

CANDIDA ALBICANS E CANDIDA DUBLINIENSIS: TESTE DE SUSCETIBILIDADE IN VITRO FRENTE A ANFOTERICINA B

Antonella Souza Mattei, Luiz Carlos Severo

Programa de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS

RESUMO

A incidência de infecções fúngicas provocadas por *Candida não-albicans* é crescente e, em alguns casos está associada a altas taxas de mortalidade, aumento do tempo de internação e custos hospitalares. Assim, a diferenciação entre *C.albicans* e *C.dublinsiensis* tornou-se ainda de maior importância quando demonstrada a resistência de algumas cepas de *C. dublinsiensis* ao fluconazol, diferenciando o tratamento de pacientes com candidose por este agente. O objetivo desse trabalho foi testar *in vitro* isolados de *C.albicans* e *C. dublinsiensis* frente a anfotericina B. Para a realização do estudo de suscetibilidade *in vitro* foram testadas 98 isolados leveduriformes, provenientes de candidose em humanos, frente a anfotericina B. Os isolados foram identificados como *C. albicans* através da formação do tubo germinativo e diferenciados através de testes fenotípicos como, termotolerância e repique em meio hipertônico e niger. O teste de suscetibilidade foi realizado de acordo com o documento CLSI M27-A2, no qual as concentrações do antifúngico testadas foram de 4 a 0,007µg/mL, assim determinando a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida (CF) dos isolados testados. Das 99 cepas testadas, 92 foram identificadas como *C. albicans* e sete como *C. dublinsiensis*, diferenciadas através dos testes fenotípicos. As concentrações de anfotericina B obtidas variaram de 0,03 a 0,5 µg/mL. As CIMs obtidas de *C. albicans* foram 0,25µg/mL e de *C. dublinsiensis*, 0,125 ug/mL e a CF de *C. albicans* foi 0,125µg/mL e de *C. dublinsiensis* foi 0,125 µg/mL. Assim, todos os isolados testados de *C. albicans* e *C. dublinsiensis* foram sensíveis a anfotericina B.

PALAVRAS-CHAVE: leveduras; sensibilidade *in vitro*; antifúngico.

INTRODUÇÃO

Os fungos são importantes patógenos oportunistas em humanos, com destaque o gênero *Candida*, levedura que causa micose superficial e sistêmica, principalmente em pacientes imunodeprimidos (SULLIVAN et al., 2004).

A incidência de infecções fúngicas provocadas por espécies *Candida não-albicans* é crescente e, em alguns casos está associada a altas taxas de mortalidade, aumento do tempo de internação e custos hospitalares (MALUCHE; SANTOS, 2008). Assim, a diferenciação entre *C. albicans* e *C. dublinsiensis* tornou-se ainda de maior importância quando demonstrada a resistência de algumas cepas de *C. dublinsiensis* ao fluconazol, diferenciando o tratamento de pacientes com candidose por este agente (NONOKA et al., 2008).

Nos últimos 20 anos, a epidemiologia da candidemia foi consideravelmente modificada pela emergência de espécies de *Candida não-albicans* e a resistência a antifúngicos triazólicos (LABBÉ et al., 2009).

A anfotericina B é um antibiótico poliênico, que atua na parede celular fúngica como fungicida e fungistático. É utilizado no tratamento das infecções fúngicas sistêmicas, entretanto possui efeitos colaterais como principalmente a nefrotoxicidade (FILIPPIN; SOUZA, 2006).

O objetivo desse trabalho foi testar *in vitro* isolados de *Candida albicans* e *Candida dublinsiensis* frente a anfotericina B.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização do estudo de suscetibilidade *in vitro* foram testadas 99 isolados leveduriformes, provenientes de candidose em humanos, frente a anfotericina B.

Os isolados foram identificados como *C. albicans* através da formação do tubo germinativo e diferenciados através de testes fenotípicos como, termotolerância e repique em meio hipertônico e niger.

O teste de suscetibilidade foi realizado de acordo com o documento CLSI M 27-A2, através da técnica de microdiluição em caldo. Assim, os inóculos foram preparados a partir de colônias jovens, com crescimento de 24h em ágar Sabouraud a 36°C, suspensos em 5mL de solução salina estéril e homogeneizados. Esta suspensão do inóculo foi ajustada na escala 0,5 de Mc Farland em espectrofotômetro com comprimento de onda de 530nm. Após, foi preparado uma diluição de 1:100 em solução salina e em seguida, uma nova diluição 1:20 em caldo RPMI-1640.

As concentrações testadas foram de 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,06; 0,03; 0,015 e 0,007µg/mL distribuídas em microplacas, sendo incubadas a 35°C por 48h. Foi realizada a leitura visual do crescimento fúngico e determinado a concentração inibitória mínima (CIM) de 90% dos isolados testados. E a concentração fungicida foi determinada através da inoculação de 5µL dos três últimos poços, os quais não apresentaram crescimento fúngico visível, em placas contendo ágar Sabouraud e incubadas a 35°C por 48h.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 99 cepas testadas, 92 foram identificadas como *C. albicans* e sete como *C. dubliniensis*, diferenciadas através dos testes fenotípicos. Essas provas para a diferenciação são cada vez mais frequentes, rápidas de executar e de baixo custo para os laboratórios, sendo descritas por diversos autores (RIBEIRO et al., 2001; CHOWDHARY et al., 2011; LORETO et al., 2010; ALVES et al., 2002; ALVAREZ, SUAREZ; CAICEDO, 2009; AKGUL; CERIKCIOGLU, 2009).

As concentrações de anfotericina B obtidas variaram de 0,03 a 0,5 µg/mL, com intervalo menor quando comparado com Antunes et al. (2004), que analisou 58 cepas de *C. albicans* frente a esse antifúngico, com valores de 0,25 a 1 µg/mL.

As CIMs obtidas de *C. albicans* foram 0,25µg/mL e de *C. dubliniensis*, 0,125 µg/mL e a CF de *C. albicans* foi 0,125µg/mL e de *C. dubliniensis* foi 0,125 µg/mL. A determinação da CF permite que a menor concentração da droga que impediu o crescimento seja observada, sendo diferente da CIM em muitos casos (CASTRO et al., 2006). O que foi observado nesse estudo com relação a *C. albicans*, no qual a CF foi maior do que a CIM, enquanto que não houve diferença em relação a *C. dubliniensis*.

Assim, nenhuma cepa apresentou resistência a essa droga (CIM > 1µg/mL), decorrente ao aumento ou diminuição dos esteróides da membrana, principalmente o ergosterol e seus precursores (FILLIPIN; SOUZA, 2006). Entretanto, essa resistência já foi descrita em outras espécies desse gênero como, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (SWINNE, WATELLE; NOLARD, 2005).

Hamza et al. (2008) realizou um estudo com 250 amostras de *C. albicans* isoladas de candidose oral frente a anfotericina e obteve CIM de 0,5µg/mL. Concordando com Labbé et al. (2009) que também relatou CIM 1µg/mL de *C. albicans* provenientes de candidemia. Assim, esses dois autores demonstraram concentrações maiores do que vista nesse estudo.

Desse modo, a utilização de testes de suscetibilidade proporciona além da dose mais adequada, a diminuição do período e gastos com o tratamento da candidose.

CONCLUSÃO

Os isolados testados de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis* foram sensíveis a anfotericina B, sendo que esse ainda pode ser utilizado no tratamento da candidose.

AGRADECIMENTO: À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado e aos colaboradores Sydney Alves, Débora Mario, Luciana Guazzelli, Cecília Severo e Flávio Mattos pelo auxílio no desenvolvimento desse trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKGUL, Ö.; CERIKCIOGLU, N. **Hypertonic Sabouraud Dextrose Agar as a Substrate for Differentiation of *Candida dubliniensis***. Mycopathologia, 167:357–359, 2009.
- ALVAREZ, M.; SUAREZ, B.; CAICEDO, L. **Isolation of *Candida dubliniensis* for the First Time in Cali, Colombia, and its Identification with Phenotyping Methods**. Mycopathologia, 167:19–24, 2009.
- ALVES, S.; MILAN, E.; SANT'ANA, P.; OLIVEIRA, L.; SANTURIO, J.; COLOMBO, A. **Hypertonic sabouraud broth as a simple and powerful test for *Candida dubliniensis* screening**. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 43: 85–86, 2002.
- ANTUNES, A.G.; PASQUALOTTO, A.C.; DIAZ, M.C.; D'AZEVEDO, P.A.; SEVERO, L.C. **Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: species distribution and antifungal susceptibility patterns**. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 46: 239-241, 2004.
- CASTRO, T.L.; COUTINHO, H.D.; GEDEON, C.; SANTOS, J.; SANTANA, W.; SOUZA, L. **Mecanismo de resistência da *Candida* spp. a antifúngicos**. Infarma, 18(9): 30-35, 2006.
- CHOWDHARY, A.; RANDHAWA, H.; KOWSHIK, T.; KATHURIA, S.; ROY, P.; BRANDT, M. **Application of hypertonic Sabouraud glucose agar for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans***. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 69: 440–442, 2011.
- FILIPPIN, F.; SOUZA, L. **Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B**. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 42(2): 167-194, 2006.
- HAMZA, O.; MATEE, M.; MOSHI, M.; SIMON, E.; MUGUSI, F.; MIKX, F.; HELDERMAN, W.; JMMRIJS, A.; VAN DER VEM, A.; VERWEIJ, P. **Species distribution and in vitro antifungal susceptibility of oral yeast isolates from Tanzanian HIV-infected patients with primary and recurrent oropharyngeal candidiasis**. BMC Microbiology, 8:135-142, 2008.
- LABBÉ, A.; PÉPIN, J.; PATIÑO, C.; CASTONGUAY, S.; RESTIERI, C.; LAVERDIERE, M. **A single-centre 10-year experience with *Candida* bloodstream infections**. The Canadian Journal of Infectious Diseases e Medical Microbiology, 20(2): 45-50, 2009.
- LORETO, E.; SCHEID, L.; NOGUEIRA, C.; ZENI, G.; SANTURIO, J.; ALVES, S. ***Candida dubliniensis*: Epidemiology and Phenotypic Methods for Identification**. Mycopathologia, 169:431–443, 2010.

MALUCHE, M.E.; SANTOS, J.I. ***Candida sp.* e infecções hospitalares: aspectos epidemiológicos e laboratoriais.** Revista Brasileira de Análises Clínicas, 40(1): 65-67, 2008

NONAKA, C.F., NASCIMENTO, G., GOULART FILHO, J.A., LIMA, K.C., MILAN, E.P. ***Candida dubliniensis* – levedura emergente associada à candidose oral.** Revista de Odontologia da UNESP, 37(2): 125-132, 2008.

RIBEIRO, P.; QUERIDO, S.; BACK-BRITO, G.; MOTA, A.; KOGA-ITO, C.; JORGE, A. **Research on *Candida dubliniensis* in a Brazilian yeast collection obtained from cardiac transplant, tuberculosis, and HIV-positive patients, and evaluation of phenotypic tests using agar screening methods.** Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 71:81–86, 2011.

SULLIVAN, D.; MORAN, G.; PINJON, E.; AL-MOSAID, A.; STOKES, C.; VAUGHAN, C.; COLEMAN, D. **Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms, and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*.** FEMS Yeast Research, 4: 369-376, 2004.

SWINNE, D.; WATELLE, M.; NOLARD, N. **In vitro activities of voriconazole, fluconazole, itraconazole and amphotericin B against non *Candida albicans* yeast isolates.** Revista Iberoamericana de Micologia, 22: 24-28, 2005.