

Susceptibilidade de isolados de Candida de pacientes HIV positivos à azólicos e anfotericina B

Neiva Aparecida Grazziotin¹, Leticia Jacobi Danielli², Clarice Teresinha Maroso³,
Vanderlei Augusto Madalozzo⁴, Mariluce da Rocha Jaskulski⁵

RESUMO

Este estudo foi objetivado a avaliar a suscetibilidade de *Candida*, isoladas da mucosa oral de pacientes HIV-positivos, frente ao fluconazol, itraconazol, voriconazol e anfotericina B. Os ensaios foram realizados de acordo com o documento M27-A3 (2008) do CLSI e interpretados pelos documentos M27-S3 (2008) e M27-S4 (2012). Os testes detectaram 5,8 % dos isolados resistentes ao itraconazol, de acordo com a M27-S3 e 16,2% de resistência ao fluconazol pela M27-S4. Frente aos demais antifúngicos, todos os isolados foram considerados sensíveis. Os autores discutem estes achados contextualizando-os na ótica dos novos pontos de corte espécies-específicos.

Descritores: Suscetibilidade; *Candida*; HIV

Susceptibility isolated Candida spp from HIV infected patients to azoles and amphotericin B

ABSTRACT

The aimed of this study was evaluate the susceptibility of *Candida* isolated from HIV-seropositive patients to fluconazole, itraconazole, voriconazole and amphotericin B. The assays were carried out according to CLSI M27-A3 document (2008) and interpreted by M27-S3 (2008) and M27-S4 (2012). Only 5.8% of the isolates were classified as resistant to itraconazole by M27-S3 and 16.2% of resistance to fluconazole was detected by M27-S4. Forward to other antifungals, all isolates were considered sensitive. The authors discuss these findings in the context of the new species-specific breakpoints.

Descriptors: Susceptibility; *Candida*; HIV

¹ Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil.

² Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil

³ Enfermeira pela Fundação Educacional do Alto Uruguai Catarinense (FEAUC), Concórdia, SC, Brasil

⁴ Médico Especialista em Doenças Infecciosas e Parasitárias pelo Hospital Nossa Senhora da Conceição (HNSC), Porto Alegre, RS, Brasil

⁵ Doutora em Ciências da Saúde pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brasil.

Introdução

Entre os pacientes HIV positivos ou com AIDS, as infecções oportunistas causadas por *Candida* são frequentes e esperadas, porque a colonização por tais agentes, nestes pacientes, é maior do que na população em geral¹⁻²⁻⁸⁻¹⁶⁻²²⁻²³.

A candidíase de orofaringe permanece como infecção fúngica mais comum nos pacientes com HIV, determinante de significativa morbidade. Nos últimos anos, a terapêutica antiretroviral de alta potência (HAART) causou grande impacto na AIDS, onde, dentre muitos benefícios, incluindo redução significativa do número de pacientes com candidíase de orofaringe. Na Espanha, observou-se diminuição de 56% para 9,3% dos casos de candidíase de orofaringe após a introdução da HAART⁸⁻¹⁶⁻¹⁷⁻¹⁸⁻²⁰⁻²¹⁻²⁷.

A suscetibilidade de *Candida* spp. isoladas de pacientes HIV positivos ou com AIDS foi bastante explorada na era pré-HAART^{6,15}; posteriormente observa-se uma redução de publicações abordando o perfil antifúngico desses isolados⁷⁻⁹⁻¹³. Por outro lado, a publicação do documento suplementar do CLSI (*Clinical Laboratory Standards Institute*) nomeado M27-S4 de 2012⁵, traz nova interpretação aos testes de suscetibilidade de *Candida* spp, o que sugere repercussões nos resultados da suscetibilidade. O presente estudo foi objetivado a comparar os dois critérios de interpretação (M27-S3 e M27-S4) das concentrações inibitórias mínimas obtidas nos testes de suscetibilidade de *Candida* aos antifúngicos.

Material e Métodos

Pacientes: Noventa e oito pacientes HIV positivos ou com AIDS atendidos no Serviço de Assistência Especializada (SAE) em Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS de Erechim (RS) foram selecionados. Esta Unidade Básica de Saúde polariza o atendimento de toda a região norte do Estado do Rio Grande do Sul.

Coleta de material biológico: procedeu-se a colheita de material da orofaringe de pacientes com ou sem lesões. Após a colheita, os swabs eram mantidos em meio de transporte para fungos e, a seguir, encaminhados ao Laboratório de Micologia da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e Missões (URI – Campus de Erechim)¹⁰⁻¹².

Isolamento e identificação: os swabs eram semeados em placas contendo ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol, e incubadas a 35°C durante 48 hs. As colônias compatíveis com *Candida* spp eram confirmadas através de preparação a fresco com lactofenol azul algodão e, a seguir, cultivadas em CHROMagar® *Candida*. As demais provas identificatórias para confirmação das espécies consistiram de: microcultivo em ágar fubá, filamentação em soro humano, hidrólise do Tween 80, característica colonial em ágar níger, capacidade de crescimento em caldo contendo NaCl 6,5%, fermentação de carboidratos, assimilação de carboidratos e de nitrogênio¹⁰⁻¹²⁻¹⁴.

Testes de suscetibilidade a antifúngicos: foram realizados pela técnica de microdiluição em caldo, de acordo com o documento CLSI M27-A3 (2008). Os antifúngicos utilizados foram fluconazol, itraconazol, voriconazol e anfotericina B. As interpretações foram realizadas pelos protocolos M27-S3 (2008) e M27-S4 (2012). *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *C. albicans* ATCC 90028 foram utilizadas como controles³⁻⁴⁻⁵.

Número do parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da URI Erechim: CAEE 0011.0.232.000-05

Resultados

A partir de 98 raspados de orofaringe de pacientes HIV positivos ou com AIDS, foram obtidos 68 isolados de leveduras do gênero *Candida*, evidenciando 46 pacientes colonizados ou com candidíase clinicamente bem estabelecida. Destes isolados, 40 (58,8%) corresponderam a *C. albicans* e entre os 28 (41,17%) isolados de *Candida* não-*albicans* identificou-se as seguintes espécies: *C. tropicalis* (n=15), *C. parapsilosis* (n=5), *C. lusitanae* (n= 2) e *C. glabrata* (n=5) e *C. dubliniensis* (n=1). De acordo com os *breakpoints* estabelecidos pelo CLSI (M27-S3, 2008) detectou-se 4 (5,8%) de isolados resistentes ao itraconazol [*C. albicans* (n=1), *C. tropicalis* (n=1) e *C. glabrata* (n=2)]. Quando considerou-se os novos pontos de corte (*breakpoints*) espécie-específicos estabelecidos pelo documento M27-S4 (2012), o estudo detectou 8 isolados de *C. albicans* e 3 de *C. tropicalis* resistentes ao fluconazol. Desta forma, com base nos critérios de interpretação da M27-S4 contabilizou-se 11 (16,2%) isolados resistentes ao fluconazol. A tabela 1 evidencia a significativa alteração no número de isolados classificados como sensíveis-dose-dependentes (SDD) quando as duas técnicas são comparadas. Nenhum isolado foi considerado resistente ao voriconazol e a anfotericina B.

Tabela 1 - Suscetibilidade de *Candida* spp. isoladas da orofaringe de pacientes HIV/AIDS. Detecção de isolados não sensíveis com base nos *breakpoints* do CLSI M27-S3 e M27-S4.

Espécies	n*	ATF	CIM (µg/mL)			Breakpoints M27-S3		Breakpoints M27-S4	
			Intervalo	CIM 50%	CIM 90%	R	SDD	R	SDD
<i>C. albicans</i>	40	FLZ	0,5-32	4,0	8,0	0	2	8	7
		ITZ	0,06 – 1,0	0,25	0,5	1	12	--	--
		VRZ	0,06 – 1,0	0,125	0,5	0	0	0	20
		AMB	0,06 – 0,5	0,125	0,25	0	0	--	--
<i>C. tropicalis</i>	15	FLZ	0,5 – 16	4,0	8,0	0	1	3	1
		ITZ	0,125 – 1,0	0,125	0,25	1	7	--	--
		VRZ	0,06 – 0,5	0,125	0,25	0	0	0	12
		AMB	0,125 – 0,5	0,125	0,25	0	0	--	--
<i>C. parapsilosis</i>	5	FLZ	0,125 – 0,5	0,25	0,5	0	0	0	0
		ITZ	0,06 – 0,125	0,06	0,125	0	0	--	--
		VRZ	0,06 – 0,125	0,06	0,125	0	0	0	0
		AMB	0,06 – 0,25	0,125	0,25	0	0	--	--
<i>C. glabrata</i>	5	FLZ	8 – 16	8	8	0	1	0	5
		ITZ	0,25 – 2	1	2	2	3	--	--
		VRZ	0,125 – 0,25	0,125	0,25	0	0	?	?
		AMB	0,25 – 0,5	0,25	0,5	0	0	--	--
<i>C. lusitanae</i>	2	FLZ	0,25 – 0,5	0,25	0,5	0	0	--	--
		ITZ	0,06 – 0,125	0,06	0,125	0	0	--	--
		VRZ	2-2	2,0	2,0	0	0	--	--
		AMB	0,125 – 0,5	0,125	0,5	0	0	--	--
<i>C. dubliniensis</i>	1	FLZ	1	1	1	0	0	--	--
		ITZ	0,25	0,25	0,25	0	1	--	--
		VRZ	0,25	0,25	0,25	0	0	--	--
		AMB	0,25	0,25	0,25	0	0	--	--

(*) n = número de isolados, ATF = antifúngicos, FLZ (fluconazol), ITZ (itraconazol), VRZ (voriconazol), AMB (anfotericina B), CIM (Concentração Inibitória Mínima), R (resistente), SDD (sensíveis-dose-dependente)

(--) antifúngicos ou espécies não contempladas na M27-S4

(?) M27-S4 não traz *breakpoints* nesta situação

Discussão

Neste estudo incluíram-se pacientes HIV positivos e pacientes com AIDS com ou sem lesões de orofaringe, porque as relações entre colonização e infecção por *Candida* são complexas entre estes pacientes.

Em relação às espécies isoladas, *C. albicans* (58,8%) foi a mais prevalente, seguida de *C. tropicalis* (22,05%), *C. parapsilosis* (7,35%), *C. glabrata* (7,35%), *C. lusitanae* com 2,94% e *C. dubliniensis* com 1,47%. Este perfil está de acordo com observações de outros autores que confirmam o destaque para *C. albicans*¹⁹⁻²¹⁻²³⁻²⁵.

No presente estudo isolamos, ainda, *C. dubliniensis*; esta espécie foi reconhecida somente em 1995, na Irlanda, a partir de um estudo sobre a candidíase de orofaringe em pacientes com AIDS¹⁴. O fato de *C. dubliniensis* emitir tubo germinativo em soro humano a 37°C e produzir clamidoconídios em ágar-fubá, sugere *C. albicans*; somente com provas fenotípicas adicionais como a ausência de crescimento em caldo Sabouraud contendo NaCl 6,5% ou a avaliação das bordas das colônias em ágar níger permite a diferenciação entre estas duas espécies tão relacionadas. *C. dubliniensis* é um componente menor da microbiota da boca e a importância de sua detecção está na sua facilidade em adquirir resistência ao fluconazol durante antifungoterapia prolongada com este azólico¹⁴.

Em relação a frequência de pacientes com AIDS apresentando candidíase de orofaringe, é importante ressaltar sua recente redução devido ao impacto trazido pela terapêutica antiretroviral de alta potência (*highly active anti-retroviral therapy* - HAART) que, ao reduzir a carga viral, preserva as defesas imunológicas e, conseqüentemente, diminuiu as infecções oportunistas dos pacientes com AIDS, incluindo as candidíases⁸⁻¹⁶⁻¹⁸⁻²⁵.

Atualmente, a candidíase de orofaringe dos pacientes HIV positivos ou com AIDS têm menor incidência e, quando ocorre, pode ser mais facilmente tratada agora do que o era antes do advento da HAART. Cabe enfatizar, entretanto, que a não adesão ao tratamento ou em países onde a HAART não está disponível, configura-se os quadros de episódios frequentes de candidíases refratárias ao tratamento antifúngico¹⁸. A gravidade destes episódios se intensifica quando a não adesão a HAART e/ou ao tratamento antimicótico pode gerar a emergência de isolados resistentes^{11,21,26}. A avaliação da suscetibilidade de *Candida* spp aos antifúngicos é uma forma de monitorar esta situação, ainda que de forma localizada.

A avaliação da suscetibilidade de fungos leveduriformes está fundamentada na técnica de microdiluição em caldo aprovada pelo CLSI (*Clinical Laboratory Standard Institute*; USA) conforme descrita no documento M27-A3⁽³⁾. Todavia a interpretação das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) é hoje regida por dois documentos distintos e complementares entre si: os testes com itraconazol tem sua interpretação pelo documento M27-S3 (2008)⁴, enquanto que o fluconazol, o voriconazol e as equinocandinas (não avaliadas no presente estudo) são interpretadas pela M27-S4 (2012)⁵.

Outra inovação trazida pela M27-S4 é que os pontos de corte (*breakpoints*) são espécie-específicos; assim, frente a um mesmo antifúngico os pontos de corte variam em função da espécie. Isto veio contemplar a natureza complexa dos fungos com taxas de crescimento e fisiologia diferenciadas entre espécies. A anfotericina B não teve ainda seus *breakpoints* definidos por nenhuma técnica padronizada⁵.

Com base na técnica M27-S3 (2008) a resistência somou 4 isolados (5,8%) e só ocorreu em relação ao itraconazol. Tal fato não é comprometedor porque o itraconazol não é o antifúngico de eleição para o tratamento das candidíases da orofaringe. Devido as discrepâncias entre a sensibilidade *in vitro* e as falhas terapêuticas é que o CLSI revisou os *breakpoints* para o fluconazol e o voriconazol, aproximando-se dos *breakpoints* estabelecidos previamente pelo EUCAST (*European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing*) onde as correlações *in vitro* e *in vivo* eram melhores. Assim, no documento M27-S4, alterando os *breakpoints*, a detecção da resistência ficou mais rigorosa⁵.

No presente estudo, enquanto nenhum isolado foi considerado resistente ao fluconazol pela M27-S3, foram detectados 11(16,2%) isolados resistentes pela M27-S4, o que altera completamente a epidemiologia, e condução terapêutica desta micose. Outrossim, através do documento M27-S4, inexistente *C. glabrata* sensível ao fluconazol, pois, toda espécie é, no mínimo, considerada sensível-dose-dependente (SDD), conforme pode ser constatado na Tabela 1. Comparando o número de isolados resistentes detectados pela M27-S3 (5,8%) com aqueles detectados pela M27-S4 (16,2%), fica evidente o aumento da resistência pelos critérios da M27-S4.

O voriconazol destaca-se como o azólico mais potente, pois, por nenhum dos critérios, algum isolado manifestou resistência. O elevado número de isolados sensível-dose-dependente detectados pela M27-S4 é sugestivo da tendência à resistência e da necessidade de monitoramento frequente da suscetibilidade de *Candida* spp aos azólicos. Desconhecemos qual o grau de adesão à HAART e antifungoterapia dos pacientes arrolados neste estudo, que pudesse justificar o elevado número de isolados SDD, mas o fato da M27-S4 estar em vigência há apenas dois anos, pode justificar a ausência de estudos similares considerando esta interpretação.

Finalmente, cabe justificar a inclusão da anfotericina B neste estudo. Este poliênico é reservado para uso endovenoso em pacientes com candidemias e outras micoses sistêmicas; todavia, foi aqui incluído como marcador da resistência, pois a nistatina é um dos fármacos de uso tópico indicado nas manifestações orais de candidíase^{18,19,25} e não contemplada com *breakpoints* em nenhuma técnica proposta para avaliação da suscetibilidade aos antifúngicos. No presente estudo, todos os isolados foram considerados sensíveis à anfotericina B.

Referências Bibliográficas

1. Badiee P, Alborzi A, Davarpanah MA, Shakiba E. Distributions and antifungal susceptibility of *Candida* species from mucosal sites in HIV positive patients. Arch Iran Med. 2010;13:282-287.
2. Campisi G, Pizo G, Milici ME, Mancuso S, Margiotta V. Candidal carriage in the oral cavity of human immunodeficiency virus-infected subjects. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod . 2002;93: 281-286.

3. Clinical Laboratory and Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing yeasts 3rd ed. Approved standard M27-A3. Wayne: Clinical Laboratory and Standards Institute. 2008. (Document M27-A3).
4. Clinical Laboratory and Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing yeasts; thirth edition informational supplement. Wayne: Clinical Laboratory and Standards Institute. 2008. (Document M27-S3).
5. Clinical Laboratory and Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing yeasts; fourth edition informational supplement. Wayne: Clinical Laboratory and Standards Institute. 2012.(Document M27-S4).
6. Colombo AL, Matta D, Almeida LP, Rosas R. Fluconazole susceptibility of Brazilian Candida isolates assessed by a disk diffusion method. *Braz J Infect Dis*. 2002;6:118-123.
7. Delgado ACD, Jesus Pedro R, Aoki FH, Resende MR, Trabasso P, Colombo AL, Oliveira MSM, Mikami Y, Moretti ML. Clinical and microbiological assessment of patients with a long-term diagnosis of human immunodeficiency virus infection and Candida oral colonization. *Clin Microbiol Infect*.2009;15(4):364–371.
8. Greenspan D, Gange SJ, Phelan JA, Navazesh M, Alves MEAF, Macphail LA et al. Incidence of oral lesions in HIV-1-infected women: reduction a with HAART. *J Dental Res*.2004;83:145-150.
9. Jiang L, Yong X, Li R, Peng Y, Liu W, Qin Q, Zhang L, Liu Z, Liang H, Tao R. Dynamic analysis of oral Candida carriage, distribution, and antifungal susceptibility in HIV-infected patients during the first year of highly active antiretroviral therapy in Guangxi, China. *J Oral Pathol Med*.2014; 43: 696–703.
10. Kurtzman CP, Fell JW. *The Yeast. A toxonomic study*. Elsevier, Amsterdam, 1998.
11. Laet Sant'ana P, Milan EP, Martinez R, Queiroz-Telles F, Ferreira MS, Alcântara AP et al. Multicenter Brazilian study of oral Candida species isolated from AIDS patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz*.2002;97(2):253-257.
12. Larone, DH. *Medically important fungi. A guide for identification*. AMS Press, Washington, 1995.
13. Li YY, Chen WY, Li X, Li HB, Li HQ, Wang L, He L, Yang XP, Wang XC, Huang YL, Yao YG. Asymptomatic oral yeast carriage and antifungal susceptibility profile of HIV-infected patients in Kunming, Yunnan Province of China. *BMC Infect Dis*. 2013; 13(46): 1-9.
14. Loreto ES, Scheid LA, Nogueira CW, Zeni G, Santurio JM, Alves SH. Candida dubliniensis: epidemiology and phenotypic methods for identification. *Mycopathologia*. 2010;169: 431-443.
15. Martins MD, Lozano-Chiu M, Rex JH. Point prevalence of oropharyngeal carriage of fluconazole-resistant Candida in human immunodeficiency virus-infected patients. *Clin Infec Dis*.1997;25:843-846.
16. Melo NR, Taguchi H, Jorge J, Pedro RJ, Almeida OP, Fukushima K et al. Oral Candida flora from Brazilian human immunodeficiency virus-infected patients in the highly active antiretroviral therapy era. *Mem Inst Oswaldo Cruz* .2004;99(4): 425-431.
17. Oliveira RB, Atobe JH, Souza SA, de Castro Lima Santos DW. Epidemiology of invasive fungal infections in patients with acquired immunodeficiency syndrome at a reference hospital for infectious diseases in Brazil. *Mycopathologia*. 2014;178(1-2):71-78.
18. Patton LL. Oropharyngeal candidiasis in HIV-infected patients: a forgotten problem? *J Invasive Fungal Infect*.2008;2(3): 82-88.
19. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20:133-163.
20. Ribeiro ALR, Menezes TOA, Alves-Junior SM, Menezes SAF, Marques-da-Silva SH, Vallinoto ACR. Oral carriage of Candida species in HIV-infected patients during highly active antiretroviral therapy (HAART) in Belém, Brazil. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2015; 120(1):29-33.
21. Sánchez-Vargas LO, Ortiz-Lopez NG, Villar M, Moragues, MD, Aguirre JM, Cashat-Cruz M et al. Point prevalence, microbiology and antifungal suceptibility patterns of oral Candida isolates colonizing or infecting Mexican HIV/AIDS patients and healthy persons. *Rev Iberoam Micol*. 2005; 22:83-92.
22. Samaranayake Y, Samaranayake L, Wu P, So M. The antifungal effect of lactoferrin and lysozyme on Candida krusei and Candida albicans. *APMIS*. 2009;105:875-883.
23. Schmidt-Westhausen AM, Bendick C, Reichardt PA, Samaranayake LP. Oral candidosis and associated Candida species in HIV-infected Cambodians exposed to antimycotics. *Mycoses*.2004;47:435-441.
24. Sobel JD, Ohmit SE, Schuman P, Klein RS, Mayer K, Duerr A et al. Epidemiology Research Study (HERS) Group. The evolution of Candida species and fluconazole susceptibility among oral and vaginal isolates recovered from human immunodeficiency virus (HIV)-seropositive and at-risk HIV-seronegative women. *J Infect Dis*.2001;183:286-293.
25. Traeder C, Kowoll S, Arastéh K. Candida infection in HIV patients 1985-2007. *Mycoses*.2008;52 (suppl. 2):58-61.
26. Wingeter MA, Guilhermetti E, Shinobu CS, Takaki I, Svidzinski TE. Identificação microbiológica e sensibilidade in vitro de Candida isoladas da cavidade oral de individuos HIV positivos. *Rev Soc Bras Med Trop*.2007;40(3):272-276.
27. Zhang L, Huang Y, Liu Z, Liu W, Qin Q, Tao R. Dynamics of T-cell subsets and their relationship with oral and systemic opportunistic Infections in HIV/AIDS patients during the first year of HAART in Guangxi, China. *J Med Virol*. 2015;87:1158–1167.

Neiva Aparecida Grazziotin

Endereço para correspondência – Av: Sete de Setembro, nº 1621, Bairro: Centro, CEP: 99700-000, Cidade: Erechim, RS, Brasil.

E-mail: neivagra@uri.com.br

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/7238948147045228>

Leticia Jacobi Danielli – letidanielli@yahoo.com.br

Clarice Teresinha Maroso – claricemaroso@hotmail.com

Vanderlei Augusto Madalozzo – vande@via-rs.net

Mariluce da Rocha Jaskulski – mrj@uri.com.br

Enviado em 12 de março de 2015.

Aceito em 29 de setembro de 2015.