

PERFIL DE SUSCETIBILIDADE DE *CANDIDA ALBICANS* OBTIDAS DE PACIENTES HIV POSITIVOS, FRENTE A ANFOTERICINA B, VORICONAZOL E ITRACONAZOL.

LEMONS, Janine de Aquino; **COSTA**, Carolina Rodrigues; **ARAUJO**, Crystiane Rodrigues; **MIRANDA**, Karla Carvalho; **PASSOS**, Xisto Senna; **SOUZA**, Lucia Kioko Hasimoto; **FERNANDES**, Orionalda de Fátima Lisboa; **SOUZA**, Ana Cristina Machado; **MARIANO**, Kauana Peixoto; **SILVA**, Maria do Rosário Rodrigues
Laboratório de Micologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública UFG
Palavras chaves: *Candida albicans*; suscetibilidade; exoenzimas; antifúngicos
janinedal@uol.com.br

Introdução. Infecções fúngicas invasivas têm aumentado drasticamente nas últimas três décadas, tendo se tornado uma importante causa de morbidade e mortalidade entre os pacientes imunocomprometidos (GIAMMANCO et al 2005). Candidíase orofaríngea é a doença fúngica mais comum entre os pacientes portadores da síndrome da imunodeficiência pelo vírus HIV. Estima-se que cerca de 80 a 90% desses pacientes, irão ter um episódio de candidíase orofaríngea durante o curso de sua doença (SCHALLER ET AL 2001). *Candida albicans* é o principal patógeno humano do gênero *Candida* implicado nessas infecções (PICHOVÁ ET AL 2001). Casos de candidíase orofaríngea têm sofrido nos últimos anos um decréscimo significativo, devido provavelmente ao uso de anti-retrovirais. Esses medicamentos são capazes provavelmente de inibir além das proteases do vírus aquelas secretadas por fungos do gênero *Candida*. Essas proteases são indiscutivelmente elementos de virulência correlacionados ao fungo (NIKAWA ET AL 2006). Além das proteases outra enzima como fosfolipase, capaz de degradar o tecido do hospedeiro tem sido relatada como um importante fator de virulência produzida principalmente por *Candida albicans* (KUMAR ET AL 2006). A incidência crescente de infecções fúngicas oportunistas em pacientes críticos tem se refletido em um maior e indiscriminado uso dos antifúngicos sistêmicos (NEUFELD 2002). O tratamento com anfotericina B apresenta elevada eficácia para essas infecções, entretanto esse medicamento mostra inúmeros efeitos colaterais e uma alta toxicidade para os pacientes. Dessa maneira, outros grupos de antifúngicos como os azólicos e as equinocandinas passaram a ser considerados como alternativa de tratamento para essas infecções, principalmente por serem menos tóxicos (CLANCY ET AL 2006). Assim se faz necessário conhecer o comportamento desses microrganismos na presença destes agentes antifúngicos e a produção de enzimas um dos seus principais fatores de virulência.

Objetivos. Neste trabalho nós objetivamos traçar o perfil de suscetibilidade de amostras de *Candida albicans* isoladas da mucosa bucal de pacientes HIV positivos frente ao itraconazol, voriconazol e anfotericina B, através da técnica de microdiluição em caldo (CLSI M 27 A2); verificar a concentração fungicida mínima destes isolados frente a esses agentes antifúngicos e analisar a produção de enzimas como proteinase e fosfolipase.

Metodologia

Microrganismos. Foram utilizadas 11 amostras de *Candida albicans* isoladas de mucosa bucal de pacientes HIV positivos, provenientes do Hospital de Doenças Tropicais do Estado de Goiás. Todas as amostras coletadas foram semeadas em meio

de ágar Sabouraud dextrose, incubados à temperatura ambiente e a 37°C e identificadas através de testes de formação de tubo germinativo, produção e clamidoconídio e assimilação e fermentação de hidratos de carbono (auxanograma) segundo KURTZMAN E FEELS (1998).

Teste de suscetibilidade. A suscetibilidade de todos os isolados estudados frente ao itraconazol, voriconazol e anfotericina B foi determinada de acordo com a técnica de microdiluição em caldo padronizado pelo documento M27-A2 definido pelo CLSI 2002.

Concentração Fungicida Mínima. A concentração fungicida mínima (CFM) dos isolados para itraconazol, voriconazol e anfotericina B foi obtida primeiramente através do conhecimento da concentração inibitória mínima (CIM) destes antifúngicos. A CIM obtida e as primeiras concentrações superiores a esta, foram semeadas em meio de ágar Sabouraud dextrose (em placas) até que não se obtivesse crescimento visível do microrganismo.

Dosagem de Proteinase e Fosfolipase. A dosagem de proteinase e fosfolipase foram realizadas de acordo com a técnica de RUCHEL ET AL 1983 e PRICE ET AL 1982 respectivamente, onde foram oferecidos substratos para que as enzimas pudessem atuar, quando presentes nos isolados estudados. A atividade enzimática foi calculada como a proporção entre o diâmetro da colônia e o diâmetro da zona de degradação do substrato, denominado de Prz (para proteinase) de Pz para fosfolipase sendo que três níveis de secreção dessas enzimas foram estabelecidos.

Prz=1,0 = Ausência de atividade enzimática;

1,0 <Prz ≤ 0,64 = Atividade enzimática positiva;

Prz < 0,64 = Atividade enzimática fortemente positiva.

Enquanto para fosfolipase os valores foram dados como PZ

Pz=1,0 = Ausência de atividade enzimática;

1,0 <Pz ≤ 0,64 = Atividade enzimática positiva;

Pz < 0,64 = Atividade enzimática fortemente positiva.

Resultados. Todos os isolados mostraram-se suscetíveis aos 3 agentes antifúngicos estudados, com concentrações inibitórias mínimas (CIM) baixas. Dos 11 isolados estudados 5 (45,5%) mostraram CIM de 0,015µg/ml para anfotericina B e voriconazol. A concentração fungicida mínima (CFM) de itraconazol, anfotericina B e voriconazol observada para os isolados estudados foi no mínimo 2 vezes superior à concentração inibitória mínima obtida através do teste de microdiluição em caldo. Tanto para itraconazol quanto para voriconazol observou-se que a CFM variou de 0,06 a 2,0 µg/ml. Anfotericina B mostrou-se com CFM mais baixas compatíveis com a CIM em torno de 0,03 para a maioria dos isolados estudados. Os resultados da CIM e CFM dos vários antifúngicos estudados para os isolados de *Candida* são mostrados na tabela 1.

Tabela1. Concentração inibitória e fungicida (µg/ml) de 11 isolados de *Candida albicans* frente ao itraconazol, voriconazol e anfotericina B.

**Número do
Isolado**

Agentes antifúngicos

	Itraconazol		Voriconazol		Anfotericina B	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
02	0,015	0,06	0,015	0,06	0,125	0,25
03	0,5	0,5	0,015	0,06	0,06	0,125
04	0,25	1,0	0,06	0,5	0,25	0,25
09	0,5	2,0	0,5	2,0	< 0,015	0,03
13	0,25	1,0	0,03	0,125	< 0,015	0,03
54	0,25	0,5	< 0,015	0,06	< 0,015	0,06
82	0,03	0,125	0,25	0,5	< 0,015	0,06
110	0,03	0,125	0,015	1,0	< 0,015	0,06
114	0,125	0,5	0,25	2,0	< 0,015	0,03
115	0,5	1,0	0,25	0,5	< 0,015	0,03
117	0,015	0,06	0,015	0,06	< 0,015	0,03

Todos os isolados estudados mostraram uma atividade enzimática, variando de 0,46 a 0,33 para proteinase (fortemente proteolítica -100%) e de fosfolipase variando de 0,33 a 1, (figura 1)

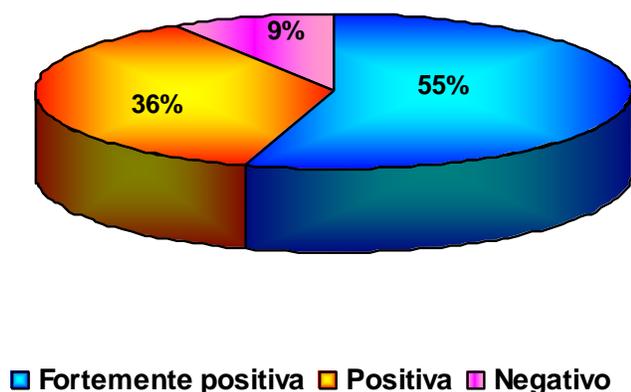


Figura 1. Atividade enzimática de fosfolipase para 11 isolados de *Candida albicans*

Discussão. A alta atividade de exoenzimas consideradas fatores de virulência expressa por estes microrganismos mostra a sua significância como produtor de infecção. Todos os isolados apresentaram uma atividade fortemente positiva para

proteinase com $p < 0,64$, enquanto para fosfolipase 55% mostraram elevada atividade 36% tiveram uma fosfolipase positiva e apenas 9% não foram capazes da produção desta enzima. Nossos resultados estão de acordo com outros autores que relatam a forte produção dessas enzimas. Trabalhos realizados com pacientes HIV positivos mostraram que todos os isolados de *Candida albicans* obtidos da mucosa bucal desses pacientes foram positivas para fosfolipase e proteinase, sugerindo que esses isolados têm uma alta produção dessa enzima quando comparados com isolados de outros sítios (KOTHAVADE & PANTHAKI 1998, KUMAR ET AL 2006). É preciso destacar que em pacientes HIV positivos a expressão dessa patogenicidade através dessas duas enzimas, associadas à seletividade de espécies providencia condições que aumentam a aderência e a colonização facilitando a multiplicação dessas leveduras (BOSCO ET AL 2003).

Os resultados observados em nosso trabalho mostraram que dos agentes antifúngicos estudados, a Anfotericina B foi o mais efetivo. Experimentos anteriores demonstraram alta atividade *in vitro* deste antifúngico em isolados da mucosa bucal. BATISTA ET AL 1999 e BURGESS ET AL 2000; mostraram valores de CIM baixos para anfotericina B para isolados deste sítio em pacientes com AIDS. A alta atividade antifúngica de itraconazol e voriconazol demonstrada para isolados de *C. albicans* encontra suporte em vários trabalhos que mostraram que estes antifúngicos podem inibir o crescimento destes microrganismos em baixas concentrações. MARCO ET AL 1998 verificaram CIM de 0,6 $\mu\text{g/ml}$ ao voriconazol para a maioria do isolados de *Candida albicans*, e sugeriu que este é um novo agente triazólico de alta potência, podendo inclusive ser ativo para espécies de *Candida* resistentes ao fluconazol. Para itraconazol, embora os valores de CIM sejam mais elevados, a maioria mostrou-se com CIM de 0,5 $\mu\text{g/ml}$, demonstrando que os isolados são suscetíveis a este agente antifúngico, levando-se em consideração os valores de breakpoints estabelecidos pelo CLSI 2002.

Conclusões: Nossos resultados mostraram que anfotericina B, voriconazol e itraconazol apresentaram valores de CIM baixas, o que permite sugerir o possível uso destes fármacos na terapia destes pacientes e que a produção de alta atividade das exoenzimas, confirmou a capacidade de patogenicidade da espécie albicans .

Referencias

- BATISTA, J.M; BIRMAN, E.G; CURY, A.E. Susceptibility to antifungal drugs of *Candida albicans* strains isolated from patients with denture stomatitis. **Rev Odontol Univ São Paulo** 13: 343-348, 1999
- BOSCO, V.L; BIRMAN, E.G; CURY, A.E; PAULA, C.R. Yeasts from the oral cavity of children with AIDS: exoenzyme production and antifungal resistance. **Pesqui Odontol Bras** 17: 217-222, 2003
- BURGESS, D.S; HASTINGS, R.W; SUMMERS, K.K; HARDIN, T.C; RINALDI, M.G. Pharmacodynamics of fluconazole, itraconazole, and amphotericin B against *Candida albicans*. **Diag Microbiol and Infect Dis** 36: 13-18, 2000
- CLANCY, C.J; HUANG H; CHENG S; DERENDORF H; NGUYEN, M.H. Characterizing the effects of caspofungin on *Candida glabrata* isolates by simultaneous time-kill and postantifungal-effect experiments. **Antimicrob Agents and Chemother** 50: 2569-2572, 2006

- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved standard. Document M27-A, CLSI, Pennsylvania, 19087, vol.17, p.1-29, 2002..
- GIAMMANCO, G.M, LOPES, M.M, COIMBRA, R.S, PIGNATO, S, GRIMONT, P.A.D, GRIMONT, F, FREITAS G, GIAMMANCO G. Value of morphotyping for the characterization of *Candida albicans* clinical isolates. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 100: 483-490, 2005
- KOTHAVADE, R.J; PANTHAKI, M.H. Evaluation of phospholipase activity of *Candida albicans* and its correlation with pathogenicity in mice. **J Med Microbiol** 47: 99-102, 1998
- KUMAR, C.P.G, KUMAR, S.S.J, MENON, T. Phospholipase and proteinase activities of clinical isolates of *Candida* from immunocompromised patients. **Mycopathologia** 161: 213-218, 2006
- KURTZMAN, C.P; FELL, J.W. The Yeast, A Taxonomic Study. 4th edition, Elsevier 1998
- MARCO, F; PFALLER, M.A; MESSER, S; JONES, R.N. In vitro activities of voriconazole (UK- 109,496) and four other antifungal agents against 394 clinical isolates of *Candida spp.* **Antimicrob agents and Chemother** 42: 161-163, 1998
- NEUFELD, P.M. Novos agentes antifúngicos: foco em voriconazol e caspofungina. **Rev Iberoamerican Micol** 17: 116-120, 2002
- NIKAWA, H, EGUSA, H, MAKIHIRA, S, OKAMOTO, T, KURIHARA, H, SHIBA, H, AMANO, H, MURAYAMA, T, YATAN, I H, HAMADA, T. An in vitro evaluation of the adhesion of *Candida* species to oral and lung tissue cells. **Mycoses** 49: 14-17, 2006
- PICHOVÁ, I, PAVLÍCKOVÁ, L, DOSTAL, J, DOLEJSI, E, HRUSKOVÁ-HEIDINGSFELDOVÁ, O, WEBER, J, RUMML, T, SOUCEK, M. Secreted aspartic proteases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida lusitanae*. Inhibition with peptidomimetic inhibitors. **Eur J Biochem** 268: 2669-2677, 2001
- PRICE, M.F; WILKINSON, I.D.; GENTRY, L.O. Plate methods for detection of phospholipase in *Candida albicans* **Sabouraudia**, 20: 15-20, 1982
- RUCHEL, R.; TEGELLER, R.; TROST, M. A comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. **Sabouraudia** 20: 233-244, 1982
- SCHALLER, M, JANUSCHKE, E, SCHACKERT, C, WOERLE, B, KORTING, H.C. Different isoforms of secreted aspartyl proteinases (SAP) are expressed by *Candida albicans* during oral and cutaneous candidosis in vivo. **J Med Microbiol** 50: 743-747, 2001

Agradecimentos pelo suporte financeiro ao

