

Susceptibilidade a antifúngicos e produção de enzimas por leveduras do (*levaduras del*) gênero *Candida* isoladas (*aisladas*) de pacientes com HIV/AIDS

Susceptibility to antifungal and enzyme production by Candida yeasts isolated from HIV/AIDS patients

Áurea Regina Pupulin

Doutora, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Brasil

Paula Galdino Carvalho, Mestre, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Brasil

Celso Vataru Nakamura, PhD, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Brasil

Acceda a este artículo en
siicsalud

Código Respuesta Rápida
(Quick Response Code, QR)



www.siicsalud.com/dato/arsiic.php/125335

Segunda edición ampliada y corregida,
www.siicsalud.com: 24/1/2013

Enviar correspondencia a: Áurea Regina
Pupulin, Av. Colombo 5790, 87020-900,
Maringá, Brasil
artpupulin@uem.br



Especialidades médicas relacionadas,
producción bibliográfica y referencias
profesionales de los autores.

Abstract

Thrush or Candida albicans is one of the most common fungal infections among patients with human immunodeficiency virus. The isolation, identification and evaluation of susceptibility and virulence factors of Candida yeasts from HIV/AIDS patients are provided. Samples, collected from different anatomical sites (mouth, gastrointestinal tract and vagina) of 100 patients, were grown in Sabouraud agar and identified by culture in differential medium CHROMagar Candida and by polymerase chain reaction (PCR) technique. The in vitro susceptibility test for antifungal fluconazole, amphotericin B and nystatin were determined by broth micro-dilution technique. Infectivity was assessed through the production of phospholipases and hemolysins. Candida albicans was the most prevalent among the 45 isolated yeasts, followed by C. glabrata, C. parapsilosis, C. tropicalis and C. krusei. Forty-three (95%) samples were tested for susceptibility in which minimum inhibitory concentration was determined. All isolates were susceptible to amphotericin B and nystatin, whereas 60.6% were susceptible to fluconazole; 6.9% were susceptible-dose dependent and 32.5% were resistant to fluconazole. The species C. glabrata and C. tropicalis showed higher CIMs for fluconazole than those found for C. albicans. Furthermore, 62% of samples produced phospholipase and 87% produced hemolytic activity.

Key words: *Candida* sp, HIV/AIDS, antifungal

Resumen

A candidíase é a (*constituye la*) infecção fúngica mais frequente entre os pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana. Este estudo objetivou o isolamento (*el aislamiento*), identificação, avaliação do (*evaluación del*) perfil de susceptibilidade e fatores de virulência de leveduras do gênero *Candida* provenientes de pacientes HIV/AIDS. As amostras foram coletadas (*Las muestras se recolectaron*) de 100 pacientes em diferentes sítios anatômicos (*boca, trato gastrointestinal e vaginal*), cultivadas em meio (*en medio*) ágar Sabouraud, e identificadas através da cultura em meio (*mediante cultivo en medio*) diferencial CHROMagar *Candida* e pela técnica da reação em cadeia da (*y por la técnica de reacción en cadena de la*) polimerase (PCR). O teste de (*La prueba de*) susceptibilidade *in vitro* aos (*a los*) antifúngicos fluconazol, anfotericina B e nistatina foram determinados através da técnica de microdiluição em caldo (*en caldo*). A infectividade foi avaliada através da (*se validó por medio de la*) produção de fosfolipases e hemolisinas. Do total (*De un total*) de 45 leveduras isoladas, houve maior (*hubo mayor*) prevalência de *C. albicans*, seguida por *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei*. Foram submetidas ao (*Se sometieron a la*) teste de susceptibilidade 43 (95%) das amostras, onde a (*en la que la*) concentração inibitória mínima foi determinada. Todos os isolados foram sensíveis a (*Todos los aislamientos eran sensibles a*) anfotericina B e a nistatina, enquanto 60.6% foram sensíveis ao fluconazol, 6.9% sensíveis dose-dependente e 32.5% apresentaram resistência ao (*presentaron resistencia al*) fluconazol. As espécies *C. glabrata* e *C. tropicalis* apresentaram CIMs maior para o fluconazol do que os encontrados para *C. albicans*. Apresentou produção de fosfolipase 62% das amostras e atividade hemolítica 87%.

Palavras chave: *Candida* sp, HIV/AIDS, antifúngicos

Introdução

Aproximadamente 34 milhões de indivíduos estão infectados pelo (*están infectados por el*) vírus da imunodeficiência humana (HIV) no mundo.¹ De 1980 a junho de 2010, foram notificados no Brasil 492 581 casos de pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), sendo identificados 115 598 casos na Região Sul.² A epidemia de AIDS é um dos (*constituye uno de los*) desafios mais importantes da saúde pública global sendo a candidíase, uma das doenças (*una de las enfermedades*) secundárias indicativas de AIDS.³

A candidíase orofaríngea é a infecção fúngica oportunista mais frequente em indivíduos portadores de HIV.^{4,5} Cerca de 90% destes indivíduos apresentam pelo menos

um (*tienen al menos un*) episódio de candidíase orofaríngea durante o curso da AIDS, e muitas vezes tem (*y muchas veces presentan*) episódios recorrentes.⁶ Da mesma forma, a candidíase vaginal pode persistir em sucessivos episódios de infecção,⁷ e mulheres portadoras de HIV apresentam maiores taxas (*presentan tasas más elevadas*) de colonização vaginal por *Candida*, muitas vezes *Candida* não *albicans*, do que (*que*) mulheres HIV-.⁸ As infecções gastrointestinais também estão associadas com a sintomatologia dos pacientes com HIV/AIDS, sendo que dentre os (*y entre los*) principais agentes etiológicos estão incluídas espécies do gênero *Candida*.⁹

Estudos epidemiológicos recentes revelaram a substituição das espécies de *Candida* mais susceptíveis a anti-

fúngicos, como *C. albicans*, por espécies menos suscetíveis, como *C. glabrata* e *C. krusei*.¹⁰ A correta identificação do agente etiológico pode indicar a melhor opção para o (la mejor opción para el) tratamento desses pacientes, já que algumas (ya que algunas) espécies respondem de forma diferente aos agentes antifúngicos.¹¹ A anfotericina B, para o uso endovenoso, está restrita aos casos mais (está restringida a los casos más) graves, devido às reações (debido a sus reacciones) adversas frequentes, enquanto a (mientras que) nistatina é utilizada topicamente, pois é (ya que es) demasiadamente tóxica. A utilização de agentes antifúngicos azólicos foi uma das alternativas encontrada para tratar infecções fúngicas, principalmente o fluconazol, devido à sua boa absorção, baixa toxicidade e (debido a su buena absorción, baja toxicidad y) disponibilidade para o uso oral e endovenoso.^{12,13} Entretanto, uma sub-população de pacientes desenvolvem resistência clínica aos agentes antifúngicos convencionais, possivelmente devido a episódios recorrentes de candidíase de mucosa e exposição freqüente ao agente antifúngico.¹⁴

Os fatores de virulência do (*Los factores de virulencia del*) gênero *Candida* contribuem no (*contribuyen al*) estabelecimento de infecções por microrganismos e principalmente estão relacionadas com o processo invasivo,¹⁵ sendo que a produção de enzimas extracelulares auxilia o processo infeccioso.¹⁶ A alta produção de fosfolipase está correlacionada com um aumento na (*con incremento en la*) capacidade de aderência e a maior taxa (*y la mayor tasa*) de mortalidade em modelos animais,¹⁷ enquanto a capacidade de um (*mientras que la capacidad de un*) organismo patogênico adquirir ferro do (*hierro del*) mamífero hospedeiro, pela produção de hemolisinas, possui grande (*tiene una gran*) importância no estabelecimento da infecção.^{18,19}

O presente trabalho teve (*El presente trabajo tuvo*) como objetivo isolar e identificar amostras de leveduras do (*aislar e identificar muestras de levaduras del*) gênero *Candida* em diferentes sítios anatômicos de pacientes HIV, determinar o perfil de sensibilidade aos antifúngicos nistatina, anfotericina B e fluconazol e avaliar os fatores (*y evaluar los factores*) de virulência apresentados (*actividade hemolítica e de fosfolipase*).

Materiais e métodos

Pacientes

As amostras foram coletadas (*Se recolectaron las muestras*) de pacientes adultos portadores de HIV, na cidade Maringá, estado do Paraná. Todos os pacientes participaram voluntariamente do estudo, através da assinatura do termo de consentimento aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual de Maringá.

Cultura

Fezes (*Materia fecal*), secreção vaginal e raspado de mucosa oral coletados foram diluídos em (*recolectados se diluyeron en*) solução salina 0.9% estéril e semeados em (*sembrados en*) ágar Sabouraud dextrose com 0.02% de cloranfenicol. As placas foram incubadas a (*Las placas se incubaron a*) 37°C por 48 h.²⁰ As leveduras isoladas foram estocadas em (*Las levaduras aisladas fueron almacenadas en*) água destilada estéril entre 24°C a 28°C.²¹

Identificação

Os isolados foram cultivados em meio (*Los aislados se cultivaron en medio*) seletivo diferencial CHROMágar *Candida* (Difco do Brasil) para a identificação presuntiva das amostras, fornecendo uma coloração diferenciada

conforme as espécies em desenvolvimento (*para la identificación presuntiva de las muestras, y mostró una coloración diferenciada según las especies en desarrollo*).²²

A identificação das espécies foi realizada através da reação em cadeia da polimerase (PCR). Primeiramente, o DNA genômico das células leveduriformes foi extraído utilizando o tampão de lise (*se extrajo el tapón de lisis*) TENTS (10 mM Tris HCl pH 8.0 contendo 2% v/v Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl e 1 mM EDTA), 2 pérolas de vidro (*2 perlas de vidrio*) (2 mm) e fenol saturado, a suspensão foi homogeneizada em agitador por (*se homogeneizó la suspensión en agitador durante*) 3 min. A fase aquosa obtida foi desproteïnizada com (*La fase acuosa obtenida fue desproteïnizada con*) fenol-clorofórmio álcool isoamílico (25:24:1 v/v). O DNA presente na fase aquosa foi precipitado com (*en la fase acuosa fue precipitado con*) etanol absoluto por 2 h, lavado com etanol 70% (v/v), seco e ressuspenso com (*y resuspendido con*) água deionizada estéril. O DNA foi tratado com 1 µl RNase A (1 mg/ml) a 37°C por 1 h. Para a identificação dos isolados de *Candida* sp foram utilizados os seguintes iniciadores (*los siguientes iniciadores*): oligonucleotídeo direto universal (CTSf), oligonucleotídeo reverso (CTSR), capazes de amplificar o final da extremidade 3' do DNA ribossomal (rDNA) 5.8 S, a extremidade 5' inicial do rDNA 28 S e a região espaçadora interna (*y la región espaciadora interna*). Para realização do segundo ciclo de amplificação foram utilizados oligonucleotídeos espécie-específicos que derivam da região (*derivan de la región*) ITS2 *C. albicans* (CADET), *C. parapsilosis* (CPDET), *C. tropicalis* (CTDET) e *C. glabrata* (CGDET).

Teste de susceptibilidade in vitro aos agentes antifúngicos

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada através da técnica de microdiluição em caldo.²³ Em microplacas de 96 poços, foi dispensado (*se colocó*) 100 µl de meio RPMI 1640 pH 7.2 acrescido de (*con el agregado de*) tampão MOPS. As drogas testes foram diluídas seriamente (*Las drogas de prueba se diluyeron seriadamente*) (1:2) para obtenção das (*obtener las*) concentrações de 17 a 0.03 µg/ml para anfotericina B, 64 a 0.125 µg/ml para nistatina, e 256 a 0.5 µg/ml para fluconazol. Posteriormente foram semeadas 100 µl da suspensão de leveduras padronizadas para obter uma concentração fúngica final de 1-5 x 10³ UFC/ml. As microplacas foram incubadas em estufa de 37°C por 48 h em uma câmara úmida (*en una cámara húmeda*). A determinação da CIM foi obtida através da observação da ausência de crescimento na menor concentração da droga capaz de inibir o crescimento microbiano *in vitro* e através da densidade ótica determinada em espectrofotômetro a 492 nm.

Determinação da atividade de fosfolipase e hemolítica

As amostras foram ativadas (*Las muestras se activaron*) por 24 h a 37°C em caldo Sabouraud e uma suspensão de 1.0 x 10⁶ UFC/ml foi padronizada. Um volume de 5 µl da suspensão foi semeada sobre a superfície de ágar ovo 4% (meio mínimo pH 4.5 suplementado com emulsão de gema de ovo, NaCl 20 g/l e CaCl₂ H₂O 1 g/l) para fosfolipase e um volume de 10 µl sobre a superfície de agar sangue 7% (meio mínimo pH 4.5 suplementado com sangue de carneiro). As placas de Petri foram incubadas a 37°C por 96 h. As amostras que apresentaram halo de precipitação ao redor da colônia foram consideradas (*Las muestras que presentaron halo de precipitación alrede-*

dor de la colônia se consideraron) positivas para atividade fosfolipase.⁶ Para atividade hemolítica as amostras que apresentaram halo de degradação translúcido ao redor da colônia foram consideradas β -hemolíticas (hemólise semelhante ao controle positivo) e as que apresentaram halo esverdeado (*y aquellas con halo verdoso*) foram consideradas alfa-hemolítico.

Resultados

De um total de 61 pacientes HIV, foram obtidas 100 amostras biológicas provenientes de fezes (*materia fecal*) (26), secreção vaginal (17) e de mucosa oral (57). Dentre as amostras, 45 apresentaram culturas (*presentaron cultivos*) positivas para leveduras e foram isoladas de 29 pacientes em diferentes sítios anatômicos, sendo 41.2 % da vagina (7/17), 43.9% da mucosa oral (25/57) e 50.0 % do trato intestinal (13/26) (Tabela 1). Em 27 pacientes, foram coletadas amostras biológicas de pelo menos dois sítios (*de al menos dos sitios*) anatômicos distintos, obtendo cultura positiva nos dois locais em (*en los dos puntos en*) 13 pacientes (48.1%).

No total, 43 amostras foram submetidas ao cultivo em (*se sometieron al cultivo en*) CHROMágar *Candida* e 36 amostras (18 de secreção oral, 7 de secreção vaginal e 11 de fezes) foram identificadas pelo Seminested PCR. Nove amostras não foram identificadas. A espécie *C. albicans* foi identificada em 25 amostras (69.4 %) e *C. não albicans* em 11 (30.6 %), sendo as espécies: 4 *C. glabrata*, 3 *C. parapsilosis*, 2 *C. tropicalis*, 1 *C. krusei* e 1 *Candida* sp (Tabela 2).

De 45 leveduras isoladas, 43 (95%) foram submetidas ao teste de susceptibilidade a dois antifúngicos (*a dos antifúngicos*) polilênicos (anfotericina B e nistatina) e fluconazol, através da determinação da concentração inibitória mínima. Aproximadamente 25.6% (11/43) dos isolados apresentaram CIM para anfotericina B de 0.28 $\mu\text{g/ml}$, 46.5% (20/43) CIM de 1 $\mu\text{g/ml}$ para nistatina, e 25.6% (11/43) CIM de 4 $\mu\text{g/ml}$ para fluconazol. Considerando que fungo que apresentar CIM > 2 $\mu\text{g/ml}$ é considerado resistente a (*se considera resistente a la*) anfotericina B, todas as amostras foram sensíveis. Todas as amostras foram sensíveis a nistatina, já que apresentaram (*ya que presentaron*) concentração inibitória mínima inferior a 4 $\mu\text{g/ml}$. Amostras que apresentaram CIM < 8 $\mu\text{g/ml}$ foram consideradas sensíveis ao fluconazol, representando 60.6% (26/43) das amostras; CIM entre 16 e 32 $\mu\text{g/ml}$ foram consideradas sensíveis dose-dependente (SDD), representando 6.9% (3/43); e CIM > 64 $\mu\text{g/ml}$ foram consideradas resistentes, representando 32.5% (14/43) das amostras (Tabela 3).

A produção de fosfolipase, foi verificada em 62.2% (28/45) das amostras, com halo de precipitação de 1.0 a 1.9 mm. A porcentagem de amostras que apresentou beta-hemólise foi de 86.6% (39/45) e a atividade hemolítica das amostras variou (*de las muestras varió*) entre 1.1 a 4 mm de beta-hemólise.

Discussão

Apesar dos avanços realizados no (*de los avances logrados en el*) tratamento de doenças oportunistas, as infecções fúngicas continuam sendo uma importante causa de mortalidade entre pacientes imunocomprometidos, sendo a candidíase uma das doenças fúngicas mais comuns (*una de las enfermedades fúngicas más comunes*) associadas com a infecção pelo HIV.⁸

O Seminested PCR é um método específico e sensível para o diagnóstico

da candidemia e para a identificação de espécies clinicamente importantes de *Candida*. Através deste método foi (*Con este método ha sido*) possível identificar 36 amostras obtidas de (*muestras obtenidas de*) pacientes portadores de HIV/AIDS, verificando uma predominância de *C. albicans* (69.4%). *Candida* não *albicans* também foram identificadas em 10 amostras, representadas por *C. glabrata* (11.1%), *C. parapsilosis* (8.3%), *C. tropicalis* (5.6%), *C. krusei* (2.8%). Uma amostra foi identificada apenas como *Candida* sp (2.8%).

Em estudo realizado por Sánchez-Vargas *et al.*²⁴ com leveduras isoladas da cavidade oral de 111 pacientes mexicanos infectados pelo HIV e 201 não infectados, a *C. albicans* foi a espécie mais isolada (83.5%) e espécies não *albicans* (*C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*) foram isoladas de 16.5% pacientes colonizados. Favalessa *et al.*²⁵ recuperaram de 102 pacientes, 105 isolados de *Candida* sp provenientes de distintas amostras clínicas de pacientes infectados pelo HIV, sendo *C. albicans* o isolado mais freqüente (78.1%). A maior parte dos isolados foram provenientes de secreção de orofaringe (50.5%) e raspado bucal (27.6%).

De um total de 57 amostras obtidas de secreção oral, 43.9% apresentaram cultura positiva para leveduras do (*presentaron cultivo positivo para levaduras del*) gênero *Candida*, lembrando que (*resaltando que*) cerca de 90% dos pacientes HIV sofrem de (*presentan*) candidíase orofaríngea ou esofágica em algum estágio da doença (*en alguna etapa de la enfermedad*). Da mesma forma, a candidíase vaginal pode persistir em sucessivos episódios de infecção, sendo a segunda causa mais comum de infecção vaginal, e neste estudo (*y en este estudio*), 41.2% das amostras de secreção vaginal foram positivas para candidíase. Por fim (*Finalmente*), as infecções gastrointestinais também estão associadas com a sintomatologia dos pacientes com HIV/AIDS, causando episódios de diarreia e

Tabela 1. Distribuição e freqüência de leveduras isoladas de secreção vaginal, oral e fezes de pacientes HIV/AIDS.

Material biológico	Cultura +	Cultura -	Total	% positividade
Secreção vaginal	7	10	17	41.2
Raspado oral	25	32	57	43.9
Fezes	13	13	26	50.0
Total	45	55	100	45.0

Tabela 2. Identificação de leveduras isoladas de pacientes HIV/AIDS através do Seminested PCR.

Material biológico	% <i>Candida albicans</i>	% <i>Candida</i> não <i>albicans</i>	Total
Secreção vaginal	3 (42.9%)	4 (57.1%)	7
Raspado oral	14 (77.8%)	4 (22.2%)	18
Fezes	8 (72.7%)	3 (27.3%)	11
Total	25 (69.4%)	11 (30.6%)	36

Tabela 3. Concentração inibitória mínima em $\mu\text{g/ml}$ de antifúngicos sobre leveduras de isolados clínicos, e perfil de sensibilidade e resistência.

Antifúngico	CIM ($\mu\text{g/ml}$)				Susceptibilidade (%)		
	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida</i> spp	S	SDD	R
Anfotericina B	0.3-0.56	0.6-0.56	0.28	0.6-1.06	100	-	-
Fluconazol	0.5-32	0.5 - > 128	> 128	0.5 - > 128	60.6	6.9	32.5
Nistatina	0.5-4	2	2	1-4	100	-	-

R: resistente; S: susceptível; SDD: susceptibilidade dose dependente.

debilitando ainda mais a saúde do (*más aún la salud del*) paciente, neste caso, 50% das amostras de fezes apresentaram a presença de leveduras.

O tratamento da candidíase é geralmente baseado em dois (*en general se basa en dos*) grupos de drogas: os azóis e (*los azoles y*) agentes poliênicos. O uso tópico do antifúngico nistatina costuma ser utilizado no início do (*suele ser utilizado al comienzo del*) tratamento para candidíase oral, entretanto a maioria dos pacientes sofre mais de um episódio de candidíase oral e estes são tratados com (*y éstos se tratan con*) fluconazol.¹⁸ A introdução de agentes como o fluconazol permite um tratamento com menor toxicidade que a anfotericina B, podendo ser administrado oralmente, possuindo poucos efeitos colaterais além ser (*tienen pocos efectos colaterales además de ser*) eficaz contra a maioria dos patógenos leveduriformes, incluindo a *C. albicans*. Entretanto seu uso constante têm sido associado a um (*Sin embargo, su uso constante se asoció con el*) aumento da resistência de *Candida* sp à natureza fungistática dos azóis, o que têm promovido a procura para novos (*lo que ha estimulado la búsqueda de nuevos*) agentes fungicidas.

Através do teste de susceptibilidade foi possível determinar a concentração inibitória mínima de tais (*de estos*) antifúngicos que foram capazes de inibir o (*fueron capaces de inhibir el*) crescimento leveduriforme. Das 43 amostras submetidas ao teste de susceptibilidade a antifúngicos, todas foram sensíveis a nistatina, apenas 6.9% dos isolados (*de los aislados*) apresentaram resistência à anfotericina B, enquanto a maioria das amostras 60.6% foram sensíveis ao fluconazol, 6.9% sensíveis dose-dependente e 32.5% resistentes ao fluconazol. A categoria de suscetível-dose-dependente (MIC, 16-32 µg/ml) foi estabelecida em resposta aos (*se estableció como respuesta a los*) isolados com susceptibilidade intermediária, ou seja, respondem às doses mais elevadas (*es decir, responden a dosis más elevadas*) de fluconazol. A resistência ao fluconazol foi encontrada na maioria das amostras de *Candida* não *albicans*, sendo que tal resistência pode ser relacionada a diversos fatores, como o uso prévio (*como el uso previo*) de antifúngicos, ou a característica da espécie, como por exemplo, a espécie *C. krusei* que possui resistência inerente ao (*presenta resistencia inherente al*) fluconazol.

A *Candida tropicalis* normalmente permanece suscetível a polienos e antifúngicos azóis, no entanto, os isolados clínicos resistentes a azólicos, em particular ao fluconazol, são cada vez mais relatados (*se informan cada vez más*).²⁶ Em estudo por Bizerra et al.,²⁷ foi mostrado uma elevada resistência ao fluconazol e anfotericina B por *C. tropicalis*. Outro estudo, realizado por Negri et al.²⁸ com sete isolados (*con siete aislamientos*) de *C. tropicalis* de culturas de urina, sangue e (*sangre y*) cateter venoso central, demonstrou que todos os isolados foram capazes de formar biofilme e expressar atividade hemolítica total, sendo sensíveis ao fluconazol e anfotericina B. Apenas um destes isolados produziu fosfolipase.

A *C. glabrata* tem emergido como um (*ha surgido como un*) importante e potencialmente resistente patógeno fúngico oportunista, sendo o segundo ou terceiro (*y constituye el segundo o tercer*) principal agente de candidíase em todos os locais, incluindo a (*incluyendo la*) mucosa orofaríngea e esôfagica. Sua resistência à drogas antifúngicas permite seu crescimento excessivo em relação a (*respecto a*) outras espécies sensíveis e podem contribuir para o aparecimento de (*pueden contribuir con el surgimiento de*) infecções por *C. glabrata* em populações cronicamente imunocomprometidas.²⁹ Dessa for-

ma o aumento da proporção de fungemias devido a *C. glabrata* tem implicações importantes no tratamento a ser realizado.³⁰

Candida krusei tem-se mostrado como um (*se mostró como un*) patógeno hospitalar ocasional, particularmente, em pacientes portadores de doenças hematológicas malignas e/ou submetidos a (*o sometidos a*) transplante de medula óssea.³¹ Segundo (*Según*) Hachem et al.,³² os pacientes que tinham (*los pacientes con*) doenças hematológicas possuíam maior risco (*presentaban un mayor riesgo*) de candidemia causada por *Candida* não *albicans*, sendo as espécies *C. glabrata* e *C. krusei* as mais comuns. Tal constatação foi associada com o uso (*con el uso*) prévio de fluconazol como antifúngico profilático. Além da (*Además de la*) resistência intrínseca ao fluconazol, a *C. krusei* apresenta claramente uma diminuição da susceptibilidade à anfotericina B e flucitosina. Existe relato da (*Existe un informe de la*) emergência de *C. krusei* com menor susceptibilidade a caspofungina, como potencial causa de candidíase orofaríngea.³³ Portanto, testes (*Por lo tanto, pruebas*) de suscetibilidade desta espécie a estes agentes antifúngicos podem ser justificados para auxiliar na escolha do (*se justifican para auxiliar la elección del*) tratamento.

O aumento da resistência aos antifúngicos e a pouca (*y la escasa*) disponibilidade de novos produtos desenvolvidos pela (*desarrollados por la*) indústria farmacêutica têm motivado vários estudos sobre a (*han motivado varios estudios respecto a la*) atividade de novos produtos em fungos (*en hongos*) agentes de infecções humanas, principalmente em pacientes imunodeprimidos.²

Os fungos, incluindo o gênero *Candida*, são capazes (*son capaces*) de responder rapidamente às mudanças (*a los cambios*) ambientais, detectando, por exemplo, a queda da imunidade do (*la reducción de la inmunidad del*) paciente e tornando-se (*y volviéndose*) patogênicos. Os fatores de virulência (*Los factores de virulencia*), como a produção de enzimas extracelulares, facilitam o estabelecimento da doença, já que, (*facilitan el establecimiento de la enfermedad, ya que*) a habilidade de secretar enzimas que podem quebrar barreiras ao (*que pueden romper barreras al*) crescimento do fungo, facilitando a invasão de hifas (*la invasión de hifas*), e inativar moléculas de defesa, contribuem muito para o processo infeccioso.⁷

A fosfolipase é uma enzima que degrada fosfolípideos, comuns em todas as formas de vida e estão (*comunes en todas las formas de vida y están*) freqüentemente associadas às (*con las*) membranas celulares, podendo tomar parte do processo de invasão de *C. albicans* nos tecidos (*en los tejidos*). A determinação da produção enzimática de amostras de *C. albicans* e outras espécies, isoladas de diversas condições e de diferentes sítios anatómicos, foi observada por vários autores,^{17,19,20} que apontaram variações (*que señalaron variaciones*) de atividade enzimática entre 50% a 100% para fosfolipase.

Neste trabalho, a maioria das (*En este trabajo, la mayoría de las*) amostras apresentou produção de fosfolipase 62.2% (28/45). Sendo que entre 26 espécies identificadas como *C. albicans*, 21 (80.8%) apresentaram produção de fosfolipase, enquanto que de 10 espécies de *Candida* não *albicans* apenas 1 (10%) apresentou produção de fosfolipase, e entre 9 amostras identificadas como *Candida* sp 4 (44.4%) produziram fosfolipase. Embora tenha sido demonstrado (*Aunque se haya demostrado*) que espécies não *albicans* podem secretar (*pueden secretar*) fosfolipase, é importante ressaltar que estas espécies secretam quantidades significativamente menores de fosfolipase em relação a *C. albicans*.

A capacidade dos microrganismos patogênicos para adquirir ferro elementar tem demonstrado ser (*hierro elemental ha demostrado ser*) de crucial importância para a sua sobrevivência e a capacidade de estabelecer infecção dentro do hospedeiro. Uma vez que não existe nenhum ferro (*Una vez que no existe hierro*) essencialmente livre no hospedeiro humano a maioria dos patógenos comumente o adquire indiretamente a partir do (*lo adquiere indirectamente a partir del*) ferro disponível contido em compostos como a (*contenido en compuestos como la*) hemoglobina. Para isso, no entanto, (*Para eso, sin embargo*) o agente deve ser equipado com um mecanismo que destrói os agrupamentos heme e o (*que destruye los grupos hemo y le*) possibilita extrair o ferro elementar. As enzimas mediadoras de tal atividade são amplamente classificadas (*se clasifican ampliamente*) como hemolisinas.¹³

A produção desse (*La producción de ese*) fator hemolítico pode ser observada pelo crescimento da *Candida* em meio ágar sangue, enriquecido com glicose, e os termos (*y los términos*) alfa e beta hemólise denotam hemólise completa e incompleta do meio. Luo *et al.*³⁴ demonstraram que diversas espécies de *Candida* não *albicans* obtidas de fontes clínicas exibiram uma variável habilidade de produzir ambos os tipos de atividade hemolítica. França *et al.*³⁵ analisaram 28 isolados de *C. tropicalis* obtidos de diferentes amostras clínicas, como sangue, urina e secreção traqueal, sendo que todos os isolados apresentaram capacidade de promover hemólise *in vitro*. Neste trabalho, 86.6% (39/45) das amostras isoladas apresentaram beta-hemólise, sendo que os termos alfa-hemólise e beta-hemólise foram utilizados como termos descritivos para indicar incompleta e completa hemólise,

respectivamente, associadas às linhagens de *Candida* testadas. Entre 26 espécies identificadas como *C. albicans*, 25 (96.2%) apresentaram beta-hemólise, entre 10 espécies de *Candida* não *albicans* 5 (50%) apresentaram beta-hemólise, e entre 9 amostras identificadas como *Candida* sp 7 (77.7%) apresentaram beta-hemólise.

Estudos relatam que a introdução da terapia antiretroviral reduz a prevalência da maioria das (*reduce la prevalencia de la mayoría de las*) infecções oportunistas, incluindo a candidíase oral, portanto, a recuperação da função (*sin embargo, la recuperación de la función*) imune, associada à terapia antiretroviral é um importante fator (*constituye un factor importante*) para diminuir a incidência de candidíases.

Conclusão

Foram isoladas 45 amostras de leveduras de secreção vaginal, oral e fezes, verificando uma predominância de *C. albicans* (25 amostras). *Candida* não *albicans* também foram isoladas e identificadas através de snPCR em 11 amostras, representadas por *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei*. Considerando o perfil geral de susceptibilidade a antifúngicos utilizados na terapêutica, das 43 amostras, todas foram sensíveis a anfotericina B e a nistatina, enquanto 60.6% foram sensíveis ao fluconazol, 6.9% sensíveis dose-dependente e 32.5% apresentaram resistência ao fluconazol. Sendo que as espécies *C. glabrata* e *C. tropicalis* apresentaram valores mais elevados de CIMs para o fluconazol do que os encontrados para *C. albicans*. Nos testes para determinação de enzimas extracelulares, as quais são importantes na virulência das leveduras, a maioria das amostras apresentou produção de fosfolipase (62.2%) e atividade hemolítica (86.6%).

Copyright © Sociedad Iberoamericana de Información Científica (SIIC), 2014
www.siic.salud.com

Los autores no manifiestan conflictos de interés.

Lista de abreviaturas y siglas

HIV, virus da imunodeficiência humana; PCR, reação em cadeia da polimerase; CTSF (em inglês), oligonucleotídeo direto universal; CTSR (em inglês), oligonucleotídeo reverso; rDNA, DNA ribossomal; CIM, concentração inibitória mínima; SDD, sensíveis dose-dependente; R, resistente; S, susceptível.

Cómo citar este artículo/Como citar este artigo

Pupulin ÁR, Carvalho PG, Nakamura CV. Susceptibilidade a antifúngicos e produção de enzimas por leveduras do (leveduras del) gênero *Candida* isoladas (aisladas) de pacientes com HIV/AIDS. *Salud i Ciencia* 20(5):471-6, May 2014.

How to cite this article

Pupulin ÁR, Carvalho PG, Nakamura CV. Susceptibility to antifungal and enzyme production by *Candida* yeasts isolated from HIV/AIDS patients. *Salud i Ciencia* 20(5):471-6, May 2014.

Autoevaluación del artículo

La candidíase es la infección fúngica más frecuente en los pacientes portadores de VIH.

¿Cuál es la micosis oportunista más frecuente en los pacientes VIH positivos?

A, La candidíase ocular; B, La candidíase orofaríngea; C, La candidíase broncopulmonar; D, La candidíase dentaria.

Verifique su respuesta en www.siic.salud.com/dato/evaluaciones.php/125335

Bibliografía

- UNAIDS REPORT ON THE GLOBAL AIDS EPIDEMIC; 2010 Disponível em http://www.unaids.org/globalreport/documents/20101123_GlobalReport_full_en.pdf
- Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico AIDS-DST. Brasília, DF: Ministério da Saúde; 2010. Disponível em <http://www.aids.gov.br>
- Tapia C, Gonzales P, Pereira A, Pérez J, Noriega

- LM, Palavecino ES. Susceptibilidad antifúngica de *Candida albicans* recuperadas de pacientes com SIDA y candidíase orofaríngea y esofágica. *Revista Médica de Chile* 131:515-519, 2003.
- WHO. Investing in a Comprehensive Health Sector Response to AIDS/HIV. Jan. 2004-Dec. 2005. http://www.who.int/3by5/en/HIV_AIDSplan.pdf
- Calvet HM, Yeaman MR, Filler SG. Reversible fluconazole resistance in *Candida albicans*: a potential

- in vitro* model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41:535-539, 1997.
- Samaranayake LP. Oral mycoses in human immunodeficiency virus infection: a review. *Oral surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* 73:171-180, 1992.
- Reedding SWMA, Pfaller SA, Messer JA, Smith J, Prows LL, Bradley AW, Fothergill MG. Variations in fluconazole susceptibility and DNA subtyping of multiple *Candida albicans* colonies from patients with

- AIDS and oral candidiasis suffering one or more episodes of infection. *Journal of Clinical Microbiology* 35:1761-1765, 1997.
8. Achkar JM, Fries BC. Candida Infections of the Genitourinary Tract. *Clinical Microbiology Reviews* 23:253-273, 2010.
 9. Same-Ekobo A, Lohoue J, Mbassi A. A clinical and biological study of parasitic and fungal diarrhea in immunosuppressed patients in urban suburban area of Yaounde. *Sante* 7:49-354, 1997.
 10. Pfaller MA, Diekema DJ. Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of *Candida*. *Clinical Microbiology and Infection* 10:11-23, 2004.
 11. Sanchez-Vargas IO, Ortiz-López NG, Villar M, Moragues MD, Aguirre JM, Cashat-Cruz M, Lopez-Ribot JL, Gaitán-Cepeda IA, Quindós G. Point prevalence, microbiology and antifungal susceptibility patterns of oral *Candida* isolates colonizing or infecting Mexican HIV/AIDS patients and healthy persons. *Revista Iberoamericana de Micología* 22:83-92, 2005.
 12. McGinnis MR, Rinaldil MG. Antifungal Drugs: Mechanisms of action, drug resistance, susceptibility testing, and assays of activity in biological fluids. In: Victor Lorian MD. *Antibiotics in laboratory medicine*. Washington D.C.: Willians & Wilkins; 1996.
 13. Schechter M, Rachid M. *Manual de HIV/AIDS*. Revinter, Rio de Janeiro; 2004.
 14. Vazquez JA. Management of oropharyngeal and esophageal candidiasis in patients with HIV infection. *Journal of HIV Therapy* 4:1-19, 2010.
 15. Singleton DR, Hazen KC. Differential surface localization and temperature-dependent expression of the *Candida albicans* CSH1 protein. *Microbiology* 150:285-292, 2004.
 16. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *TRENDS in Microbiology* 9:327-335, 2001.
 17. Ivanoska N. Phospholipases as a factor of pathogenicity in microorganisms. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 22:357-61, 2003.
 18. Weinberg ED. Iron and infection. *Microbiological Reviews* 42:45-66, 1978.
 19. Manns JM, Mosser DM, Buckley HR. Production of a hemolytic factor by *Candida albicans*. *Infection and Immunity* 62:5154-5156, 1994.
 20. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. *Manual Of Clinical Microbiology*. 6a ed., Washington DC: ASM Press; 1995.
 21. Marco F, Pfaller MA, Messer S, Jones RN. In vitro activity of Voriconazole and four other antifungal agents against 394 clinical isolates of *Candida* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42:161-163, 1998.
 22. Houang ET, Chu KC, Koehler AP, Cheng AF. Use of CHROMagar *Candida* for genital specimens in the diagnostic laboratory. *Journal of Clinical Pathology* 50:563-565, 1997.
 23. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Development of in vitro susceptibility testing criteria and quality control parameters. Approved guideline M27-A. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, Pennsylvania, EE.UU.; 2005.
 24. Sánchez-Vargas LO, Ortiz-López NG, Villar M, Moragues MD, Aguirre JM, Cashat-Cruz M, Lopez-Ribot JL, Gaitán-Cepeda LA, Quindós G. Oral *Candida* isolates colonizing or infecting human immunodeficiency virus infected and healthy persons in Mexico *J Clin Microbiol* 43(8):4159-62, 2005.
 25. Favalessa OC, Martins Mdos A, Hahn RC. Mycological aspects and susceptibility in vitro the yeast of the genus *Candida* from HIV-positive patients in the State of Mato Grosso. *Rev Soc Bras Med Trop* 43(6):673-7, 2010.
 26. Vandeputte P, Larcher G, Bergès T, Renier G, Chabasse D, Bouchara JP. Mechanisms of azole resistance in a clinical isolate of *Candida tropicalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 49(11):4608-15, 2005.
 27. Bizerra FC, Nakamura CV, de Poersch C, Estivallet Svidzinski TI, Borsato Quesada RM, Goldenberg S, Krieger MA, Yamada-Ogatta SF. Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance. *FEMS Yeast Res* 8(3):442-50, 2008.
 28. Negri M, Martins M, Henriques M, Svidzinski TI, Azeredo J, Oliveira R. Examination of potential virulence factors of *Candida tropicalis* clinical isolates from hospitalized patients. *Mycopathologia* 169(3):175-82, 2010.
 29. Pfaller MA, Diekema DJ. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol* 42(10):4419-31, 2004.
 30. Fidel PL Jr, Vazquez JA, Sobel JD. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin Microbiol Rev* 12(1):80-96, 1999.
 31. Nucci M, Colombo AL. Emergence of resistant *Candida* in neutropenic patients. *Braz J Infect Dis* 2002 Jun;6(3):124-8. Epub 2003. Review.
 32. Hachem R, Sipsas NV, Lewis RE, Tarrand J, Rolston KV, Raad II, Kontoyiannis DP. Candidemia in patients with hematologic malignancies in the era of new antifungal agents (2001-2007): stable incidence but changing epidemiology of a still frequently lethal infection. *Cancer* 115(20):4745-52, 2009.
 33. Hakki M, Staab JF, Marr KA. Emergence of a *Candida krusei* isolate with reduced susceptibility to caspofungin during therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 50(7):2522-4, 2006.
 34. Luo G, Samaranyake LP, Yau JY. *Candida* species exhibit differential in vitro hemolytic activities. *J Clin Microbiol* 39(8):2971-4, 2001.
 35. França EJ, Fávoro D, Scremin H, Oliveira MT, Furlaneto-Maia L, Quesada RM, Furlaneto MC. Hemolysis produced by *Candida tropicalis* isolates from clinical samples *Rev Soc Bras Med Trop* 43(3):318-21, 2010.

Curriculum Vitae abreviado de la autora



Áurea Regina Pupulin. Farmacéutica Bioquímica, Profesora Adjunta, Parasitología, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Brasil. Con desempeño en el área de parasitología y bioquímica con énfasis en el efecto y toxicidad de fármacos sobre microorganismos y hospederos en las patologías HIV/AIDS, infecciones oportunistas y enfermedad de Chagas.