* [13].

Αν και οι Grigoriou et al, ανέφεραν, πως η λήψη αντιβιοτικών προδιαθέτει για κολπίτιδα από non-*albicans Candida* spp., η εγκυμοσύνη για κολπίτιδα από *C. albicans* και η εμμηνόπαυση δεν επηρεάζει τη διασπορά του είδους [96], τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας δε συμφωνούν με τα προαναφερθέντα. Ειδικότερα, η διασπορά *C. albicans* και non-*albicans Candida* spp. δε διέφερε σε περιπτώσεις ύπαρξης εγκυμοσύνης. Ωστόσο, πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι οι έγκυες γυναίκες αντιπροσώπευαν μόλις το 3% του πληθυσμού μας, γεγονός που δεν μπορεί να οδηγήσει στην εξαγωγή οριστικών συμπερασμάτων με ασφάλεια. Ένας ακόμη παράγοντας που φάνηκε να μην επηρεάζει τη διασπορά μεταξύ *C. albicans* και non-*albicans Candida* spp. ήταν η λήψη αντιβιοτικών. Η υφιστάμενη βιβλιογραφία αν και συσχετίζει τη λήψη αντιβιοτικών με την εκδήλωση νόσου, εντούτοις δεν αναφέρεται στην κατανομή των ειδών σε περιπτώσεις μετα-αντιβιοτικής αιδοιοκολπίτιδας από *Candida* spp. [280], [112]. Συνεπώς αυτή η αύξηση στην απομόνωση των non-*albicans Candida* spp. που παρατηρήθηκε στην περίπτωση ασθενών που είχαν προσφάτως λάβει

αντιβιοτικά, ενδεχομένως να οφείλεται στη συνολική αύξηση της συχνότητας απομόνωσης των ειδών αυτών, όπως αυτή περιγράφηκε παραπάνω. Από την άλλη, η συχνότητα εμφάνισης λοιμώξεων από non-*albicans Candida* spp. ήταν σημαντική υψηλότερη σε περι-/μετα-εμμηνοπαυσιακές γυναίκες, όπως επιβεβαιώνει η παγκόσμια βιβλιογραφία [281]. Τέλος, αξίζει να επισημανθεί πως το 7% των περιπτώσεων αφορούσε λοιμώξεις από ≥ 2 *Candida* spp., με την *C. albicans* να είναι το είδος που απομονώθηκε συχνότερα σε συνδυασμό με άλλα, κυρίως την *C. glabrata*, όπως αναφέρουν και προηγούμενες μελέτες [282] [254]. Η χρήση χρωμογόνων θρεπτικών υλικών φαίνεται να παίζει καθοριστικό ρόλο στην αναγνώριση μεικτών λοιμώξεων από διαφορετικά *Candida* spp., τα οποία ενδεχομένως έχουν και διαφορετικό προφίλ *in vitro* ευαισθησίας στα αντιμυκητικά, συμβάλλοντας έτσι στην αποτελεσματικότερη θεραπευτική προσέγγιση της νόσου.

Προηγούμενες μελέτες από την Ελλάδα ανέφεραν ποσοστά απομόνωσης *C. albicans* μεταξύ 76-99,6% [96] [252] [254]. Ωστόσο, εκτός της προαναφερθείσας τάσης επικράτησης των non-*albicans Candida* spp. στις μέρες μας, πρέπει να σημειωθεί ότι η ταυτοποίηση των στελεχών σε εκείνες τις περιπτώσεις είχε πραγματοποιηθεί με δοκιμασίες ζύμωσης/αφομοίωσης σακχάρων (API 20 ή Vitek 2, BioMérieux), οι οποίες είναι επιρρεπείς σε σφάλματα [283] [284]. Μάλιστα, και στη δική μας περίπτωση, όταν η ταυτοποίηση των παθογόνων σε επίπεδο είδους πραγματοποιήθηκε αρχικά με χρωματομετρική ανάλυση απορρόφησης σακχάρων (Auxacolor™ 2, Biorad), το ποσοστό σφάλματος ήταν 9%. Οι αστοχίες που σημειώθηκαν αφορούσαν κυρίως σε λανθασμένη ταυτοποίηση ενός σημαντικού ποσοστού (26%) των στελεχών *C. glabrata*, γεγονός κρίσιμης σημασίας δεδομένου ότι το συγκεκριμένο *Candida* spp. παρουσιάζει ενδογενή αντοχή στη θεραπεία εκλογής για τη VVC. Επίσης, σε ορισμένες περιπτώσεις η συμβατική μέθοδος κατάφερε να ταυτοποιήσει μόνο ένα από τα δύο *Candida* spp. μεικτής καλλιέργειας. Εντούτοις, τα οριστικά αποτελέσματα της μελέτης μας βασίστηκαν στην ταυτοποίηση των στελεχών με το υψηλής ακρίβειας σύστημα MALDI Biotyper® (Bruker) [285]. Αξίζει να σημειωθεί πως συμπλέγματα κρυπτικών ειδών, όπως αυτά της *C. parapsilosis* (*C. parapsilosis sensu stricto*, *C. orthopsilosis* και *C. metapsilosis*) και *C. glabrata* (*C. glabrata sensu stricto*, *C. bracarensis* και *C. nivariensis*), μπορούν να διακριθούν με επιτυχία μέσω της MALDI-ToF MS [286]. Στην παρούσα περίπτωση, η διάκριση μεταξύ *C. parapsilosis* και *C. orthopsilosis* φαίνεται να

προσθέτει σημαντικά στοιχεία στη μελέτη, καθώς τα 2 κρυπτικά είδη έχει βρεθεί ότι παρουσιάζουν διαφορές στο προφίλ της *in vitro* ευαισθησίας τους στα αντιμυκητικά [35], όπως επιβεβαιώνεται και στην εν λόγω έρευνα, όπου προέκυψαν μικρές διαφορές στη σειρά δραστηριότητας των αντιμυκητικών ουσιών.

Μεταξύ άλλων, η παρούσα μελέτη περιγράφει το προφίλ της *in vitro* ευαισθησία μίας συλλογής *Candida spp.* που έχουν συσχετισθεί στο μεγαλύτερο βαθμό με VVC έναντι 8 ευρέως χορηγούμενων αντιμυκητικών ουσιών [287]. Η έρευνά μας κατέληξε πώς η συνολική αντοχή των *Candida spp.* που εξετάστηκαν ήταν 6%. Παρόμοιο ποσοστό είχε προδιορίσει μία ακόμα ελληνική μελέτη στο παρελθόν [254], ενώ στην παγκόσμια βιβλιογραφία αναφέρονται ποσοστά 5-13% [288] [289] [3]. Προκύπτει πως ο επιπολασμός των ανθεκτικών στις αζόλες *Candida spp.* παρουσιάζει γεωγραφική κατανομή, η οποία σύμφωνα με τη βιβλιογραφία ενδέχεται να συνδέεται με την προηγούμενη έκθεση σε αυτούς τους παράγοντες [290]. Αν και υψηλό ποσοστό ασθενών ανά τον κόσμο λαμβάνουν τοπική αντιμυκητική θεραπεία με αζολικά φάρμακα [291], οι υπάρχουσες μελέτες για την *in vitro* ευαισθησία σε αυτές τις ουσίες είναι σημαντικά λιγότερες συγκριτικά με τις αντίστοιχες για αντιμυκητικά που χορηγούνται για συστηματική θεραπεία, κυρίως φλουконаζόλη. Είναι γνωστό, άλλωστε, πως η φλουконаζόλη αποτελεί θεραπεία πρώτης γραμμής για τη VVC. Παράλληλα, το φάρμακο χορηγείται ως θεραπεία συντήρησης σε ασθενείς με RVVC [217]. Η ιτρακοναζόλη αναφέρεται ως θεραπεία δεύτερης γραμμής και ως πρώτη επιλογή για την αντιμετώπιση της VVC από ανθεκτικά στη φλουконаζόλη *Candida spp.* [292]. Αξίζει να σημειωθεί πως τα δύο αυτά αντιμυκητικά, έχουν συνδεθεί με προσωρινή ανακούφιση των συμπτωμάτων οξείας VVC για 20-50% των ασθενών και υποτροπή της νόσου [217]. Συνεπώς, πρέπει να διερευνηθούν περαιτέρω οι αντιμυκητικές ουσίες που συνιστούν την εναλλακτική θεραπεία.

Στην Ελλάδα, όπως υπέδειξε η ανασκόπηση της βιβλιογραφίας, φάρμακα όπως η μικοναζόλη, η κλοτριμαζόλη, η εκοναζόλη και το βορικό οξύ ελέγχθηκαν για πρώτη φορά για τον προσδιορισμό της *in vitro* ευαισθησίας στελεχών που απομονώθηκαν από ασθενείς με VVC, ενώ οι υπόλοιπες ουσίες είχαν διερευνηθεί σε περιορισμένο αριθμό μελετών. Οι υπάρχουσες μελέτες εξετάζουν την *in vitro* ευαισθησία στελεχών σε μία μικρή ομάδα από αντιμυκητικούς παράγοντες, που δε χορηγούνται για VVC, ή μόνο στη φλουконаζόλη.

Ακόμα, ο έλεγχος πραγματοποιείται με μη προτυποποιημένες μεθόδους, διακυβεύοντας με αυτόν τον τρόπο την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων τους. Επομένως, η έως τώρα γνώση για την επιδημιολογία της VVC στην Ελλάδα έρχεται να επεκταθεί σημαντικά μέσω της παρούσας μελέτης. Εξάγονται, από όσο μπορούμε να γνωρίζουμε, τα πρώτα δεδομένα *in vitro* ευαισθησίας *Candida* spp. στα αντιμυκητικά, που χορηγούνται κατά κύριο λόγο εμπειρικά έως τώρα, με την πρότυπη μεθοδολογία της EUCAST.

Ειδικότερα, το 4% των στελεχών *C. albicans* βρέθηκαν ανθεκτικά στη φλουконаζόλη, ποσοστό αντοχής που συμφωνεί πλήρως (4%) με τα μοναδικά διαθέσιμα δεδομένα για ελληνικά στελέχη [254], και με την παγκόσμια βιβλιογραφία να παρουσιάζει αντίστοιχα ή υψηλότερα ποσοστά (4-14%) [293] [289] [294] [295]. Αντιθέτως, δεν εντοπίστηκαν ανθεκτικά στην ιτρακοναζόλη στελέχη *C. albicans*. Μέχρι στιγμής, δεν έχουν υπάρξει δημοσιευμένα ελληνικά δεδομένα για το εν λόγω αντιμυκητικό. Ωστόσο, παρόμοια με τη δική μας επιδημιολογική εικόνα περιγράφεται από το Ιράν [296], ενώ άλλες χώρες, όπως η Κίνα [297] και η Βραζιλία [298], αναφέρουν υψηλότερα ποσοστά αντοχής (0-20%).

Για την *C. glabrata*, οι MICs των εξεταζόμενων αντιμυκητικών ήταν συγκριτικά υψηλότερες από εκείνες της *C. albicans*, όπως αναφέρεται και σε άλλες μελέτες από την Ιαπωνία [299] και την Τουρκία [300]. Συγκεκριμένα, ανθεκτικά στη φλουконаζόλη χαρακτηρίστηκαν το 39% των στελεχών. Αντίστοιχη ελληνοβελγική μελέτη κάνει λόγο για 45% αντοχή του είδους [256]. Έρευνες για τη VVC στην Τουρκία [295] και την Κίνα [297] προσδιόρισαν ανθεκτικότητα 25% και 10%, αντίστοιχα. Πρέπει βέβαια να ληφθεί υπόψη πως ο επιπολασμός των ανθεκτικών στελεχών όχι μόνο δεν είναι ομοιόμορφα γεωγραφικά κατανομημένος, αλλά και αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου. Η *C. glabrata* αποτελεί το μοναδικό είδος με μειωμένη ευαισθησία στην ιτρακοναζόλη, σε αυτήν τη μελέτη, καθώς το 19% των στελεχών ήταν ανθεκτικά. Παρόμοια δεδομένα δημοσιεύτηκαν από έρευνα στο Ιράν [289]. Παρατηρήθηκε πως όλα τα στελέχη είχαν μειωμένες MICs για την ιτρακοναζόλη σε σχέση με τη φλουконаζόλη. Αξίζει να σημειωθεί πως ειδικά για τα είδη με αυξημένη αντοχή στη φλουконаζόλη, όπως οι *C. glabrata* και *C. krusei*, οι τιμές MIC₉₀ για την ιτρακοναζόλη ήταν 4 mg/L και 0,25 mg/L έναντι 128 mg/L και 64 mg/L, που αντιστοιχούσαν στη φλουконаζόλη. Αντίστοιχη ελληνοβελγική μελέτη συγκρίνει τις MICs στελεχών *C. glabrata* για τα φάρμακα κετοκοναζόλη, φεντικοναζόλη, ιτρακοναζόλη και φλουконаζόλη

και μεταξύ αυτών προσδιορίζει μικρότερη τιμή GM για την ιτρακοναζόλη [256], άρα υψηλότερη *in vitro* δραστηριότητα του φαρμάκου.

Στην παρούσα έρευνα, τα στελέχη *C. parapsilosis* ήταν στο σύνολό τους ευαίσθητα στη φλουκοναζόλη και στην ιτρακοναζόλη, ομοίως και σε μελέτη από την Ινδία [301], και στο Ιράν όπου εξετάστηκε και η κετοκοναζόλη και δεν εντοπίστηκε ανθεκτικός πληθυσμός [302]. Επίσης, στις εν λόγω έρευνες, όπως και σε αυτήν εδώ, η *C. parapsilosis* εμφάνισε υψηλότερες MICs συγκριτικά με την *C. albicans* [301] [302]. Η *C. orthopsilosis* απομονώθηκε από μικρό αριθμό δειγμάτων και όπως προέκυψε από τον έλεγχο ευαισθησίας, τα στελέχη του είδους είχαν παρόμοιο προφίλ ευαισθησίας με την *C. parapsilosis* στο σύνολο των αζολικών φαρμάκων. Προηγούμενη μελέτη αναφέρει πως στελέχη *C. parapsilosis sensu stricto* ($n = 49$), *C. orthopsilosis* ($n = 5$) και *C. metapsilosis* ($n = 9$), που είχαν απομονωθεί από ασθενείς με VVC, βρέθηκαν όλα ευαίσθητα στη φλουκοναζόλη και στην ιτρακοναζόλη, ενώ δε διαπιστώθηκαν ιδιαίτερα μεγάλες διαφορές στην ανταπόκριση στη θεραπεία [303]. Το εν λόγω είδος αναφέρεται ως αιτιολογικός παράγοντας και από άλλες έρευνες για VVC [279], αλλά δεν υπάρχουν περισσότερα δεδομένα *in vitro* ευαισθησίας. Τέλος, όλα τα στελέχη *C. krusei* που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη, ήταν WT στη φλουκοναζόλη. Παράλληλα, δεν εντοπίστηκαν στελέχη non-WT στην ιτρακοναζόλη, όπως και σε προηγούμενη έρευνα από την Τουρκία [304].

Αξίζει να τονισθεί πως ένα σημαντικό κενό που έρχεται να καλύψει η παρούσα μελέτη είναι ο προσδιορισμός τιμών EUCAST ECOFFs για 6 αντιμυκητικά που χορηγούνται τοπικά και συστήνονται για τη θεραπεία της VVC, χωρίς όμως να υφίστανται όρια ευαισθησίας για αυτά. Συγκεκριμένα, προσδιορίστηκαν τιμές EUCAST ECOFF μικοναζόλης, κετοκοναζόλης, φεντικοναζόλης, εκοναζόλης, κλοτριμαζόλης και βορικού οξέος για *C. albicans*, *C. parapsilosis* και *C. glabrata*. Η συλλογή τιμών MIC από εργαστήρια ανά τον κόσμο, προκειμένου να δημιουργηθεί μια πρότυπη κανονική κατανομή MICs WT στελεχών, αποτελεί προτεραιότητα της EUCAST και συνιστά βασικό εργαλείο για το μετέπειτα καθορισμό των CBPs.

Μέχρι σήμερα, υπάρχουν διαθέσιμα ελάχιστα σύνολα δεδομένων MICs για τα εν λόγω αντιμυκητικά στη διεθνή βιβλιογραφία, εξ αυτών η πλειοψηφία αφορά CLSI MICs και MICs που έχουν προσδιοριστεί με εμπορικά διαθέσιμες μεθόδους χαμηλότερης αξιοπιστίας. Η παρούσα μελέτη εξήγαγε τα πρώτα δεδομένα με τη μέθοδο της EUCAST για τις ουσίες που

χορηγούνται ως τοπική θεραπεία της VVC. Σύμφωνα με αυτά, η *C. albicans* είχε χαμηλότερες MICs συγκριτικά με τις *C. parapsilosis* και *C. glabrata* στο σύνολο των αζολικών φαρμάκων που εξετάστηκαν. Χαμηλότερες τιμές MIC μικοναζόλης και κλοτριμαζόλης για την *C. albicans* σε σχέση με την *C. glabrata* προσδιορίστηκαν και σε έρευνα σε ιαπωνικά στελέχη που είχαν απομονωθεί από κολπίτιδες [299]. Από το σύνολο των φαρμάκων που εξετάστηκαν, η ιτρακοναζόλη, η κετοκοναζόλη και η κλοτριμαζόλη παρουσίασαν την υψηλότερη δραστηριότητα έναντι της *C. albicans*, αντίστοιχα και σε έρευνες στο Ιράν [302] και στην Ιαπωνία [299]. Σε άλλη μελέτη με στελέχη από την τράπεζα μικροοργανισμών Wayne State Vaginitis Clinic, η *in vitro* δραστηριότητα των κετοκοναζόλης, κλοτριμαζόλης και ιτρακοναζόλης ήταν αυξημένη σε σχέση με εκείνη της μικοναζόλης [305]. Πρέπει να σημειωθεί, όμως, πως αυτή η ανάλυση δε συμπεριέλαβε στελέχη *C. albicans* ευαίσθητα στη φλουκοναζόλη. Οι κατανομές MICs της *C. albicans*, που προέκυψαν από τα δεδομένα μας, ήταν κανονικές με ένα μικρό υποπληθυσμό 8/152 (5%) να παρουσιάζει διασταυρούμενη αντοχή στη μικοναζόλη, την εκοναζόλη και την κετοκοναζόλη. Το φαινόμενο αυτό έχει περιγραφεί στο παρελθόν [290], ενώ παρατηρήθηκε 8% διασταυρούμενη αντοχή στη φλουκοναζόλη και την κετοκοναζόλη για στελέχη *C. albicans* από το Βέλγιο και την Ελλάδα, όμως δεν εξετάστηκαν οι μικοναζόλη και εκοναζόλη [256]. Ακόμα, στον πληθυσμό που εξετάσαμε 15% των στελεχών *C. albicans* ήταν non-WT στη μικοναζόλη. Παρόμοια ποσοστά παρουσίασε έρευνα στην Κόστα Ρίκα, όπου εντοπίστηκε 25% των στελεχών *C. albicans* με μειωμένη ευαισθησία στη μικοναζόλη. Εκεί, όπως αναφέρει η μελέτη, χορηγείται τακτικά μικοναζόλη ως τοπική θεραπεία για την αντιμετώπιση της VVC [306].

Επιπλέον, εξήχθησαν καινούρια δεδομένα αναφορικά και με την *in vitro* ευαισθησία της *C. glabrata* στις ημιδαζόλες. Αναλυτικότερα, ανευρέθησαν 6/31 (19%) στελέχη non-WT στην κετοκοναζόλη, ενώ τα ίδια στελέχη ήταν ανθεκτικά στην ιτρακοναζόλη, τη φλουκοναζόλη και την εκοναζόλη. Ακόμα υψηλότερα ποσοστά αντοχής στην κετοκοναζόλη προσδιορίστηκαν από μελέτη για τη VVC στην Κίνα, όπου 6/8 (75%) στελέχη *C. glabrata* ήταν ανθεκτικά στην κετοκοναζόλη και τη φλουκοναζόλη, αλλά ευαίσθητα στη μικοναζόλη [307]. Παρόμοια έρευνα για τη VVC στο Βέλγιο και την Ελλάδα υπολόγισε πως η τιμή διασταυρούμενης αντοχής του είδους στη φλουκοναζόλη και την κετοκοναζόλη ανερχόταν στο 27% [256]. Η αντοχή της *C. glabrata* σε πολλαπλά αζολικά αντιμυκητικά έχει διαπιστωθεί

από μία σειρά μελετών και είναι πλέον συνυφασμένη με υψηλά ποσοστά αποτυχημένης θεραπείας ή και υποτροπής της VVC [305]. Μάλιστα, σύμφωνα με πενταετή έρευνα στο Μίσιγκαν των ΗΠΑ, η κλινική ανταπόκριση και τα ποσοστά μυκητολογικής εκρίζωσης της *C. glabrata*, που σχετίζονται με τη θεραπεία με τοπικές και συστηματικές αζόλες, ήταν < 50% [208].

Επιπροσθέτως, η *C. parapsilosis* παρουσίασε υψηλότερες τιμές MIC στις ημιδιαζόλες συγκριτικά με την *C. albicans*. Η χαμηλότερη δραστηριότητα των τοπικών αζολικών φαρμάκων εκοναζόλης, μικοναζόλης και κλοτριμαζόλης έναντι της *C. parapsilosis* διαπιστώθηκε και σε γαλλική μελέτη, όπου οι τιμές MIC₉₀ ήταν υψηλότερες κατά 5, 6 και 2 log₂ αραιώσεις, αντίστοιχα [308]. Ειδικά για το ευρέως χρησιμοποιούμενο αντιμυκητικό κετοκοναζόλη, η παρούσα μελέτη υπέδειξε 100% WT φαινότυπο, όπως περιγράφηκε προηγουμένως και σε έρευνες από τη Βραζιλία [309] και την Ισπανία [310]. Σε γενικές γραμμές, η βιβλιογραφία έχει συνδέσει την κολπίτιδα από *C. parapsilosis* με μικρά ποσοστά υποτροπής και ικανοποιητική ανταπόκριση στη θεραπεία με τοπικά αζολικά σκευάσματα. [311] [33].

Σε τούρκικη έρευνα για κολπίτιδες από *C. krusei* εξετάστηκαν 28 στελέχη, και τα πιο δραστικά φάρμακα *in vitro* ήταν η κετοκοναζόλη και η ιτρακοναζόλη, ακολουθούσαν η μικοναζόλη και η εκοναζόλη και τέλος η φλουκοναζόλη [304]. Αυτά έρχονται σε συμφωνία με τη δική μας εκτίμηση, όπου συνεκτιμήσαμε και τα αντιμυκητικά φεντικοναζόλη, κλοτριμαζόλη και βορικό οξύ. Εξ αυτών η κλοτριμαζόλη ήταν η πιο δραστική τοπική ημιδιαζόλη, εύρημα που είχε διαπιστωθεί και στο παρελθόν από αμερικάνικη μελέτη [36].

Τα τελευταία χρόνια, γίνεται ιδιαίτερη μνεία για τη χορήγηση βορικού οξέος ως εναλλακτική αποτελεσματική θεραπεία έναντι των ανθεκτικών στη θεραπεία με αζόλες VVC, ενώ ακόμα αναφέρονται υψηλά ποσοστά κλινικής ίασης των λοιμώξεων από *C. glabrata* [312] και *C. krusei* [36]. Πράγματι, τα αποτελέσματα μας υπέδειξαν ότι ήταν το μοναδικό μεταξύ των υπό μελέτη αντιμυκητικών που η *in vitro* δραστηριότητά του δεν επηρεάζεται από το προφίλ ευαισθησίας του παθογόνου στη φλουκοναζόλη. Μάλιστα, στην παρούσα έρευνα αναφέρθηκε πως επήλθε κλινική ίαση σε 5/6 περιστατικά VVC από στελέχη με διασταυρούμενη αντοχή στα αζολικά φάρμακα. Παρόλα αυτά, απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση των κλινικών επιπτώσεων της χορήγησής του [312].

Για την ώρα δεν έχουν οριστεί επίσημα εύρη συγκεντρώσεων ημιδαζολών και βορικού οξέος για τα προτεινόμενα από την EUCAST πρότυπα στελέχη ποιοτικού ελέγχου. Έτσι, στο πλαίσιο της μελέτης μας ο ποιοτικός έλεγχος των πλακών μικροαραιώσεων πραγματοποιήθηκε με σύγκριση των μετρήσεων μας με διαθέσιμα στη βιβλιογραφία δεδομένα. Επιπλέον, υπήρξε αδυναμία προσδιορισμού της τιμής ECOFF για την κλοτριμαζόλη και τη *C. glabrata* λόγω της δικόρυφης κατανομής των τιμών MIC που προέκυψε. Τέλος, τιμές ECOFF δεν μπόρεσαν να υπολογιστούν στο σύνολο των αντιμυκητικών για τα είδη *C. krusei*, *C. orthopsilosis* και *C. lusitaniae*, λόγω του περιορισμένου αριθμού των εξεταζόμενων στελεχών.

Εν όψει της σταδιακά αυξανόμενης αντοχής των *Candida* spp. στις αζόλες, η ανάγκη για *in vitro* έλεγχο ευαισθησίας στα αντιμυκητικά είναι επιτακτικότερη από ποτέ [265] [313]. Παρόλα αυτά, υποτροπή της νόσου δύναται να παρουσιαστεί ακόμη και μετά τη χορήγηση θεραπείας, η οποία έχει καθοδηγηθεί από τα αποτελέσματα του εργαστηριακού ελέγχου ευαισθησίας του παθογόνου [314]. Τα αίτια των υποτροπών διερευνώνται, με τη βιβλιογραφία να αναφέρει πως τα αζολικά φάρμακα εμφανίζουν μειωμένη *in vitro* δραστηριότητα όταν το pH του θρεπτικού μέσου μειώνεται [294] [315] [316] [305] [6]. Η παρούσα μελέτη επιχείρησε για πρώτη φορά να εξακριβώσει την ύπαρξη αυτού του φαινομένου κατά την εφαρμογή της μεθόδου αναφοράς της EUCAST για τον *in vitro* έλεγχο ευαισθησίας στη φλουконаζόλη και στην ιτρακοναζόλη, οι οποίες χορηγούνται σαν συστηματικές θεραπείες πρώτης και δεύτερης γραμμής για τη VVC, αντίστοιχα [217] [292], έναντι των *Candida* spp. που απομονώνονται συχνότερα σε τέτοια λοίμωξη.

Τα αποτελέσματα μας έδειξαν πως η *in vitro* δραστηριότητα της φλουконаζόλης σε pH 4,5, το οποίο προσομοιώνει αυτό του κόλπου, μειώνεται ανάλογα με το *Candida* spp. Αναλυτικότερα, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των τιμών MIC για τις *C. glabrata* και *C. parapsilosis* συγκριτικά με το συμβατικό έλεγχο ευαισθησίας, η οποία θα μπορούσε να έχει κλινική επίπτωση. Ενώ 12/28 (43%) στελέχη *C. glabrata* ήταν ανθεκτικά στη φλουконаζόλη σε pH 7,0, 28/28 (100%) στελέχη εμφάνισαν αντοχή σε pH 4,5. Αντίστοιχη έρευνα, που πραγματοποιήθηκε εφαρμόζοντας τη μέθοδο αναφοράς κατά CLSI, υπέδειξε πως το ποσοστό αντοχής στη φλουконаζόλη της *C. glabrata* σε pH 7,0 και 4,5 ήταν 60% και 93%, αντίστοιχα, ενώ συγχρόνως παρατηρήθηκε και σημαντική μείωση της *in vitro* δραστηριότητα του

φαρμάκου έναντι της *C. parapsilosis* σε όξινο περιβάλλον (GM CLSI MIC 0,41 έναντι 1,07 mg/L) [294]. Τα ευρήματα μας έρχονται σε συμφωνία με ακόμα μία έρευνα, όπου αναφέρεται αύξηση της τιμής CLSI MIC₅₀ της φλουκοναζόλης για στελέχη *C. glabrata* (16 mg/L σε pH 7,0 έναντι > 64 mg/L σε pH 4,5) [305].

Αντιθέτως, οι τιμές MIC της φλουκοναζόλης για *C. albicans* και *C. krusei* δεν παρουσίασαν σημαντική αύξηση σε pH 4,5. Συγκεκριμένα, καταγράφηκε 4% και 5% αντοχή στη φλουκοναζόλη για στελέχη *C. albicans* σε pH 7,0 και 4,5, αντίστοιχα. Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της CLSI, τα ποσοστά αυτά προσδιορίστηκαν ως 10% και 14% αντίστοιχα, υποδεικνύοντας μη σημαντική επίδραση του pH στο συνδυασμό φλουκοναζόλης-*C. albicans* [294]. Από την άλλη πλευρά, μελέτη κατά CLSI ανέφερε σημαντική αύξηση των τιμών MIC για ανθεκτικά στη φλουκοναζόλη στελέχη *C. albicans* σε όξινο pH, αλλά όχι και για ευαίσθητα [305]. Ωστόσο, αυτό έρχεται σε αντίθεση με μελέτη που έδειξε ότι ενώ 54 στελέχη *C. albicans* είχαν ταξινομηθεί ως ευαίσθητα στη φλουκοναζόλη κατά CLSI pH 7,0, 17/54 (32%) χαρακτηρίστηκαν ως ανθεκτικά σε pH 4,5 [6]. Συνεπώς, για την ώρα, δεν έχει επέλθει συμφωνία στα αποτελέσματα των σχετικών ερευνών. Θα πρέπει να αποσαφηνιστούν τα αίτια των αποκλίσεων στις εργαστηριακές παρατηρήσεις των επιμέρους μελετών και να διεκπεραιωθεί περαιτέρω έρευνα για την επίδραση του όξινου pH στην *in vitro* δραστηριότητα της φλουκοναζόλης.

Απεναντίας, η *in vitro* δραστηριότητα της ιτρακοναζόλης μειώθηκε σημαντικά στο όξινο περιβάλλον ανεξαρτήτως του *Candida* spp. Τα αποτελέσματα μας έρχονται να επιβεβαιώσουν προηγούμενες μελέτες αναφορικά με την αύξηση των τιμών CLSI MICs ιτρακοναζόλης και του ποσοστού ανθεκτικών στελεχών *C. albicans* και *C. glabrata* σε pH 4,5 [305] [294]. Παράλληλα, έρχονται να προσθέσουν δεδομένα για τις *C. parapsilosis* και *C. krusei*, όπου διαπιστώθηκε μετατόπιση του εύρους τιμών MIC προς υψηλότερες συγκεντρώσεις φαρμάκου. Συγκεκριμένα, η EA εντός $\pm 1 \log_2$ αραίωσης μεταξύ των τιμών MIC που ελήφθησαν σε pH 7,0 και 4,5 ήταν η χαμηλότερη για την *C. parapsilosis* (4%) και η υψηλότερη για την *C. krusei* (33%), με την CA ωστόσο να μην επηρεάζεται σημαντικά (96% και 100%, αντίστοιχα). Η βιβλιογραφία δεν αναφέρει έλεγχο ευαισθησίας της *C. krusei* σε όξινο pH, ενδεχομένως επειδή απαντάται σε μικρότερο ποσοστό στις κολπίτιδες, όμως ως παθογόνο έχει συνδεθεί με σημαντικό ποσοστό υποτροπών [296]. Αξίζει να αναφερθεί πως

εντοπίστηκε μελέτη σύμφωνα με την οποία η δραστηριότητα της ιτρακοναζόλης αυξήθηκε ελαφρώς σε όξινο περιβάλλον έναντι 60 στελεχών *C. albicans* που είχαν απομονωθεί από τον κόλπο γυναικών με VVC [315]. Αυτά, έρχονται σε αντίθεση με την παρούσα μελέτη, όπου 24/152 στελέχη του είδους που είχαν αρχικά χαρακτηριστεί ως ευαίσθητα στην ιτρακοναζόλη, ταξινομήθηκαν ως ανθεκτικά σε pH 4,5. Συνεπώς, η δραστηριότητα της ιτρακοναζόλης για *C. albicans* παρουσιάστηκε μειωμένη.

Σε γενικές γραμμές, η προσαρμογή του πρωτοκόλλου EUCAST E.DEF 7.3.2 για τη διενέργεια του έναντι κολπικά απομονωμένων στελεχών *Candida* spp. σε pH 4,5, δεν καθιστά την εφαρμογή του πολυπλοκότερη. Επίσης, ορισμένες μελέτες κάνουν λόγο για περιορισμό ή πλήρη εξάλειψη του φαινομένου της συνεχούς ανάπτυξης (trailing effect) ορισμένων *Candida* spp. σε θρεπτικό μέσο με pH 4,0-4,5 κατά τον έλεγχο της *in vitro* ευαισθησίας τους στις αζόλες με την μέθοδο της CLSI [315] [316], φαινόμενο που υπό κανονικές συνθήκες μπορεί να οδηγήσει στον προσδιορισμό ψευδώς αυξημένων τιμών MIC. Ωστόσο, υπάρχουν ακόμη σημαντικοί περιορισμοί που χρήζουν αντιμετώπισης. Αρχικά, δεν έχουν οριστεί επίσημα εύρη συγκεντρώσεων των αντιμυκητικών σε όξινο pH για τα προτεινόμενα πρότυπα στελέχη που χρησιμοποιούνται κατά τον ποιοτικό έλεγχο των πλακών μικροαραιώσεων. Ένα επιπρόσθετο εμπόδιο αφορά την αλκαλοποίηση του κολπικού pH, κυρίως λόγω της ύπαρξης συνλοίμωξης βακτηριακής αιτιολογίας [317]. Ο συμπτωματικός ή ασυμπτωματικός αποικισμός του κόλπου από παθογόνα βακτήρια συναντάται σε μεγάλο ποσοστό γυναικών με VVC και έχει ενοχοποιηθεί για την πρόκληση της νόσου [318] [319]. Συνεπώς, σε αυτή την περίπτωση αν και ο έλεγχος σε όξινο pH μπορεί να αποκαλύψει διαφορετικό βαθμό ευαισθησίας των εξεταζόμενων στελεχών *Candida*, σε σχέση με τη διενέργειά του σε ουδέτερο pH, τα αποτελέσματά του είναι δυνατό να μην αντιπροσωπεύουν την κλινική πραγματικότητα.

Έχοντας λάβει υπόψη όλα τα παραπάνω, φαίνεται πως υπάρχει κλινική αξία στην εκτέλεση του έλεγχου της *in vitro* ευαισθησίας των κολπικά απομονωμένων στελεχών *Candida* spp. στα αντιμυκητικά με θρεπτικό μέσο όξινου pH, ειδικά σε περιστατικά RVVC όπου το παθογόνο δεν έχει την αναμενόμενη ανταπόκριση στη θεραπεία. Όπως προκύπτει, η μεταβολή των τιμών MIC και της κατηγοριοποίησης των στελεχών δεν είναι σταθερή, αλλά εξαρτάται σημαντικά από το είδος τόσο του αντιμυκητικού που εξετάζεται όσο και του

στελέχους που έχει ενοχοποιηθεί για τη VVC. Η συναξιολόγηση της κλινικής κατάστασης της ασθενούς, καθώς και η συστηματική παρακολούθηση της έκβασης της νόσου από τον θεράποντα ιατρό, είναι σημαίνουσας σημασίας. Τέλος, τα αποτελέσματα του ελέγχου ευαισθησίας στα αντιμυκητικά αντικατοπτρίζουν τον *in vitro* φαινότυπο των παθογόνων, αλλά δεν τον συσχετίζουν με την ανταπόκριση των ασθενών στην εκάστοτε θεραπεία. Συνεπώς, υπάρχει ανάγκη για περεταίρω διερεύνηση του ενδεχόμενου αποτυχίας της θεραπείας λόγω μειωμένης δραστηριότητας των αζολικών φαρμάκων στον κόλπο υγιών γυναικών.

Συμμετοχή σε δράσεις διάχυσης της μελέτης

Μέρος των αποτελεσμάτων της παρούσας διπλωματικής εργασίας παρουσιάστηκαν σε διεθνές συνέδριο με κριτές. Ειδικότερα,

1. V. Kroustali, E. Resoulai, L. Kanioura, M. Vargiami, M. Siopi, S. Pournaras, S. Antonopoulou, J. Meletiadis. The impact of pH on susceptibility testing of azoles against *Candida* vaginal isolates using the EUCAST reference methodology (P052, αναρτημένη ανακοίνωση). 11th Trends in Medical Mycology, 20-23/10/2023, Athens, Greece.
2. E. Resoulai, V. Kroustali, L. Kanioura, M. Siopi, S. Pournaras, S. Antonopoulou, J. Meletiadis. Epidemiological trends of vulvovaginal candidiasis among symptomatic women in Greece (P237, αναρτημένη ανακοίνωση). 11th Trends in Medical Mycology, 20-23/10/2023, Athens, Greece.

Βιβλιογραφία

- [1] Martin Lopez, Juliana Ester, «Candidiasis (vulvovaginal),» *BMJ clinical evidence*, vol. 2015, no. 815, 16 Mar. 2015.
- [2] «STI Treatment Guidelines, 2021,» Centers for Disease Control and Prevention, [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.cdc.gov/std/treatment-guidelines/candidiasis.htm>. [Πρόσβαση 1 September 2023].
- [3] Zhang, Jie-Yu et al., «Vulvovaginal candidiasis: species distribution, fluconazole resistance and drug efflux pump gene overexpression,» *Mycoses*, vol. 57, no. 10, pp. 584-91, 2014. doi:10.1111/myc.12204.
- [4] Berkow et al., «Antifungal Susceptibility Testing: Current Approaches,» *Clinical microbiology reviews*, vol. 33, no. 3 e00069-19, 29 Apr. 2020. doi:10.1128/CMR.00069-19.
- [5] The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, «Overview of antifungal ECOFFs and clinical breakpoints for yeasts, moulds and dermatophytes using the EUCAST using the EUCAST E.Def 7.4, E.Def 9.4 and E.Def 11.0 procedures. Version 4.0, 2023.,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <http://www.eucast.org>. [Πρόσβαση 5 September 2023].
- [6] Sobel, Jack D, and Robert Akins, «Determining Susceptibility in Candida Vaginal Isolates,» *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 66, no. 6 e0236621, 2022. doi:10.1128/aac.02366-21.
- [7] Gonçalves, Bruna et al., «Vulvovaginal candidiasis: Epidemiology, microbiology and risk factors,» *Critical reviews in microbiology*, vol. 42, no. 6, pp. 905-27, 2016. doi:10.3109/1040841X.2015.1091805.
- [8] Denning, David W et al., «Global burden of recurrent vulvovaginal candidiasis: a systematic review,» *The Lancet. Infectious diseases*, vol. 18, no. 11 e339-e347, 2018. doi:10.1016/S1473-3099(18)30103-8.
- [9] Sobel, Jack D, «Vulvovaginal candidosis,» *Lancet (London, England)*, vol. 369, no 9577, pp. 1961-71, 2007. doi:10.1016/S0140-6736(07)60917-9.
- [10] Jacob, Louis et al., «Prevalence of vulvovaginal candidiasis in gynecological practices in Germany: A retrospective study of 954,186 patients,» *Current medical mycology*, vol. 4, no. 1, pp. 6-11, 2018. doi:10.18502/cmm.4.1.27.

- [11] Benedict, Kaitlin, et al., «Survey of Incidence, Lifetime Prevalence, and Treatment of Self-Reported Vulvovaginal Candidiasis, United States, 2020,» *BMC Women's Health*, vol. 22, no. 1, 2022, doi:10.1186/s12905-022-01741-x.
- [12] Yano, Junko, et al., «Current Patient Perspectives of Vulvovaginal Candidiasis: Incidence, Symptoms, Management and Post-Treatment Outcomes,» *BMC Women's Health*, vol. 19, no. 1, 2019. doi:10.1186/s12905-019-0748-8.
- [13] Makanjuola, Olufunmilola et al., «An Update on the Roles of Non-albicansCandida Species in Vulvovaginitis,» *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, vol. 4, no. 4, p. 121, 31 Oct. 2018. doi:10.3390/jof4040121.
- [14] Achkar, Jacqueline M, and Bettina C Fries, «Candida infections of the genitourinary tract,» *Clinical microbiology reviews*, vol. 23, no. 2, pp. 253-73, 2010. doi:10.1128/CMR.00076-09.
- [15] Tressler, Andrea Boyd et al, «371. Risk Factors for Non-Albicans Candidal Vulvovaginitis,» *Open Forum Infectious Diseases*, vol. 5, Suppl 1 S145, 26 Nov. 2018. doi:10.1093/ofid/ofy210.382.
- [16] Bohannon, N. J. V., «Treatment of Vulvovaginal Candidiasis in Patients With Diabetes,» *Diabetes Care*, vol 21, no. 3, pp. 451–456, 1998. doi:10.2337/diacare.21.3.451 .
- [17] A. Ignjatović et al., «Recurrent Vulvovaginal Candidosis and Cluster Analysis of Clinical Signs and Symptoms: A Laboratory-Based Investigation,» *Journal of Fungi*, vol. 6, no. 3, p. 113, Jul. 2020. doi: 10.3390/jof6030113.
- [18] Correia, Alexandra et al., «Candida bracarensis sp. nov., a novel anamorphic yeast species phenotypically similar to Candida glabrata,» *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, vol. 56, Pt. 1, pp. 313-7, 2006. doi:10.1099/ijms.0.64076-0.
- [19] Boidin J, Pignal MC, Besson M., «Le genre Pichia sensu lato (quatrième contribution),» *ull de la Société Mycologique de France*, vol 81 , pp. 566–606, 1965.
- [20] Ghaddar, Nahed et al., «Prevalence and antifungal susceptibility of Candida albicans causing vaginal discharge among pregnant women in Lebanon,» *BMC infectious diseases*, vol. 20, no. 1, p 32, 13 Jan. 2020. doi:10.1186/s12879-019-4736-2.
- [21] Lopes, José Pedro, and Michail S Lionakis, «Pathogenesis and virulence of Candida albicans,» *Virulence*, vol. 13, no. 1, pp. 89-121, 2022. doi:10.1080/21505594.2021.2019950.
- [22] Farr, Alex et al., «Guideline: Vulvovaginal candidosis (AWMF 015/072, level S2k),» *Mycoses*, vol. 64, no. 6, pp. 583-602, 2021. doi:10.1111/myc.13248.

- [23] Roetzer, Andreas et al., «From *Saccharomyces cerevisiae* to *Candida glabrata* in a few easy steps: important adaptations for an opportunistic pathogen,» *FEMS microbiology letters*, vol. 314, no. 1, pp. 1-9, 2009. doi:10.1111/j.1574-6968.2010.02102.x.
- [24] Mendling, W et al., «Vulvovaginal Candidosis (excluding chronic mucocutaneous candidosis). Guideline of the German Society of Gynecology and Obstetrics (AWMF Registry No. 015/072, S2k Level, December 2013),» *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*, vol. 75, no. 4, pp. 342-354, 2015. doi:10.1055/s-0035-1545741.
- [25] Paul L et al., «*Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*,» *Clinical microbiology reviews*, vol. 12, no. 1, pp. 80-96, 1999. doi:10.1128/CMR.12.1.80.
- [26] Gunther, Luciene Setsuko Akimoto et al., «Prevalence of *Candida albicans* and non-*albicans* isolates from vaginal secretions: comparative evaluation of colonization, vaginal candidiasis and recurrent vaginal candidiasis in diabetic and non-diabetic women,» *Sao Paulo medical journal = Revista paulista de medicina*, vol. 132, no. 2, pp. 116-20, 2014. doi:10.1590/1516-3180.2014.1322640.
- [27] Hettiarachchi N, Ashbee HR, Wilson JD, «Prevalence and management of non-*albicans* vaginal candidiasis,» *Sexually transmitted infections*, vol. 86, no. 2, pp. 99-100, 2010. doi:10.1136/sti.2009.040386.
- [28] Alcoba-Flórez, Julia et al., «Phenotypic and molecular characterization of *Candida nivariensis* sp. nov., a possible new opportunistic fungus,» *Journal of clinical microbiology*, vol. 43, no. 8, pp. 4107-11, 2005. doi:10.1128/JCM.43.8.4107-4111.2005.
- [29] Butler, G., Rasmussen, M., Lin, M. et al, «Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes,» *Nature*, vol. 459, pp. 657–662, 2009. <https://doi.org/10.1038/nature08064>.
- [30] Deorukhkar, Sachin C et al., «Virulence Factors Contributing to Pathogenicity of *Candida tropicalis* and Its Antifungal Susceptibility Profile,» *International journal of microbiology*, vol. 2014, 2014. doi:10.1155/2014/456878.
- [31] Arastehfar, Amir et al, «Antifungal susceptibility, genotyping, resistance mechanism, and clinical profile of *Candida tropicalis* blood isolates,» *Medical Mycology*, vol. 58, no. 6, 2019, pp. 766–773, <https://doi.org/10.1093/mmy/myz124>.
- [32] Fan, Xin, et al., «High prevalence of fluconazole resistant *Candida tropicalis* among candiduria samples in China: An ignored matter of concern,» *Frontiers in Microbiology*, vol. 14, 2023. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1125241>.

- [33] Nyirjesy, Paul et al., «Vaginal *Candida parapsilosis*: pathogen or bystander?,» *Infectious diseases in obstetrics and gynecology*, vol. 13, no.1, pp. 37-41, 2005. doi:10.1080/10647440400025603.
- [34] Tavanti, Arianna et al., «*Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III,» *Journal of clinical microbiology*, vol. 43, no. 1, pp. 284-92, 2005. doi:10.1128/JCM.43.1.284-292.2005.
- [35] Brilhante, Raimunda Sâmia Nogueira et al., «Antifungal susceptibility and virulence of *Candida parapsilosis* species complex: an overview of their pathogenic potential,» *Journal of medical microbiology*, vol. 67, no. 7, pp. 903-914, 2018. doi:10.1099/jmm.0.000756.
- [36] Singh, Shivani, et al., «Vaginitis Due To *Candida Krusei*: Epidemiology, Clinical Aspects, and Therapy,» *Clinical Infectious Diseases*, vol. 35, no. 9, Nov. 2002, pp. 1066–1070, <https://doi.org/10.1086/343826>.
- [37] Sullivan, D J et al., «*Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals,» *Microbiology (Reading, England)*, vol. 141 (Pt 7), pp. 1507-21, 1995. doi:10.1099/13500872-141-7-1507.
- [38] Tietz, H J et al., «*Candida africana* sp. nov., a new human pathogen or a variant of *Candida albicans*?,» *Mycoses*, vol. 44, no. 11-12, pp. 437-45, 2001. doi:10.1046/j.1439-0507.2001.00707.x.
- [39] Oliva, Maria de las Mercedes, et al., «Natural Products as Alternative Treatments for *Candida* Species Resistant to Conventional Chemotherapeutics,» *Fighting Multidrug Resistance with Herbal Extracts, Essential Oils and Their Components*, nol. 1, pp. 31–43, 2013. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-398539-2.00004-5>.
- [40] Kolekar, Ketan, et al., «Chronic Vulvovaginitis Caused by *Candida Dubliniensis* in an Immunologically Competent Adult Female,» *International Journal of STD & AIDS*, vol. 30, no. 1, pp. 90–93, 31 Aug. 2018. <https://doi.org/10.1177/0956462418792113>.
- [41] Kean, Ryan, and Gordon Ramage, «Combined Antifungal Resistance and Biofilm Tolerance: the Global Threat of *Candida auris*,» *mSphere*, vol. 4, no. 4 e00458-19, 31 Jul. 2019. doi:10.1128/mSphere.00458-19.
- [42] Kumar, Dharmendra et al., «Itraconazole-resistant *Candida auris* with phospholipase, proteinase and hemolysin activity from a case of vulvovaginitis,» *Journal of infection in developing countries*, vol. 9, no. 4, pp. 435-7, 15 Apr. 2015. doi:10.3855/jidc.4582.

- [43] Kumar, Sunil et al., «Overview on the Infections Related to Rare Candida Species,» *Pathogens (Basel, Switzerland)*, vol. 11, no. 9, p. 963, 24 Aug. 2022. doi:10.3390/pathogens11090963.
- [44] Savini, Vincenzo et al., «Two cases of vaginitis caused by itraconazole-resistant *Saccharomyces cerevisiae* and a review of recently published studies,» *Mycopathologia*, vol. 166, no. 1, pp. 47-50, 2008. doi:10.1007/s11046-008-9119-y.
- [45] de Cássia Orlandi Sardi, Janaina, et al., «Vulvovaginal Candidiasis: Epidemiology and Risk Factors, Pathogenesis, Resistance, and New Therapeutic Options,» *Current Fungal Infection Reports*, vol. 15, no. 1, pp. 32–40, 2021. <https://doi.org/10.1007/s12281-021-00415-9>.
- [46] Sobel, J D et al., «Vaginitis due to *Saccharomyces cerevisiae*: epidemiology, clinical aspects, and therapy,» *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, vol. 16, no. 1, pp. 93-9, 1993. doi:10.1093/clinids/16.1.93.
- [47] Ene, Iuliana V et al., «Metabolism in fungal pathogenesis,» *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, vol. 4, no. 12 a019695, 4 Sep. 2014. doi:10.1101/cshperspect.a019695.
- [48] Chaffin, W L et al., «Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression,» *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, vol. 62, no. 1, pp. 130-80, 1998. doi:10.1128/MMBR.62.1.130-180.1998.
- [49] Sachivkina, Nadezhda et al., «Morphological characteristics of *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, and *Candida glabrata* biofilms, and response to farnesol,» *Veterinary world*, vol. 14, no. 6, pp. 1608-1614, 2021. doi:10.14202/vetworld.2021.1608-1614.
- [50] Morschhäuser, Joachim, «Regulation of white-opaque switching in *Candida albicans*,» *Medical microbiology and immunology*, vol. 199, no. 3, pp. 165-72, 2010. doi:10.1007/s00430-010-0147-0.
- [51] Tao, Li et al., «Discovery of a "white-gray-opaque" tristable phenotypic switching system in *Candida albicans*: roles of non-genetic diversity in host adaptation,» *PLoS biology*, vol. 12, no. 4 e1001830, 1 Apr. 2014, doi:10.1371/journal.pbio.1001830.
- [52] Silva, Sónia et al., «*Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance,» *FEMS microbiology reviews*, vol. 36, no. 2, pp. 288-305, 2012. doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00278.x.
- [53] Jayatilake, J A M S et al., «Quantitative evaluation of tissue invasion by wild type, hyphal and SAP mutants of *Candida albicans*, and non-*albicans* *Candida* species in

reconstituted human oral epithelium,» *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, vol. 35, no. 8, pp. 484-91, 2006. doi:10.1111/j.1600-0714.2006.00435.x.

- [54] Kumamoto, Carol A, and Marcelo D Vences, «Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence,» *Cellular microbiology*, vol. 7, no. 11, pp. 1546-54, 2005. doi:10.1111/j.1462-5822.2005.00616.x.
- [55] Sardi, J C O et al., «*Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options,» *Journal of medical microbiology*, vol. 62,Pt 1, pp. 10-24, 2013. doi:10.1099/jmm.0.045054-0.
- [56] Kreve, Simone, and Andréa C Dos Reis, «Bacterial adhesion to biomaterials: What regulates this attachment? A review,» *The Japanese dental science review*, vol. 57, pp. 85-96, 2021. doi:10.1016/j.jdsr.2021.05.003.
- [57] Gulati, Megha, and Clarissa J Nobile, «*Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms,» *Microbes and infection*, vol. 18, no. 5, pp. 310-21, 2013. doi:10.1016/j.micinf.2016.01.002.
- [58] Rodríguez-Cerdeira, Carmen et al., «Biofilms and vulvovaginal candidiasis,» *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, vol. 174, pp. 110-125, 2019. doi:10.1016/j.colsurfb.2018.11.011.
- [59] Schaller, Martin et al., «Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*,» *Mycoses*, vol. 48, no. 6, pp. 365-77, 2005. doi:10.1111/j.1439-0507.2005.01165.x.
- [60] Mohandas, Vinitha, and Mamatha Ballal, «Distribution of *Candida* species in different clinical samples and their virulence: biofilm formation, proteinase and phospholipase production: a study on hospitalized patients in southern India,» *Journal of global infectious diseases*, vol. 3, no. 1, pp. 4-8, 2011. doi:10.4103/0974-777X.77288.
- [61] De Bernardis, F et al., «Evidence for a role for secreted aspartate proteinase of *Candida albicans* in vulvovaginal candidiasis,» *The Journal of infectious diseases*, vol. 161, no. 6, pp. 1276-83, 1990. doi:10.1093/infdis/161.6.1276.
- [62] Lian, Cui Hong, and Wei Da Liu, «Differential expression of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase in human vulvovaginal candidiasis,» *Mycoses*, vol. 50, no. 5, pp. 83-90, 2007. doi:10.1111/j.1439-0507.2007.01384.x.
- [63] Ghannoum, M A, «Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis,» *Clinical microbiology reviews*, vol. 13, no. 1, pp. 122-43, table of contents, 2000. doi:10.1128/CMR.13.1.122.

- [64] Naglik, Julian R et al., «Candidalysin: discovery and function in *Candida albicans* infections,» *Current opinion in microbiology*, vol. 52, pp. 100-109, 2019. doi:10.1016/j.mib.2019.06.002.
- [65] da Silva Dantas, Alessandra et al., «Cell biology of *Candida albicans*-host interactions,» *Current opinion in microbiology*, vol. 34, pp. 111-118, 2016. doi:10.1016/j.mib.2016.08.006.
- [66] Höfs, Sarah et al., «Interaction of *Candida albicans* with host cells: virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota,» *Journal of microbiology (Seoul, Korea)*, vol. 54, no. 3, pp. 149-69, 2016. doi:10.1007/s12275-016-5514-0.
- [67] Rosentul, Diana C et al., «Gene polymorphisms in pattern recognition receptors and susceptibility to idiopathic recurrent vulvovaginal candidiasis,» *Frontiers in microbiology*, vol. 5, p. 483, 23 Sep. 2014. doi:10.3389/fmicb.2014.00483.
- [68] Kalia, Namarta et al., «A Comprehensive in Silico Analysis of Regulatory SNPs of Human CLEC7A Gene and Its Validation as Genotypic and Phenotypic Disease Marker in Recurrent Vulvovaginal Infections,» *Frontiers in cellular and infection microbiology*, vol. 8, no. 65, 2018 doi:10.3389/fcimb.2018.00065.
- [69] Bruno, Vincent M et al., «Transcriptomic analysis of vulvovaginal candidiasis identifies a role for the NLRP3 inflammasome,» *mBio*, vol. 6, no. 2, 21 Apr. 2015. doi:10.1128/mBio.00182-15.
- [70] G. e. a. Renga, «IL-9 Integrates the Host-*Candida* Cross-Talk in Vulvovaginal Candidiasis to Balance Inflammation and Tolerance,» *Frontiers in immunology*, vol. 9 2702, 20 Nov. 2018. doi:10.3389/fimmu.2018.02702.
- [71] Borghi, Monica et al., «Targeting the Aryl Hydrocarbon Receptor With Indole-3-Aldehyde Protects From Vulvovaginal Candidiasis via the IL-22-IL-18 Cross-Talk,» *Frontiers in immunology*, vol. 10 2364. 11 Oct. 2019. doi:10.3389/fimmu.2019.02364.
- [72] Roselletti, Elena et al., «Vaginal Epithelial Cells Discriminate Between Yeast and Hyphae of *Candida albicans* in Women Who Are Colonized or Have Vaginal Candidiasis,» *The Journal of infectious diseases*, vol. 220, no. 10, pp. 1645-1654, 2019. doi:10.1093/infdis/jiz365.
- [73] H. e. a. Kotani, «Relationship Between Human β -Defensin 2 and the Vaginal Environment,» *Japanese journal of infectious diseases*, vol. 73, no. 3, pp. 214-220, 2020. doi:10.7883/yoken.JJID.2019.190.
- [74] Carvalho, Agostinho et al., «Dectin-1 isoforms contribute to distinct Th1/Th17 cell activation in mucosal candidiasis,» *Cellular & molecular immunology*, vol. 9, no. 3, pp. 276-86, 2012. doi:10.1038/cmi.2012.1.

- [75] Fidel, Paul L Jr., «“History and update on host defense against vaginal candidiasis,» *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)*, vol. 57, no. 1, pp. 2-12, 2007. doi:10.1111/j.1600-0897.2006.00450.x.
- [76] Rosati, Diletta et al., «Recurrent Vulvovaginal Candidiasis: An Immunological Perspective,» *Microorganisms*, vol. 8, no. 2, p. 144, 21 Jan. 2020. doi:10.3390/microorganisms8020144.
- [77] Dong, Zhiyong et al., «Vaginal Exposure to *Candida albicans* During Early Gestation Results in Adverse Pregnancy Outcomes via Inhibiting Placental Development,» *Frontiers in microbiology*, vol. 12 816161. 24 Feb. 2022. doi:10.3389/fmicb.2021.816161.
- [78] Aguin, T J, and J D Sobel, «Vulvovaginal candidiasis in pregnancy,» *Current infectious disease reports*, vol. 17, no. 6, p. 462, 2015. doi:10.1007/s11908-015-0462-0.
- [79] Wang, Xinyan et al., «The role of IL-15 on vulvovaginal candidiasis in mice and related adverse pregnancy outcomes,» *Microbial pathogenesis*, vol. 166, 2022. doi:10.1016/j.micpath.2022.105555.
- [80] Disha, Tasfia, and Fahim Haque, «Prevalence and Risk Factors of Vulvovaginal Candidosis during Pregnancy: A Review,» *Infectious diseases in obstetrics and gynecology*, vol. 2022 6195712. 20 Jul. 2022, doi:10.1155/2022/6195712.
- [81] Leli, C et al., «Association of pregnancy and *Candida* vaginal colonization in women with or without symptoms of vulvovaginitis,» *Minerva ginecologica*, vol. 65, no. 3, pp. 303-9, 2013.
- [82] Farr, Alex et al., «Effect of asymptomatic vaginal colonization with *Candida albicans* on pregnancy outcome,» *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*, vol. 94, no. 9, pp. 989-96, 2015. doi:10.1111/aogs.12697.
- [83] Holzer, Iris et al., «The colonization with *Candida* species is more harmful in the second trimester of pregnancy,» *Archives of gynecology and obstetrics*, vol. 295, no. 4, pp. 891-895, 2017. doi:10.1007/s00404-017-4331-y.
- [84] Kumwenda, Pizga et al., «Estrogen promotes innate immune evasion of *Candida albicans* through inactivation of the alternative complement system,» *Cell reports*, vol. 38, no. 1, 2022. doi:10.1016/j.celrep.2021.110183.
- [85] Wira, Charles R et al., «The role of sex hormones in immune protection of the female reproductive tract,» *Nature reviews. Immunology*, vol. 15, no. 4, pp. 217-30, 2015. doi:10.1038/nri3819.

- [86] Kalo-Klein, A, and S S Witkin, «Candida albicans: cellular immune system interactions during different stages of the menstrual cycle,» *American journal of obstetrics and gynecology*, vol. 161, no. 5, pp. 1132-6, 1989. doi:10.1016/0002-9378(89)90649-2.
- [87] Spinillo, A et al., «The relationship of bacterial vaginosis, Candida and Trichomonas infection to symptomatic vaginitis in postmenopausal women attending a vaginitis clinic,» *Maturitas*, vol. 27, no. 3, pp. 253-60, 1997. doi:10.1016/s0378-5122(97)00038-8.
- [88] He, Yufei et al., «Effects of oestrogen on vulvovaginal candidosis,» *Mycoses*, vol. 65, no. 1, pp. 4-12, 2022. doi:10.1111/myc.13385.
- [89] White, S, and B Larsen, «Candida albicans morphogenesis is influenced by estrogen,» *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, vol. 53, no. 9, pp. 744-9, 19997. doi:10.1007/s000180050094.
- [90] Buckman, J, and S M Miller, «Binding and reactivity of Candida albicans estrogen binding protein with steroid and other substrates,» *Biochemistry*, vol. 37, no. 40, pp. 14326-36, 1998. doi:10.1021/bi981106y.
- [91] De Deken, Xavier, and Martine Raymond, «Constitutive activation of the PDR16 promoter in a Candida albicans azole-resistant clinical isolate overexpressing CDR1 and CDR2,» *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 48, no. 7, pp. 2700-3, 2004. doi:10.1128/AAC.48.7.2700-2703.2004.
- [92] Luan, Ting et al., «The Role of 17 β -Estrogen in Candida albicans Adhesion on Human Vaginal Epithelial Cells via FAK Phosphorylation,» *Mycopathologia*, vol. 185, no. 3, pp. 425-438, 2020. doi:10.1007/s11046-020-00440-1.
- [93] Yano, Junko et al., «Vaginal Heparan Sulfate Linked to Neutrophil Dysfunction in the Acute Inflammatory Response Associated with Experimental Vulvovaginal Candidiasis,» *mBio*, vol. 8, no. 2 e00211-17, 14 Mar. 2017. doi:10.1128/mBio.00211-17.
- [94] Lasarte, Sandra et al., «Sex Hormones Coordinate Neutrophil Immunity in the Vagina by Controlling Chemokine Gradients,» *The Journal of infectious diseases*, vol. 213, no. 3, pp. 476-84, 2016. doi:10.1093/infdis/jiv402.
- [95] Richardson, Malcolm, and Riina Rautemaa, «How the host fights against Candida infections,» *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, vol. 14, no. 11, pp. 4363-75, 1 Jan. 2009. doi:10.2741/3533.
- [96] Grigoriou, Odysseas et al., «Prevalence of clinical vaginal candidiasis in a university hospital and possible risk factors,» *European journal of obstetrics, gynecology, and*

reproductive biology, vol. 126, no. 1, pp. 121-5, 2006. doi:10.1016/j.ejogrb.2005.09.015.

- [97] Witkin, S S et al., «Vaginal eosinophils and IgE antibodies to *Candida albicans* in women with recurrent vaginitis,» *Journal of medical and veterinary mycology : bi-monthly publication of the International Society for Human and Animal Mycology*, vol. 27, no. 1, pp. 57-8, 1989.
- [98] Fidel, P L Jr et al., «Vaginal-associated immunity in women with recurrent vulvovaginal candidiasis: evidence for vaginal Th1-type responses following intravaginal challenge with *Candida* antigen,» *The Journal of infectious diseases*, vol. 176, no. 3, pp. 728-39, 1997. doi:10.1086/514097.
- [99] Mostad, S B et al., «Hormonal contraception, vitamin A deficiency, and other risk factors for shedding of HIV-1 infected cells from the cervix and vagina,» *Lancet (London, England)*, vol. 350, pp. 922-7, 1997. doi:10.1016/S0140-6736(97)04240-2.
- [100] Ferrer, J., «Vaginal candidosis: epidemiological and etiological factors,» *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*, vol. 71 Suppl 1 S21-7, 2000. doi:10.1016/s0020-7292(00)00350-7.
- [101] Duerr, Ann et al., «Incident and persistent vulvovaginal candidiasis among human immunodeficiency virus-infected women: Risk factors and severity,» *Obstetrics and gynecology*, vol. 101, no. 3, pp. 548-56, 2003. doi:10.1016/s0029-7844(02)02729-1.
- [102] Barnes, Peter J, «Glucocorticosteroids: current and future directions,» *British journal of pharmacology*, vol. 163, no. 1, pp. 29-43, 2011. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.01199.x.
- [103] Fukushima, Chizu et al., «Oral candidiasis associated with inhaled corticosteroid use: comparison of fluticasone and beclomethasone,» *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*, vol. 90, no. 6, pp. 646-51, 2003. doi:10.1016/S1081-1206(10)61870-4.
- [104] Hostetter, M K, «Handicaps to host defense. Effects of hyperglycemia on C3 and *Candida albicans*,» *Diabetes*, vol. 39, no. 3, pp. 271-5, 1990. doi:10.2337/diab.39.3.271.
- [105] Goswami, Deepti et al., «Pattern of *Candida* species isolated from patients with diabetes mellitus and vulvovaginal candidiasis and their response to single dose oral fluconazole therapy,» *The Journal of infection*, vol. 52, no. 2, pp. 111-7, 2006. doi:10.1016/j.jinf.2005.03.005.

- [106] Goswami, R et al., «Species-specific prevalence of vaginal candidiasis among patients with diabetes mellitus and its relation to their glycaemic status,» *The Journal of infection*, vol. 41, no. 2, pp. 162-6, 2000. doi:10.1053/jinf.2000.0723.
- [107] Wilson, R M, and W G Reeves, «Neutrophil phagocytosis and killing in insulin-dependent diabetes,» *Clinical and experimental immunology*, vol. 63, no. 2, pp. 478-84, 1986.
- [108] de Leon, Ella M et al., «Prevalence and risk factors for vaginal Candida colonization in women with type 1 and type 2 diabetes,» *BMC infectious diseases*, vol. 2, no. 1, 2002. doi:10.1186/1471-2334-2-1.
- [109] Ray, Debarti et al., «Prevalence of Candida glabrata and its response to boric acid vaginal suppositories in comparison with oral fluconazole in patients with diabetes and vulvovaginal candidiasis,» *Diabetes care*, vol. 30, no. 2, pp. 312-7, 2007. doi:10.2337/dc06-1469.
- [110] Lema M., «Recurrent vulvo-vaginal candidiasis: Diagnostic and management challenges in a developing country context,» *Obstet. Gynecol. Int. J.*, vol 7, no. 5, pp. 1–12, 2017. doi: 10.15406/ogij.2017.07.00260.
- [111] Guzel, Ahmet Bariş et al., «Evaluation of risk factors in patients with vulvovaginal candidiasis and the value of chromID Candida agar versus CHROMagar Candida for recovery and presumptive identification of vaginal yeast species,» *Medical mycology*, vol. 49, no. 1, pp. 16-25, 2011. doi:10.3109/13693786.2010.497972.
- [112] Spinillo, A et al., «Effect of antibiotic use on the prevalence of symptomatic vulvovaginal candidiasis,» *American journal of obstetrics and gynecology*, vol. 180, no. 1 Pt 1, pp. 14-7, 1999. doi:10.1016/s0002-9378(99)70141-9.
- [113] Wilton, Lynda et al., «Relative risk of vaginal candidiasis after use of antibiotics compared with antidepressants in women: postmarketing surveillance data in England,» *Drug safety*, vol. 26, no. 8, pp. 589-97, 2003. doi:10.2165/00002018-200326080-00005.
- [114] Pirodda, Marie V et al., «Not thrush again!" Women's experience of post-antibiotic vulvovaginitis,» *The Medical journal of Australia*, vol. 179, no. 1, pp. 43-6, 2003. doi:10.5694/j.1326-5377.2003.tb05418.x.
- [115] Pultz, Nicole J et al., «Effect of parenteral antibiotic administration on establishment of intestinal colonization by Candida glabrata in adult mice,» *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 49, no. 1, pp. 438-40, 2005. doi:10.1128/AAC.49.1.438-440.2005.
- [116] Vitali, Beatrice et al., «Dynamics of vaginal bacterial communities in women developing bacterial vaginosis, candidiasis, or no infection, analyzed by PCR-denaturing gradient

gel electrophoresis and real-time PCR,» *Applied and environmental microbiology*, vol. 73, no. 18, pp. 5731-41, 2007. doi:10.1128/AEM.01251-07.

- [117] Zhou, Xia et al., «Vaginal microbiota of women with frequent vulvovaginal candidiasis,» *Infection and immunity*, vol. 77, no. 9, pp. 4130-5, 2009. doi:10.1128/IAI.00436-09.
- [118] Glover, Douglas D, and Bryan Larsen, «Relationship of fungal vaginitis therapy to prior antibiotic exposure,» *Infectious diseases in obstetrics and gynecology*, vol. 11, no. 3, pp. 157-60, 2003. doi:10.1080/10647440300025514.
- [119] Auger, P, and J Joly, «Microbial flora associated with *Candida albicans* vulvovaginitis,» *Obstetrics and gynecology*, vol. 55, no. 3, pp. 397-401, 1980. doi:10.1097/00006250-198003000-00029.
- [120] Martinez, Rafael C R et al., «Effect of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus reuteri* RC-14 on the ability of *Candida albicans* to infect cells and induce inflammation,» *Microbiology and immunology*, vol. 53, no. 9, pp. 487-95, 2009. doi:10.1111/j.1348-0421.2009.00154.x.
- [121] Ismail, A. M. et al., «The Effect of Use of Vaginal *Lactobacillus Rhamnosus* for Prevention of Recurrence of Vulvovaginal Candidiasis: A Randomized Controlled Trial,» *Thai J Obstet Gynaecol*, vol 25, no. 1, pp. 62-68, 2017. <https://doi.org/10.14456/tjog.2017.10>.
- [122] Santos, Carolina M A et al., «Selection of *Lactobacillus* strains as potential probiotics for vaginitis treatment,» *Microbiology (Reading, England)*, vol. 162, no. 7, pp. 1195-1207, 2017. doi:10.1099/mic.0.000302.
- [123] Khan, Fazlurrahman et al., «Mixed biofilms of pathogenic *Candida*-bacteria: regulation mechanisms and treatment strategies,» *Critical reviews in microbiology*, vol. 47, no. 6, pp. 699-727, 2021. doi:10.1080/1040841X.2021.1921696.
- [124] Qi, Wenhui et al., «Recent Advances in Presentation, Diagnosis and Treatment for Mixed Vaginitis,» *Frontiers in cellular and infection microbiology*, vol. 11 759795, 2 Nov. 2021. doi:10.3389/fcimb.2021.759795.
- [125] Lohse, Matthew B et al., «Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms,» *Nature reviews. Microbiology*, vol. 16, no.1, pp. 19-31, 2018. doi:10.1038/nrmicro.2017.107.
- [126] Schlecht, Lisa Marie et al., «Systemic *Staphylococcus aureus* infection mediated by *Candida albicans* hyphal invasion of mucosal tissue,» *Microbiology (Reading, England)*, vol. 161,Pt 1, pp. 168-181, 2015. doi:10.1099/mic.0.083485-0.

- [127] Fox, Emily P et al., «Anaerobic bacteria grow within *Candida albicans* biofilms and induce biofilm formation in suspension cultures,» *Current biology : CB*, vol. 24, no. 20, pp. 2411-6, 2014. doi:10.1016/j.cub.2014.08.057.
- [128] Harriott, Melphine M, and Mairi C Noverr, «Ability of *Candida albicans* mutants to induce *Staphylococcus aureus* vancomycin resistance during polymicrobial biofilm formation,» *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 54, no. 9, pp. 3746-55, 2010. doi:10.1128/AAC.00573-10.
- [129] Morales, Diana K et al., «ontrol of *Candida albicans* metabolism and biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* phenazines,» *mBio*, vol. 4, no. 1 e00526-12, 29 Jan. 2013. doi:10.1128/mBio.00526-12.
- [130] Peters, Brian M, and Mairi C Noverr, «*Candida albicans*-*Staphylococcus aureus* polymicrobial peritonitis modulates host innate immunity,» *Infection and immunity*, vol. 81, no. 6, pp. 2178-89, 2013. doi:10.1128/IAI.00265-13.
- [131] Yu, Xiao-Yu et al., «*Streptococcus agalactiae* Inhibits *Candida albicans* Hyphal Development and Diminishes Host Vaginal Mucosal TH17 Response,» *Frontiers in microbiology*, vol. 9, p. 198, 23 Feb. 2018. doi:10.3389/fmicb.2018.00198.
- [132] Roux, Damien et al., «*Candida albicans* impairs macrophage function and facilitates *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in rat.,» *Critical care medicine*, vol. 37, no. 3, pp. 1062-7, 2009. doi:10.1097/CCM.0b013e31819629d2.
- [133] Bauters, Tiene G m et al., «Prevalence of vulvovaginal candidiasis and susceptibility to fluconazole in women,» *American journal of obstetrics and gynecology*, vol. 187, no. 3, pp. 569-74, 2002. doi:10.1067/mob.2002.125897.
- [134] Reed, B D., «Risk factors for *Candida* vulvovaginitis,» *Obstetrical & gynecological survey*, vol. 47, no. 8, pp. 551-60, 1992.
- [135] Cetin, Meryem et al., «Distribution of *Candida* species in women with vulvovaginal symptoms and their association with different ages and contraceptive methods,» *Scandinavian journal of infectious diseases*, vol. 39, no. 6-7, pp. 584-8, 2007. doi:10.1080/0036554060114849.
- [136] Geiger, A M, and B Foxman, «Risk factors for vulvovaginal candidiasis: a case-control study among university students,» *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, vol. 7, no. 2, pp. 182-7, 1996. doi:10.1097/00001648-199603000-00013.
- [137] Amouri, I et al., «Epidemiological survey of vulvovaginal candidosis in Sfax, Tunisia,» *Mycoses*, vol. 54, no. 5, pp. 499-505, 2011. doi:10.1111/j.1439-0507.2010.01965.x.

- [138] Eckert, L O et al., «Vulvovaginal candidiasis: clinical manifestations, risk factors, management algorithm,» *Obstetrics and gynecology*, vol. 92, no. 5, pp. 757-65, 1998. doi:10.1016/s0029-7844(98)00264-6.
- [139] McGroarty, J A et al., «The spermicidal compound nonoxynol-9 increases adhesion of *Candida* species to human epithelial cells in vitro,» *Infection and immunity*, vol. 58, no. 6, pp. 2005-7, 1990. doi:10.1128/iai.58.6.2005-2007.1990.
- [140] Golshan Iranpour, Farhad et al., «Thymoquinone as a natural spermostatic substance in reproductive medicine: An experimental study,» *International journal of reproductive biomedicine*, vol. 15, no 10, pp. 641-648, 2017.
- [141] Watts, D H et al., «The effects of three nonoxynol-9 preparations on vaginal flora and epithelium,» *The Journal of infectious diseases*, vol. 180, no. 2, pp. 426-37, 1999. doi:10.1086/314881.
- [142] Roddy, R E et al., «A dosing study of nonoxynol-9 and genital irritation,» *International journal of STD & AIDS*, vol. 4, no. 3, pp. 165-70, 1993. doi:10.1177/095646249300400308.
- [143] Fortney, J A et al., «Intrauterine devices. The optimal long-term contraceptive method?,» *The Journal of reproductive medicine*, vol. 44, no. 3, pp. 269-74, 1999.
- [144] Abasiattai, A M et al., «Profile of intrauterine contraceptive device acceptors at the University of Uyo Teaching Hospital, Uyo, Nigeria,» *Annals of African medicine*, vol. 7, no. 1, pp. 1-5, 2008. doi:10.4103/1596-3519.55692.
- [145] Lal, Priyanka et al., «Biofilm formation by *Candida albicans* isolated from intrauterine devices,» *Indian journal of microbiology*, vol. 48, no. 4, pp. 438-44, 2008. doi:10.1007/s12088-008-0054-x.
- [146] Spinillo, A et al., «The impact of oral contraception on vulvovaginal candidiasis,» *Contraception*, vol. 51, no. 5, pp. 293-7, 1995. doi:10.1016/0010-7824(95)00079-p.
- [147] Auler, Marcos E et al., «Biofilm formation on intrauterine devices in patients with recurrent vulvovaginal candidiasis,» *Medical mycology*, vol. 48, no. 1, pp. 211-6, 2010. doi:10.3109/13693780902856626.
- [148] Demirezen, S et al., «The association of *Candida* infection with intrauterine contraceptive device,» *Central European journal of public health*, vol. 13, no. 1, pp. 32-4, 2005.
- [149] Schmid, J et al., «Genetic similarity of *Candida albicans* strains from vaginitis patients and their partners,» *Journal of clinical microbiology*, vol. 31, no. 1, pp. 39-46, 1993. doi:10.1128/jcm.31.1.39-46.1993.

- [150] Reed, B D et al., «Sexual behaviors and other risk factors for Candida vulvovaginitis.,» *Journal of women's health & gender-based medicine*, vol. 9, no. 6, pp. 645-55, 2000. doi:10.1089/15246090050118170.
- [151] Holanda, Antônio Arildo Reginaldo de, et al., «Candidíase Vulvovaginal: Sintomatologia, Fatores de Risco e Colonização Anal Concomitante,» *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia, Federação Brasileira Das Sociedades de Ginecologia e Obstetrícia*, 1, vol. 1, 2007. www.scielo.br/j/rbgo/a/fpN9V6TFhPcqKxLZ8TS4bVL/?lang=pt#.
- [152] Corsello, Salvatore et al., «An epidemiological survey of vulvovaginal candidiasis in Italy,» *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*, vol. 110, no. 1, pp. 66-72, 2003. doi:10.1016/s0301-2115(03)00096-4.
- [153] Ravel, Jacques et al., «Vaginal microbiome of reproductive-age women,» *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 108, Suppl 1, pp. 4680-7, 2011. doi:10.1073/pnas.1002611107.
- [154] Fettweis, Jennifer M et al., «Differences in vaginal microbiome in African American women versus women of European ancestry,» *Microbiology (Reading, England)*, vol. 160, Pt 10, pp. 2272-2282, 2014. doi:10.1099/mic.0.081034-0.
- [155] Chaim, W et al., «Association of recurrent vaginal candidiasis and secretory ABO and Lewis phenotype,» *The Journal of infectious diseases*, vol. 176, no. 3, pp. 828-30, 1997. doi:10.1086/517314.
- [156] D. Rosentul et al., «Polymorphism in innate immunity genes and susceptibility to recurrent vulvovaginal candidiasis,» *Journal of medical mycology*, vol. 19, no. 3, pp. 191-196, 2009. doi : 10.1016/j.mycmed.2009.07.004.
- [157] Gow, Neil A R et al., «Immune recognition of Candida albicans beta-glucan by dectin-1,» *The Journal of infectious diseases*, vol. 196, no. 10, pp. 1565-71, 2007. doi:10.1086/523110.
- [158] Ferwerda, Bart et al., «Human dectin-1 deficiency and mucocutaneous fungal infections,» *The New England journal of medicine*, vol. 361, no. 18, pp. 1760-7, 2009. doi:10.1056/NEJMoa0901053.
- [159] Neth, O et al., «Mannose-binding lectin binds to a range of clinically relevant microorganisms and promotes complement deposition,» *Infection and immunity*, vol. 68, no. 2, pp. 688-93, 2000. doi:10.1128/IAI.68.2.688-693.2000.
- [160] Babula, Oksana et al., «Relation between recurrent vulvovaginal candidiasis, vaginal concentrations of mannose-binding lectin, and a mannose-binding lectin gene polymorphism in Latvian women,» *Clinical infectious diseases : an official publication*

of the Infectious Diseases Society of America, vol. 37, no. 5, pp. 733-7, 2003. doi:10.1086/377234.

- [161] Giraldo, Paulo C et al., «Mannose-binding lectin gene polymorphism, vulvovaginal candidiasis, and bacterial vaginosis,» *Obstetrics and gynecology*, vol. 109, no. 5, pp. 1123-8, 2007. doi:10.1097/01.AOG.0000260386.17555.a5.
- [162] Cenci, E et al., «Interleukin-4 and interleukin-10 inhibit nitric oxide-dependent macrophage killing of *Candida albicans*,» *European journal of immunology*, vol. 23, no. 5, pp. 1034-8, 1993. doi:10.1002/eji.1830230508.
- [163] Lev-Sagie, Ahinoam et al., «Polymorphism in a gene coding for the inflammasome component NALP3 and recurrent vulvovaginal candidiasis in women with vulvar vestibulitis syndrome,» *American journal of obstetrics and gynecology*, vol. 200, no. 3, p. 303, e1-6, 2009. doi:10.1016/j.ajog.2008.10.039.
- [164] Beghini, J et al., «Differential expression of lactic acid isomers, extracellular matrix metalloproteinase inducer, and matrix metalloproteinase-8 in vaginal fluid from women with vaginal disorders,» *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology*, vol. 122, no. 12, pp. 1580-5, 2015. doi:10.1111/1471-0528.13072.
- [165] I-Majid, Ahmed et al., «Matrix Metalloproteinase-8 as an Inflammatory and Prevention Biomarker in Periodontal and Peri-Implant Diseases,» *International journal of dentistry*, vol. 2018 7891323, 16 Sep. 2018. doi:10.1155/2018/7891323.
- [166] Anderson, Matthew R et al., «Evaluation of vaginal complaints,» *JAMA*, vol. 291, no. 11, pp. 1368-79, 2004. doi:10.1001/jama.291.11.1368.
- [167] Clare Boerma and Lynne Wray, «Vaginal discharge – misconceptions, causes and treatments,» *Medicine Today*, vol 21, no. 2, pp. 39-44, 2020.
- [168] Aballéa, Samuel et al., «Subjective health status and health-related quality of life among women with Recurrent Vulvovaginal Candidosis (RVVC) in Europe and the USA,» *Health and quality of life outcomes*, vol. 11, p. 169, 11 Oct. 2013. doi:10.1186/1477-7525-11-169.
- [169] Blostein, Freida et al., «Recurrent vulvovaginal candidiasis,» *Annals of epidemiology*, vol. 27, no. 9, pp. 575-582, 2017. doi:10.1016/j.annepidem.2017.08.010.
- [170] Lowe, Nancy K et al., «Accuracy of the clinical diagnosis of vaginitis compared with a DNA probe laboratory standard,» *Obstetrics and gynecology*, vol. 113, no. 1, pp. 89-95, 2009. doi:10.1097/AOG.0b013e3181909f63.

- [171] Ferris, D G et al., «Women's use of over-the-counter antifungal medications for gynecologic symptoms,» *The Journal of family practice*, vol. 42, no. 6, pp. 595-600, 1996.
- [172] Neal, Chemen M, and Mark G Martens, «Clinical challenges in diagnosis and treatment of recurrent vulvovaginal candidiasis,» *SAGE open medicine*, vol. 8, no. 10, 8 Sep. 2022. doi:10.1177/20503121221115201.
- [173] Mylonas, Ioannis, and Florian Bergauer, «Diagnosis of vaginal discharge by wet mount microscopy: a simple and underrated method.,» *Obstetrical & gynecological survey*, vol. 66, no. 6, pp. 359-68, 2011. doi:10.1097/OGX.0b013e31822bdf31.
- [174] Sobel, Jack D., «Recurrent vulvovaginal candidiasis,» *American journal of obstetrics and gynecology*, vol. 214, no. 1, pp. 15-21, 2016. doi:10.1016/j.ajog.2015.06.067.
- [175] Hoffstetter, Susan E et al., «Self-reported yeast symptoms compared with clinical wet mount analysis and vaginal yeast culture in a specialty clinic setting,» *The Journal of reproductive medicine*, vol. 53, no. 6, pp. 402-6, 2008.
- [176] Jill M Krapf, «Vulvovaginitis Workup,» *Medscape*, 2022.
- [177] CHROMagar, «CHROMagar™ Candida,» <https://www.chromagar.com/en/product/chromagar-candida/>.
- [178] Gaydos, Charlotte A et al., «Clinical Validation of a Test for the Diagnosis of Vaginitis,» *Obstetrics and gynecology*, vol. 130, no. 1, pp. 181-189, 2017. doi:10.1097/AOG.0000000000002090.
- [179] Mårdh, Per-Anders et al., «Detection of candida by polymerase chain reaction vs microscopy and culture in women diagnosed as recurrent vulvovaginal cases,» *International journal of STD & AIDS*, vol. 14, no. 11, pp. 753-6, 2003. doi:10.1258/09564620360719796.
- [180] Mahmoudi Rad, Mahnaz et al., «Identification of Candida species associated with vulvovaginal candidiasis by multiplex PCR,» *Infectious diseases in obstetrics and gynecology*, vol. 2012 872169, 2012. doi:10.1155/2012/872169.
- [181] Dermendzhiev, T et al., «Quantitative system for diagnosis of vulvovaginal candidiasis,» *Journal de mycologie medicale*, vol. 32, no. 4, 2022. doi:10.1016/j.mycmed.2022.101302.
- [182] Bernstein, Jonathan A, and Luqman Seidu, «Chronic vulvovaginal Candida hypersensitivity: An underrecognized and undertreated disorder by allergists,» *Allergy & rhinology (Providence, R.I.)*, vol. 6, no. 1, pp. 44-9, 2015. doi:10.2500/ar.2015.6.0113.

- [183] Mulhem, Elie et al., «Performance of the Affirm VP-III using residual vaginal discharge collected from the speculum to characterize vaginitis in symptomatic women,» *Journal of lower genital tract disease*, vol. 18, no. 4, pp. 344-6, 2014. doi:10.1097/LGT.000000000000025.
- [184] Bradford, L Latéy et al., «Vaginal *Candida* spp. genomes from women with vulvovaginal candidiasis,» *Pathogens and disease*, vol. 75, no. 6, 2017. doi:10.1093/femspd/ftx061.
- [185] Lee, Yunjin et al., «Antifungal Drug Resistance: Molecular Mechanisms in *Candida albicans* and Beyond,» *Chemical reviews*, vol. 121, no. 6, pp. 3390-3411, 2021. doi:10.1021/acs.chemrev.0c00199.
- [186] Ostrosky-Zeichner, Luis et al., «An insight into the antifungal pipeline: selected new molecules and beyond,» *Nature reviews Drug discovery*, vol. 9, no. 9, pp. 719-27, 2010. doi:10.1038/nrd3074.
- [187] Anderson, Thomas M et al., «Amphotericin forms an extramembranous and fungicidal sterol sponge,» *Nature chemical biology*, vol. 10, no. 5 , pp. 400-6, 2014. doi:10.1038/nchembio.1496.
- [188] Robbins, Nicole et al., «Antifungal Drugs: The Current Armamentarium and Development of New Agents,» *Microbiology spectrum*, vol. 4-5, no. 1, 2016. doi:10.1128/microbiolspec.FUNK-0002-2016.
- [189] Vincent, Benjamin Matteson et al., «Fitness trade-offs restrict the evolution of resistance to amphotericin B.,» *PLoS biology*, vol. 11, no. 10, e1001692, 2013. doi:10.1371/journal.pbio.1001692.
- [190] Ng, Agatha W K et al., «Development of liposomal polyene antibiotics: an historical perspective,» *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques*, vol. 6, no. 1, pp. 67-83, 2003.
- [191] Park, H et al., «Plasma membrane cholesterol is a key molecule in shear stress-dependent activation of extracellular signal-regulated kinase,» *The Journal of biological chemistry*, vol. 273, no. 48, pp. 32304-11, 1998. doi:10.1074/jbc.273.48.32304.
- [192] Varshney, Pallavi et al., «Lipid rafts in immune signalling: current progress and future perspective,» *Immunology*, vol. 149, no. 1, pp. 13-24, 2016. doi:10.1111/imm.12617.
- [193] Zhang, Xu et al., «Nystatin enhances the immune response against *Candida albicans* and protects the ultrastructure of the vaginal epithelium in a rat model of vulvovaginal candidiasis,» *BMC microbiology*, vol. 18, no 1, p. 166. 25 Oct. 2018. doi:10.1186/s12866-018-1316-3.

- [194] Sigera, L Shamithra M, and David W Denning, «Flucytosine and its clinical usage,» *Therapeutic advances in infectious disease*, vol. 10 20499361231161387, 5 Apr. 2023. doi:10.1177/20499361231161387.
- [195] Perfect, John R, «The antifungal pipeline: a reality check,» *Nature reviews Drug discovery*, vol. 16, no. 9, pp. 603-616, 2017. doi:10.1038/nrd.2017.46.
- [196] Allen, David et al., «Azole antifungals: 35 years of invasive fungal infection management,» *Expert review of anti-infective therapy*, vol. 13, no. 6, pp. 787-98, 2015. doi:10.1586/14787210.2015.1032939.
- [197] Roemer, Terry, and Damian J Krysan, «Antifungal drug development: challenges, unmet clinical needs, and new approaches,» *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, vol. 4, no. 5, 1 May. 2014. doi:10.1101/cshperspect.a019703.
- [198] Letscher-Bru, Valérie, and Raoul Herbrecht, «Caspofungin: the first representative of a new antifungal class,» *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, vol. 51, no. 3, pp. 513-21, 2003. doi:10.1093/jac/dkg117.
- [199] Cornely, O A et al., «ESCMID* guideline for the diagnosis and management of Candida diseases 2012: non-neutropenic adult patients,» *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, vol. 18, Suppl 7, pp. 19-37, 2012. doi:10.1111/1469-0691.12039.
- [200] Di Mambro, Tomas et al., «The Yin and Yang of Current Antifungal Therapeutic Strategies: How Can We Harness Our Natural Defenses?,» *Frontiers in pharmacology*, vol. 10, no. 80, 5 Feb. 2019. doi:10.3389/fphar.2019.00080.
- [201] Wilson, Candy, «Recurrent vulvovaginitis candidiasis; an overview of traditional and alternative therapies,» *Advance for nurse practitioners*, vol. 13, no. 5, pp. 24-9, quiz 30, 2005.
- [202] Niewerth, Markus et al., «Ciclopirox olamine treatment affects the expression pattern of Candida albicans genes encoding virulence factors, iron metabolism proteins, and drug resistance factors,» *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 47, no. 6, pp. 1805-17, 2003. doi:10.1128/AAC.47.6.1805-1817.2003.
- [203] Workowski A. Kimberly et al., «Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, 2015,» *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)*, vol. 64(RR3), pp. 1-137, 2015.
- [204] Pitsouni, Eleni et al., «Itraconazole vs fluconazole for the treatment of uncomplicated acute vaginal and vulvovaginal candidiasis in nonpregnant women: a metaanalysis of randomized controlled trials,» *American journal of obstetrics and gynecology*, vol. 198, no. 2, pp. 153-60, 2008. doi:10.1016/j.ajog.2007.10.786.

- [205] Mendling, Werner et al., «A clinical multicenter study comparing efficacy and tolerability of topical combination therapy with clotrimazole (Canesten, two formats) with oral single dose fluconazole (Diflucan) in vulvovaginal mycoses,» *Mycoses*, vol. 47, no. 3-4, pp. 136-42, 2004. doi:10.1111/j.1439-0507.2004.00970.x.
- [206] Nurbhai, M et al., «Oral versus intra-vaginal imidazole and triazole anti-fungal treatment of uncomplicated vulvovaginal candidiasis (thrush),» *The Cochrane database of systematic reviews*, vol. 4, no. CD002845, 17 Oct. 2007. doi:10.1002/14651858.CD002845.pub2.
- [207] Cohen, L, «Is more than one application of an antifungal necessary in the treatment of acute vaginal candidiasis?,» *American journal of obstetrics and gynecology*, vol. 152, no. 7 Pt 2, pp. 961-4, 1985. doi:10.1016/s0002-9378(85)80011-9.
- [208] Sobel, J D, and W Chaim, «Treatment of *Torulopsis glabrata* vaginitis: retrospective review of boric acid therapy,» *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, vol. 24, no. 4, pp. 649-52, 1997. doi:10.1093/clind/24.4.649.
- [209] European Chemicals Agency-ECHA, «Boric acid toxicity to reproduction».
- [210] Sobel, Jack D et al., «Treatment of vaginitis caused by *Candida glabrata*: use of topical boric acid and flucytosine,» *American journal of obstetrics and gynecology*, vol. 189, no. 5, pp. 1297-300, 2003. doi:10.1067/s0002-9378(03)00726-9.
- [211] Moran, G P et al., «Identification and expression of multidrug transporters responsible for fluconazole resistance in *Candida dubliniensis*,» *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 42, no. 7, pp. 1819-30, 1998. doi:10.1128/AAC.42.7.1819.
- [212] das Neves, José et al., «Local treatment of vulvovaginal candidosis : general and practical considerations,» *Drugs*, vol. 68, no. 13, pp. 1787-802, 2008. doi:10.2165/00003495-200868130-00002.
- [213] Govindarajan, Ameish, et al., «Fluconazole,» *StatPearls*, 23 May 2023.
- [214] Mendling, Werner et al., «Use of locally delivered dequalinium chloride in the treatment of vaginal infections: a review,» *Archives of gynecology and obstetrics*, vol. 293, no. 3, pp. 469-84, 2016. doi:10.1007/s00404-015-3914-8.
- [215] Friese, K et al., «Topical antiseptics as an alternative in the treatment of acute vulvovaginal candidosis,» *Archives of gynecology and obstetrics*, vol. 268, no. 3, pp. 194-7, 2003. doi:10.1007/s00404-002-0368-6.

- [216] Bisschop, M P et al., «Co-treatment of the male partner in vaginal candidosis: a double-blind randomized control study,» *British journal of obstetrics and gynaecology*, vol. 93, no. 1, pp. 79-81, 1986. doi:10.1111/j.1471-0528.1986.tb07818.x.
- [217] G. Donders et al., «Management of recurrent vulvovaginal candidosis: Narrative review of the literature and European expert panel opinion,» *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, vol. 12, Sep. 2022. doi: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.934353>.
- [218] Sobel, Jack D et al., «Maintenance fluconazole therapy for recurrent vulvovaginal candidiasis,» *The New England journal of medicine*, vol. 351, no. 9, pp. 876-83, 2004. doi:10.1056/NEJMoa033114.
- [219] Kaplan, Yusuf Cem et al., «Fluconazole exposure during pregnancy,» *Canadian family physician Medecin de famille canadien*, vol. 61, no. 8, pp. 685-6, 2015.
- [220] Cakiroglu, Y et al., «Does removal of CU-IUD in patients with biofilm forming candida really maintain regression of clinical symptoms?,» *Journal of obstetrics and gynaecology : the journal of the Institute of Obstetrics and Gynaecology*, vol. 35, no. 6, pp. 600-3, 2015. doi:10.3109/01443615.2014.986442.
- [221] Chokoeva, A et al., «Investigation on antifungal susceptibility of candida yeasts in pregnant patients with confirmed VVC and their newborn,» *Akusherstvo i ginekologija*, vol. 55, no. 4, pp. 20-29, 2016.
- [222] Mølgaard-Nielsen, Ditte et al., «Association Between Use of Oral Fluconazole During Pregnancy and Risk of Spontaneous Abortion and Stillbirth,» *JAMA*, vol. 315, no. 1, pp. 58-67, 2016. doi:10.1001/jama.2015.17844.
- [223] Alsaad, Abdulaziz M S et al., «Exposure to fluconazole and risk of congenital malformations in the offspring: A systematic review and meta-analysis,» *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, vol. 52, pp. 78-82, 2015. doi:10.1016/j.reprotox.2015.02.009.
- [224] Zhu, Yanmin et al., «Oral fluconazole use in the first trimester and risk of congenital malformations: population based cohort study,» *BMJ (Clinical research ed.)*, vol. 369, no. m1494. 20 May. 2020. doi:10.1136/bmj.m1494.
- [225] Akutsu A, Otsubo Y, Suzumura H, et al, «Congenital cutaneous candidiasis in one infant among a twin sibling pair,» *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition*, vol. 107, no. 6, p. 637, 2022. doi:10.1136/archdischild-2021-322107.
- [226] Mack, David R, «Probiotics-mixed messages,» *Canadian family physician Medecin de famille canadien*, vol. 51, no. 11, pp 1455-7, 1462-4, 2005.

- [227] Mårdh, Per-Anders et al., «Colonisation of extragenital sites by *Candida* in women with recurrent vulvovaginal candidosis,» *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology*, vol. 110, no. 10, pp. 934-7, 2003.
- [228] Russo, Rosario et al., «Randomised clinical trial in women with Recurrent Vulvovaginal Candidiasis: Efficacy of probiotics and lactoferrin as maintenance treatment,» *Mycoses*, vol. 62, no. 4, pp. 328-335, 2019. doi:10.1111/myc.12883.
- [229] Kosgey, Janet Cheruiyot et al. , «Probiotics as antifungal agents: Experimental confirmation and future prospects,» *Journal of microbiological methods* , vol. 162 (2019): 28-37. doi:10.1016/j.mimet.2019.05.001.
- [230] Mailänder-Sánchez, Daniela et al., «Potential role of probiotic bacteria in the treatment and prevention of localised candidosis,» *Mycoses*, vol. 55, no. 1, pp. 17-26, 2012. doi:10.1111/j.1439-0507.2010.01967.x.
- [231] Okkers, D J et al., «Characterization of pentocin TV35b, a bacteriocin-like peptide isolated from *Lactobacillus pentosus* with a fungistatic effect on *Candida albicans*,» *Journal of applied microbiology*, vol. 87, no. 5, pp. 726-34, 1999. doi:10.1046/j.1365-2672.1999.00918.x.
- [232] Wang, Shuai et al., «Antimicrobial Compounds Produced by Vaginal *Lactobacillus crispatus* Are Able to Strongly Inhibit *Candida albicans* Growth, Hyphal Formation and Regulate Virulence-related Gene Expressions,» *Frontiers in microbiology*, vol. 8, p. 564. 4 Apr. 2017. doi:10.3389/fmicb.2017.00564.
- [233] Martinez, R C R et al., «Improved treatment of vulvovaginal candidiasis with fluconazole plus probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus reuteri* RC-14,» *Letters in applied microbiology*, vol. 48, no. 3, pp. 269-74, 2009. doi:10.1111/j.1472-765X.2008.02477.x.
- [234] Sun, Zhongwen et al., «Vulvovaginal candidiasis and vaginal microflora interaction: Microflora changes and probiotic therapy,» *Frontiers in cellular and infection microbiology*, vol. 13 1123026. 3 Feb. 2023, doi:10.3389/fcimb.2023.1123026.
- [235] Han, Yue, and Qing-Ling Ren, «Does probiotics work for bacterial vaginosis and vulvovaginal candidiasis,» *Current opinion in pharmacology*, vol. 61, pp. 83-90, 2021. doi:10.1016/j.coph.2021.09.004.
- [236] Gamal, Ahmed et al., «Ibrexafungerp, a Novel Oral Triterpenoid Antifungal in Development: Overview of Antifungal Activity Against *Candida glabrata*,» *Frontiers in cellular and infection microbiology*, vol. 11 642358, 11 Mar. 2021. doi:10.3389/fcimb.2021.642358.

- [237] Davis, M R et al., «Ibrexafungerp: A novel oral glucan synthase inhibitor,» *Medical mycology*, vol. 58, no. 5, pp. 579-592, 2020. doi:10.1093/mmy/myz083.
- [238] Goje, Oluwatosin et al., «Oral Ibrexafungerp for Vulvovaginal Candidiasis Treatment: An Analysis of VANISH 303 and VANISH 306,» *Journal of women's health*, vol. 32, no. 2, pp. 178-186, 2023. doi:10.1089/jwh.2022.0132.
- [239] Brand, Stephen R et al., «A phase 2, randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging study to evaluate the efficacy and safety of orally administered VT-1161 in the treatment of recurrent vulvovaginal candidiasis,» *American journal of obstetrics and gynecology*, vol. 218, no. 6, p. 624.e1-624.e9, 2018. doi:10.1016/j.ajog.2018.03.001.
- [240] Martens, Mark G et al., «Phase 3 study evaluating the safety and efficacy of oteseconazole in the treatment of recurrent vulvovaginal candidiasis and acute vulvovaginal candidiasis infections,» *American journal of obstetrics and gynecology*, vol. 227, no. 6, 2022. doi:10.1016/j.ajog.2022.07.023.
- [241] Rosedale, N, and K Browne., «Hyposensitisation in the management of recurring vaginal candidiasis,» *Annals of allergy*, vol. 43, no. 4, pp. 250-3, 1979.
- [242] Edwards, John E Jr et al., «A Fungal Immunotherapeutic Vaccine (NDV-3A) for Treatment of Recurrent Vulvovaginal Candidiasis-A Phase 2 Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial,» *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, vol. 66, no. 12, pp. 1928-1936, 2018. doi:10.1093/cid/ciy185.
- [243] Alexandrov, Theodore, «MALDI imaging mass spectrometry: statistical data analysis and current computational challenges,» *BMC bioinformatics*, vol. 13, Suppl 16, 2012. doi:10.1186/1471-2105-13-S16-S11.
- [244] Croxatto, Antony et al., «Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology,» *FEMS microbiology reviews*, vol. 36, no. 2, pp. 380-407, 2012. doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x.
- [245] Patel, Robin, «A Moldy Application of MALDI: MALDI-ToF Mass Spectrometry for Fungal Identification,» *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, vol. 5, no. 1, p. 4, 3 Jan. 2019. doi:10.3390/jof5010004.
- [246] The European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), «EUCAST DEFINITIVE DOCUMENT E.DEF 7.3.2.,» 21 August 2023.
- [247] CDC, «Vulvovaginal Candidiasis - STI Treatment Guidelines,» www.cdc.gov, 22 7 2021. [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.cdc.gov/std/treatment-guidelines/candidiasis.htm>. [Πρόσβαση 21 August 2023].

- [248] The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, «Routine and extended internal quality control for MIC determination and agar dilution for yeasts, moulds and dermatophytes as recommended by EUCAST. Version 7.0, 2023,» 6 September 2023.
- [249] The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - EUCAST, «MIC and zone diameter distributions and ECOFFs,» 9 September 2023.
- [250] Papapetropoulou, M et al., «Frequency and epidemiologic associations of different types of vaginitis in symptomatic women in Greece,» *European journal of clinical microbiology*, vol. 5, no. 4, pp. 447-9, 1986. doi:10.1007/BF02075703.
- [251] Koumantakis, E E et al., «Vulvovaginitis during childhood and adolescence,» *Journal of pediatric and adolescent gynecology*, vol. 10, no. 1, pp. 39-43, 1997. doi:10.1016/s1083-3188(97)70043-3.
- [252] Iavazzo, Christos et al, «A retrospective analysis of isolates from patients with vaginitis in a private Greek obstetric/gynecological hospital (2003-2006),» *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*, vol. 14, no. 4 CR228-31, 2008.
- [253] Sianou, Argiri et al., «Prevalence of vaginitis in different age groups among females in Greece,» *Journal of obstetrics and gynaecology : the journal of the Institute of Obstetrics and Gynaecology*, vol. 37, no. 6, pp. 790-794, 2017. doi:10.1080/01443615.2017.1308322.
- [254] Maraki, Sofia et al., «Epidemiology and antifungal susceptibility patterns of Candida isolates from Greek women with vulvovaginal candidiasis,» *Mycoses*, vol. 62, no. 8, pp. 692-697, 2019. doi:10.1111/myc.12946.
- [255] Baka, Stavroula et al., «Microbiological findings in prepubertal and pubertal girls with vulvovaginitis,» *European journal of pediatrics*, vol. 181, no. 12, pp. 4149-4155, 2022. doi:10.1007/s00431-022-04631-4.
- [256] Antonopoulou, Stavroula et al., «Fenticonazole activity measured by the methods of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing and CLSI against 260 Candida vulvovaginitis isolates from two European regions and annotations on the prevalent genotypes,» *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 53, no. 5, pp. 2181-4, 2009. doi:10.1128/AAC.01413-08.
- [257] McKinlay, S M et al., «The normal menopause transition,» *Maturitas*, vol. 14, no. 2, pp. 103-15, 1992. doi:10.1016/0378-5122(92)90003-m.
- [258] Martínez-García, Encarnación et al., «Epidemiological Profile of Patients with Vulvovaginal Candidiasis from a Sexually Transmitted Infection Clinic in Southern

Spain,» *Pathogens (Basel, Switzerland)*, vol. 12, no. 6, p. 756, 24 May. 2023. doi:10.3390/pathogens12060756.

- [259] Intra, Jari et al., «Prevalence and species distribution of microorganisms isolated among non-pregnant women affected by vulvovaginal candidiasis: A retrospective study over a 20 year-period,» *Journal de mycologie medicale*, vol. 32, no. 3, 2022. doi:10.1016/j.mycmed.2022.101278.
- [260] Vijaya, Doddaiah et al., «Changing trends of vulvovaginal candidiasis,» *Journal of laboratory physicians*, vol. 6, no. 1, pp. 28-30, 2014. doi:10.4103/0974-2727.129087.
- [261] Carvalho, Gabriela Corrêa et al., «Prevalence of vulvovaginal candidiasis in Brazil: A systematic review,» *Medical mycology*, vol. 59, no. 10, pp. 946-957, 2021. doi:10.1093/mmy/myab034.
- [262] Foxman, Betsy et al., «Prevalence of recurrent vulvovaginal candidiasis in 5 European countries and the United States: results from an internet panel survey,» *Journal of lower genital tract disease*, vol. 17, no. 3, pp. 340-5, 2013. doi:10.1097/LGT.0b013e318273e8cf.
- [263] Sheary, Belinda, and Linda Dayan., «Recurrent vulvovaginal candidiasis,» *Australian family physician*, vol. 34, no. 3, pp. 147-50, 2005.
- [264] Ringdahl, E N., «Treatment of recurrent vulvovaginal candidiasis,» *American family physician*, vol. 61, no. 11, pp. 3306-12, 3317, 2000.
- [265] Sobel, J D, and R Sobel, «Current treatment options for vulvovaginal candidiasis caused by azole-resistant *Candida* species,» *Expert opinion on pharmacotherapy*, vol. 19, no. 9, pp. 971-977, 2018. doi:10.1080/14656566.2018.147649.
- [266] Mbakwem-Aniebo, Chiaka et al., «Prevalence of *Candida* spp. and age-related disparities amongst women presenting with vaginitis at the Obstetrics and Gynaecology (O&G) Clinic in a Tertiary hospital in Port Harcourt, Nigeria,» *African health sciences*, vol. 20, no. 1, pp. 51-58, 2020. doi:10.4314/ahs.v20i1.9.
- [267] Zeng, Xianling et al., «Risk Factors of Vulvovaginal Candidiasis among Women of Reproductive Age in Xi'an: A Cross-Sectional Study,» *BioMed research international*, vol. 2018, no. 9703754, 7 Jun. 2018. doi:10.1155/2018/9703754.
- [268] R.V. Irene et al., «Assessment of Risk Factors for Developing Vulvovaginal Candidiasis Among Women at Various Age Groups,» *Biosci Biotech Res Asia*, 2023. <http://dx.doi.org/10.13005/bbra/3095>.

- [269] Tarry, W et al., «Candida albicans: the estrogen target for vaginal colonization,» *The Journal of surgical research*, vol. 129, no. 2, pp. 278-82, 2005. doi:10.1016/j.jss.2005.05.019.
- [270] Chee, Wallace Jeng Yang et al., «Vaginal microbiota and the potential of Lactobacillus derivatives in maintaining vaginal health,» *Microbial cell factories*, vol. 19, no. 1, p. 203, 7 Nov. 2020, doi:10.1186/s12934-020-01464-4.
- [271] Amanda Barrell, «Can you get a yeast infection from antibiotics?,» *Medical News Today*, [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/326106>. [Πρόσβαση 3 September 2023].
- [272] Spence, Des., «Candidiasis (vulvovaginal),» *BMJ clinical evidence*, vol. 2010 0815, 5 Jan. 2010.
- [273] Yassin, Mohamed T et al., «In vitro antifungal resistance profile of Candida strains isolated from Saudi women suffering from vulvovaginitis,» *European journal of medical research*, vol. 25, no. 1, 4 Jan. 2020. doi:10.1186/s40001-019-0399-0.
- [274] Vermitsky, John-Paul et al., «Survey of vaginal-flora Candida species isolates from women of different age groups by use of species-specific PCR detection,» *Journal of clinical microbiology*, vol. 46, no. 4, pp. 1501-3, 2008. doi:10.1128/JCM.02485-07.
- [275] Anh, Do Ngoc et al., «Prevalence, species distribution and antifungal susceptibility of Candida albicans causing vaginal discharge among symptomatic non-pregnant women of reproductive age at a tertiary care hospital, Vietnam,» *BMC infectious diseases*, vol. 21, no. 1, p. 523, 3 Jun. 2021. doi:10.1186/s12879-021-06192-7.
- [276] LS Goulart et al., «Species distribution and antifungal susceptibility to vulvovaginal Candida spp. in southern Mato Grosso State, Brazil,» *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, vol. 52, no. 4, Sept 2016. <https://doi.org/10.5935/1676-2444.20160039>.
- [277] Trajano, Débora Thaís Moreira et al., «Species and antifungal susceptibility profile of agents causing vulvovaginal candidiasis in a military population: a cross-sectional study,» *Medical mycology*, vol. 61, no. 3, 2023. doi:10.1093/mmy/myad025.
- [278] Bitew, Adane, and Yeshiwork Abebaw, «Vulvovaginal candidiasis: species distribution of Candida and their antifungal susceptibility pattern,» *BMC women's health*, vol. 18, no. 1, p. 94. 15 Jun. 2018, doi:10.1186/s12905-018-0607-z.
- [279] Hashemi, Seyed Ebrahim et al., «Species distribution and susceptibility profiles of Candida species isolated from vulvovaginal candidiasis, emergence of C. lusitanae,» *Current medical mycology*, vol. 5, no. 4, pp. 26-34, 2019. doi:10.18502/cmm.5.4.2062.

- [280] Jinping Xu et al., «Effect of Antibiotics on Vulvovaginal Candidiasis: a MetroNet study,» *Journal of the American Board of Family Medicine : JABFM*, vol. 21, no. 4, pp. 261-8, 2008. doi:10.3122/jabfm.2008.04.070169.
- [281] Dan, M et al., «Candida colonization of the vagina in elderly residents of a long-term-care hospital,» *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, vol. 25, no. 6, pp. 394-6, 2006. doi:10.1007/s10096-006-0150-y.
- [282] Mahmoudi Rad, M et al., «The epidemiology of Candida species associated with vulvovaginal candidiasis in an Iranian patient population,» *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*, vol. 155, no. 2, pp. 199-203, 2011. doi:10.1016/j.ejogrb.2010.11.022.
- [283] Schuffenecker, I et al., «Evaluation of four commercial systems for identification of medically important yeasts,» *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, vol. 12, no. 4, pp. 255-60, 1993. doi:10.1007/BF01967255.
- [284] Bergan, T et al., «Evaluation of four commercial biochemical test systems for identification of yeasts,» *European journal of clinical microbiology*, vol. 1, no. 4, pp. 217-22, 1982. doi:10.1007/BF02019711.
- [285] Bader, Oliver., «MALDI-TOF-MS-based species identification and typing approaches in medical mycology,» *Proteomics*, vol. 13, no. 5, pp. 788-99, 2013. doi:10.1002/pmic.201200468.
- [286] Santos, Cledir et al., «Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight intact cell mass spectrometry to detect emerging pathogenic Candida species,» *Diagnostic microbiology and infectious disease*, vol. 71, no. 3, pp. 304-8, 2011. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2011.07.002.
- [287] Dovnik, Andraž et al., «Treatment of vulvovaginal candidiasis: a review of the literature,» *Acta dermatovenerologica Alpina, Pannonica, et Adriatica*, vol. 24, no. 1, pp. 5-7, 2015. doi:10.15570/actaapa.2015.2.
- [288] Sojakova, Monika et al., «Fluconazole and itraconazole susceptibility of vaginal yeast isolates from Slovakia,» *Mycopathologia*, vol. 157, no. 2, pp. 163-9, 2004. doi:10.1023/b:myco.0000020594.35357.b0.
- [289] Aslani, Narges et al., «Characterization of Candida species isolated from vulvovaginal candidiasis by MALDI-TOF with in vitro antifungal susceptibility profiles,» *Current medical mycology*, vol. 7, no. 4, pp. 6-11, 2021. doi:10.18502/cmm.7.4.8405.

- [290] Shahid, Zainab, and Jack D Sobel., «Reduced fluconazole susceptibility of *Candida albicans* isolates in women with recurrent vulvovaginal candidiasis: effects of long-term fluconazole therapy,» *Diagnostic microbiology and infectious disease*, vol. 64, no. 3, pp. 354-6, 2009. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2009.03.021.
- [291] Martens G. Mark, «Patient preferences in the treatment of vaginal candidiasis,» *Open Journal of Obstetrics and Gynecology*, vol 8, no. 12, October 2018. doi 10.4236/ojog.2018.812116.
- [292] van Schalkwyk, Julie et al., «Vulvovaginitis: screening for and management of trichomoniasis, vulvovaginal candidiasis, and bacterial vaginosis,» *Journal of obstetrics and gynaecology Canada : JOGC = Journal d'obstetrique et gynecologie du Canada*, JOGC vol. 37, no. 3, pp. 266-274, 2015. doi:10.1016/S1701-2163(15)30316-9.
- [293] Sobel, J D et al., «Fluconazole susceptibility of vaginal isolates obtained from women with complicated *Candida* vaginitis: clinical implications,» *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 47, no. 1, pp. 34-8, 2003. doi:10.1128/AAC.47.1.34-38.2003.
- [294] Spitzer, Mark, and Nathan P Wiederhold, «Reduced Antifungal Susceptibility of Vulvovaginal *Candida* Species at Normal Vaginal pH Levels: Clinical Implications,» *Journal of lower genital tract disease*, vol. 22, no. 2, pp. 152-158, 2018. doi:10.1097/LGT.0000000000000383.
- [295] Ozcan, Sema Keceli et al., «Prevalence, susceptibility profile and proteinase production of yeasts causing vulvovaginitis in Turkish women,» *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, vol. 114, no. 2, pp. 139-45, 2006. doi:10.1111/j.1600-0463.2006.apm_360.x.
- [296] Arastehfar, Amir et al. , «A High Rate of Recurrent Vulvovaginal Candidiasis and Therapeutic Failure of Azole Derivatives Among Iranian Women,» *Frontiers in microbiology* , vol. 12 655069. 28 Apr. 2021, doi:10.3389/fmicb.2021.655069.
- [297] Wang, Meizhu et al., «Virulence and antifungal susceptibility of microsatellite genotypes of *Candida albicans* from superficial and deep locations,» *Yeast (Chichester, England)*, vol. 36, no. 5, pp. 363-373, 2019. doi:10.1002/yea.3397.
- [298] Brandolt, Tchana Martinez et al., «Prevalence of *Candida* spp. in cervical-vaginal samples and the in vitro susceptibility of isolates,» *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, vol. 48, no. 1, pp. 145-150, 2017. doi:10.1016/j.bjm.2016.09.006.
- [299] Nagashima, Masahito et al., «Antifungal susceptibilities of *Candida* species isolated from the patients with vaginal candidiasis,» *Journal of infection and chemotherapy* :

official journal of the Japan Society of Chemotherapy, vol. 22, no. 2, pp. 124-6, 2016. doi:10.1016/j.jiac.2015.08.008.

- [300] Kalkanci, Ayşe et al., «Yeast vaginitis during pregnancy: susceptibility testing of 13 antifungal drugs and boric acid and the detection of four virulence factors,» *Medical mycology*, vol. 50, no. 6, pp. 585-93, 2012. doi:10.3109/13693786.2012.662597.
- [301] Kalaiarasan, Krishnapriya et al., «Fungal Profile of Vulvovaginal Candidiasis in a Tertiary Care Hospital,» *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*, vol. 11, no. 3, 2017. doi:10.7860/JCDR/2017/23578.9475.
- [302] Zarrinfar, Hossein et al., «High incidence of azole resistance among *Candida albicans* and *C. glabrata* isolates in Northeastern Iran,» *Current medical mycology*, vol. 7, no. 3, pp. 18-21, 2021. doi:10.18502/cmm.7.3.7801.
- [303] Zhu, Yuxia et al., «*Candida parapsilosis sensu stricto* and the closely related species *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in vulvovaginal candidiasis,» *Mycopathologia*, vol. 179, no. 1-2, pp. 111-8, 2015. doi:10.1007/s11046-014-9821-x.
- [304] Güzel, Ahmet Barış et al., «Clinical characteristics of Turkish women with *Candida krusei* vaginitis and antifungal susceptibility of the *C. krusei* isolates,» *Infectious diseases in obstetrics and gynecology*, vol. 2013 698736, 2013. doi:10.1155/2013/698736.
- [305] Danby, Claire S et al., «Effect of pH on in vitro susceptibility of *Candida glabrata* and *Candida albicans* to 11 antifungal agents and implications for clinical use,» *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 56, no. 3, pp. 1403-6, 2012. doi:10.1128/AAC.05025-11.
- [306] Gross, Norma T et al., «Species distribution and susceptibility to azoles of vaginal yeasts isolated prostitutes,» *Infectious diseases in obstetrics and gynecology*, vol. 2007 82412, 2007. doi:10.1155/2007/82412.
- [307] Shi, Xiao-Yu et al., «Molecular identification and antifungal susceptibility of 186 *Candida* isolates from vulvovaginal candidiasis in southern China,» *Journal of medical microbiology*, vol. 64, Pt 4, pp. 390-393, 2015. doi:10.1099/jmm.0.000024.
- [308] Choukri, F et al., «In vitro susceptibility profile of 200 recent clinical isolates of *Candida* spp. to topical antifungal treatments of vulvovaginal candidiasis, the imidazoles and nystatin agents,» *Journal de mycologie medicale*, vol. 24, no. 4, pp. 303-7, 2014. doi:10.1016/j.mycmed.2014.05.001.
- [309] Dias, Luciana Basili et al., «Vulvovaginal candidiasis in Mato Grosso, Brazil: pregnancy status, causative species and drugs tests,» *Brazilian journal of microbiology* :

[publication of the Brazilian Society for Microbiology], vol. 42, no. 4, pp. 1300-7, 2011. doi:10.1590/S1517-83822011000400009.

- [310] Carrilo-Muñoz, A J et al., «In-vitro antifungal activity of sertaconazole, bifonazole, ketoconazole, and miconazole against yeasts of the Candida genus,» *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, vol. 37, no. 4, pp. 815-9, 1996. doi:10.1093/jac/37.4.815.
- [311] Nikoomanesh, Fatemeh et al., «Combination of Farnesol with Common Antifungal Drugs: Inhibitory Effect against Candida Species Isolated from Women with RVVC,» *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, vol. 59, no. 4, p. 743, 10 Apr. 2023. doi:10.3390/medicina59040743.
- [312] Lavazzo, Christos et al., «Boric acid for recurrent vulvovaginal candidiasis: the clinical evidence,» *Journal of women's health (2002)*, vol. 20, no. 8, pp. 1245-55, 2011. doi:10.1089/jwh.2010.2708.
- [313] Monroy-Pérez, Eric et al., «High Virulence and Antifungal Resistance in Clinical Strains of Candida albicans,» *The Canadian journal of infectious diseases & medical microbiology = Journal canadien des maladies infectieuses et de la microbiologie medicale*, vol. 2016, 2016. doi:10.1155/2016/5930489.
- [314] Jafarzadeh, Leila et al., «Vulvovaginal candidiasis: An overview of mycological, clinical, and immunological aspects,» *The journal of obstetrics and gynaecology research*, vol. 48, no. 7, pp. 1546-1560, 2022. doi:10.1111/jog.15267.
- [315] Liu, Wei et al., «Impact of pH on the antifungal susceptibility of vaginal Candida albicans,» *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*, vol. 114, no. 3, pp. 278-80, 2011. doi:10.1016/j.ijgo.2011.03.016.
- [316] Marr, K A et al., «The trailing end point phenotype in antifungal susceptibility testing is pH dependent,» *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 43, no. 6, pp. 1383-6, 1999. doi:10.1128/AAC.43.6.1383.
- [317] Schwebke, Jane R, and Renee Desmond, «Natural history of asymptomatic bacterial vaginosis in a high-risk group of women,» *Sexually transmitted diseases*, vol. 34, no. 11, pp. 876-7, 2007. doi:10.1097/OLQ.0b013e318073bd82.
- [318] Abdul-Aziz, Maha et al., «Bacterial vaginosis, vulvovaginal candidiasis and trichomonal vaginitis among reproductive-aged women seeking primary healthcare in Sana'a city, Yemen,» *BMC infectious diseases*, vol. 19, no. 1, p. 879, 22 Oct. 2019. doi:10.1186/s12879-019-4549-3.

[319] Liu, Mu-Biao et al., «Diverse vaginal microbiomes in reproductive-age women with vulvovaginal candidiasis,» *PloS one*, vol. 8, no. 11 e79812, 12 Nov. 2013. doi:10.1371/journal.pone.0079812.

Παραρτήματα

Κατάλογος εικόνων

Εικόνα 1	Εκτιμώμενη συχνότητα εμφάνισης της VVC και της RVVC στη διάρκεια της ζωής μιας γυναίκας
Εικόνα 2	Παγκόσμιος επιπολασμός της RVVC σύμφωνα με τα πλέον πρόσφατα επιδημιολογικά δεδομένα (2013)
Εικόνα 3	Κατανομή των στελεχών <i>C. albicans</i> και non- <i>albicans Candida spp.</i> που απομονώθηκαν από ασθενείς με VVC σε διάφορες χώρες μετά το 2010
Εικόνα 4	Μορφολογία του βιοϋμενίου που σχηματίζει το πρότυπο στέλεχος <i>C. albicans</i> ATCC 10231 μετά από χρόνο επώασης α) 6, β) 24, γ) 36 και δ) 48 ωρών.
Εικόνα 5	Μακροσκοπική και μικροσκοπική παρατήρηση της μορφολογίας των τριών φαινοτύπων [λευκός (W), γκρί (G) και παροδικά γκρί (O)] της <i>C. albicans</i>
Εικόνα 6	Μακροσκοπική και μικροσκοπική παρατήρηση της μορφολογίας <i>Candida spp.</i> σε άγαρ αραβοσίτου με Tween 80
Εικόνα 7	Τα στάδια ανάπτυξης βιοϋμενίων στα <i>Candida spp.</i>
Εικόνα 8	Παράγοντες λοιμογόνου δράσης του κύριου αιτιολογικού παράγοντα της VVC, της <i>C. albicans</i>
Εικόνα 9	Περιβαλλοντικοί και ανοσολογικοί παράγοντες που συμβάλουν στην υπεραντίδραση του ξενιστή στη διάρκεια της VVC
Εικόνα 10	Η RVVC ως μια πολυπαραγοντική διαταραχή
Εικόνα 11	Επίδραση των οιστρογόνων στην παθογένεια της VVC από <i>C. albicans</i>
Εικόνα 12	Έξω γεννητικά όργανα ασθενούς με VVC
Εικόνα 13	Ανίχνευση στοιχείων ζυμομύκητα κατά τη μικροσκοπική παρατήρηση δείγματος κολπικού υγρού
Εικόνα 14	Ανάπτυξη διαφορετικών <i>Candida spp.</i> σε χρωμογόνο θρεπτικό υλικό
Εικόνα 15	Αλγόριθμος για την εργαστηριακή διάγνωση της VVC

Εικόνα 16	Μηχανισμοί δράσης των κυριότερων κατηγοριών αντιμυκητικών παραγόντων
Εικόνα 17	Θεραπεία συντήρησης με φλουконаζόλη σε ασθενείς με χρόνια RVVC
Εικόνα 18	Συγγενής δερματική καντιντίαση σε νεογνό
Εικόνα 19	Πιθανός μηχανισμός δράσης των προβιοτικών για την πρόληψη και τη θεραπεία της VVC και της βακτηριακής κολπίτιδας
Εικόνα 20	Σχηματική αναπαράσταση της αρχής μεθόδου της MALDI-ToF MS
Εικόνα 21	Σχηματική αναπαράσταση της πορείας που ακολουθείται για την ταυτοποίηση ζυμομυκήτων με το σύστημα MALDI Biotyper® της Bruker Daltonics
Εικόνα 22	Ρύθμιση του pH του θρεπτικού υλικού στο 7,0 με NaOH 1 M, υπό ανάδευση
Εικόνα 23	Αποστείρωση του θρεπτικού υλικού (pH 7,0) μέσω φιλτραρίσματος
Εικόνα 24	Θρεπτικό υλικό (pH 4,5) που χρησιμοποιήθηκε για τον <i>in vitro</i> έλεγχο ευαισθησίας στελεχών <i>Candida</i> spp. έναντι αζολών προσομοιώνοντας τις συνθήκες pH του κόλπου
Εικόνα 25	Σχηματική αναπαράσταση της παρασκευής των κατά ISO αραιώσεων του stock διαλύματος αντιμυκητικού, το οποίο διαλύεται σε οργανικό διαλύτη, με επιθυμητό εύρος εξεταζόμενων συγκεντρώσεων 64 - 0,125 mg/L
Εικόνα 26	Σχηματική αναπαράσταση της παρασκευής διαλυμάτων εργασίας βορικού οξέος
Εικόνα 27	Διάταξη των πλακών μικροαραιώσεων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη
Εικόνα 28	Σχηματική αναπαράσταση της παρασκευής εναιωρήματος στελεχών <i>Candida</i> spp. και του ενοφθαλμισμού των πλακών μικροαραιώσεων
Εικόνα 29	Οπτική αξιολόγηση της ανάπτυξης <i>Candida</i> spp. σε πλάκα μικροαραιώσεων φεντικοναζόλης με τη βοήθεια ανάστροφου καθρέφτη
Εικόνα 30	Φωτομετρικός προσδιορισμός EUCAST MICs ζυμομυκήτων λαμβάνοντας υπόψη το ποσοστό ανάπτυξης των παθογόνων σε διαδοχικές υποδιπλάσιες αραιώσεις αντιμυκητικού

Εικόνα 31	Ανακαλλιέργειες των πρότυπων στελεχών <i>C. krusei</i> ATCC 6258 και <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019 σε SDA μετά από επώαση στους 35 ± 2 °C για 24 ώρες
Εικόνα 32	Ανακαλλιέργειες του πρότυπου στελέχους <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019 σε χρωμογόνο θρεπτικό υλικό και SDA μετά από επώαση στους 35 ± 2 °C για 48 ώρες
Εικόνα 33	Κατανομή <i>Candida</i> spp. σε καταγεγραμμένα περιστατικά VVC στην Ελλάδα
Εικόνα 34	Κατανομή <i>Candida</i> spp. σε καταγεγραμμένα περιστατικά RVVC στην Ελλάδα
Εικόνα 35	Κατανομή των <i>Candida</i> spp. σε περιστατικά VVC και RVVC στην παρούσα μελέτη
Εικόνα 36	Σύγκριση των τιμών MIC των αζολών και του βορικού οξέος μεταξύ ευαίσθητων (FLZ-S) και ανθεκτικών (FLZ-R) στη φλουконаζόλη στελεχών <i>Candida</i> spp.
Εικόνα 37	Τιμές EUCAST ECOFF αζολών και βορικού οξέος που περιλαμβάνουν το > 97,5% και το > 99% των WT MIC για στελέχη <i>C. albicans</i>
Εικόνα 38	Τιμές EUCAST ECOFF αζολών και βορικού οξέος που περιλαμβάνουν το > 97,5% και το > 99% των WT MIC για στελέχη <i>C. parapsilosis</i>
Εικόνα 39	Τιμές EUCAST ECOFF αζολών και βορικού οξέος που περιλαμβάνουν το > 97,5% και το > 99% των WT MIC για στελέχη <i>C. glabrata</i> . Οι τιμές ECOFF της κοτριμαζόλης δεν μπορούσαν να εξαχθούν με ασφάλεια δεδομένου ότι η κατανομή των MICs παρουσίαζε δύο σχεδόν ίδιες επικρατούσες τιμές
Εικόνα 40	Έλεγχος της <i>in vitro</i> ευαισθησίας της ιτρακοναζόλης έναντι στελεχών <i>C. glabrata</i> σε pH 7,0 και 4,5
Εικόνα 41	Κατανομές EUCAST MICs φλουконаζόλης, οι οποίες προσδιορίστηκαν σε pH 7,0 και 4,5. Οι διακεκομμένες γραμμές υποδεικνύουν τα CBPs ή ECOFFs (εάν δεν υπάρχουν διαθέσιμα CBPs) για κάθε <i>Candida</i> spp.
Εικόνα 42	Κατανομές EUCAST MICs ιτρακοναζόλης, οι οποίες προσδιορίστηκαν σε pH 7,0 και 4,5. Οι διακεκομμένες γραμμές υποδεικνύουν τα CBPs ή ECOFFs (εάν δεν υπάρχουν διαθέσιμα CBPs) για κάθε <i>Candida</i> spp.

Κατάλογος πινάκων

Πίνακας 1	Συχνότητα εμφάνισης της VVC παγκοσμίως όπως περιγράφεται σε επιδημιολογικές μελέτες, οι οποίες δημοσιεύτηκαν το χρονικό διάστημα 2003-2014
Πίνακας 2	Ευρωπαϊκές κατευθυντήριες οδηγίες για την αντιμυκητική θεραπεία της οξείας VVC
Πίνακας 3	Σύσταση του θρεπτικού υλικού RPMI 1640 εμπλουτισμένο με 2% γλυκόζη
Πίνακας 4	Εύρος των εξεταζόμενων συγκεντρώσεων των αντιμυκητικών παραγόντων στην παρούσα μελέτη, συγκέντρωση των εκάστοτε stock διαλυμάτων και διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του
Πίνακας 5	Πρότυπο ISO για την παρασκευή διαλυμάτων εργασίας αντιμυκητικού, το οποίο διαλύεται σε οργανικό διαλύτη, με επιθυμητό εύρος εξεταζόμενων συγκεντρώσεων 64 - 0,125 mg/L
Πίνακας 6	EUCAST CBPs και ECOFFs για όσους από τους συνδυασμούς <i>Candida spp.</i> -αντιμυκητικού που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη είναι διαθέσιμα
Πίνακας 7	Συχνότητα εμφάνισης της VVC στην Ελλάδα όπως περιγράφεται σε διάφορες μελέτες, οι οποίες παρουσιάζονται με χρονολογική σειρά
Πίνακας 8	Χαρακτηριστικά των ασθενών της παρούσας μελέτης
Πίνακας 9	Χαρακτηριστικά των ασθενών με VVC από <i>C. albicans</i> και non- <i>albicans Candida spp.</i>
Πίνακας 10	Προφίλ <i>in vitro</i> ευαισθησίας της <i>C. albicans</i> ($n = 152$) στα αντιμυκητικά
Πίνακας 11	Προφίλ <i>in vitro</i> ευαισθησίας της <i>C. parapsilosis</i> ($n = 105$) στα αντιμυκητικά
Πίνακας 12	Προφίλ <i>in vitro</i> ευαισθησίας της <i>C. glabrata</i> ($n = 31$) στα αντιμυκητικά
Πίνακας 13	Προφίλ <i>in vitro</i> ευαισθησίας της <i>C. krusei</i> ($n = 8$) στα αντιμυκητικά

