

PERFIL DE SENSIBILIDADE DE *Candida albicans* FRENTE AO FLUCONAZOL ISOLADOS DE DIFERENTES SÍTIOS ANATÔMICOS

Kely Marcia Girelli¹
Volmir Pitt Benedetti²

GIRELLI, K. M.; BENEDETTI, V. P. Perfil de sensibilidade de *Candida albicans* frente ao fluconazol isolados de diferentes sítios anatômicos. *Arq. Cienc. Saúde UNIPAR*, Umuarama, v. 22, n. 3, p. 169-173, set./dez. 2018.

RESUMO: O gênero *Candida* compreende leveduras redondas ou ovaladas que acarretam em uma diversidade de infecções que recebem o nome de candidíase. O curso dessas infecções depende muito do sistema imunológico do indivíduo. *Candida albicans* é a principal espécie envolvida em infecções no ser humano. Estudos indicam que esta espécie é responsável por 60% dos isolados de amostras clínicas. As infecções fúngicas causadas por leveduras do gênero *Candida* são frequentemente tratadas com antifúngicos azólicos, principalmente, o fluconazol. A resistência a agentes antifúngicos, como a que acontece com o fluconazol, pode ter diferentes origens, dentre elas cita-se a alteração da enzima alvo, que por consequência diminui a ligação do fármaco, redução dos efeitos tóxicos da droga, aumento da quantidade de enzima alvo ou também pela acumulação intracelular da droga. Neste contexto, esta pesquisa avaliou o perfil de sensibilidade de isolados de *Candida albicans* frente ao fluconazol, com diferentes grupos de pacientes e diferentes sítios anatômicos. A avaliação da suscetibilidade das leveduras com determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) ao fluconazol foi realizada utilizando - se o E-test em ágar Mueller-Hinton suplementado, seguindo o documento M44-A2, do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Os critérios para a classificação dos padrões de suscetibilidade seguiram o documento M27-A3. Nesta pesquisa foi constatado que 100% dos isolados de *Candida albicans* eram sensíveis ao fluconazol e que não houve diferença estatística nos valores de CIM, quando confrontado ao gênero, faixa etária, tipo de paciente, a única diferença encontrada nos valores de CIM, ocorreu quando se comparou ao sítio anatômico, pois os isolados de corrente sanguínea apresentaram os maiores valores de concentração inibitória mínima frente ao fluconazol.

PALAVRAS-CHAVE: *Candida*. Fluconazol. Resistência.

Candida albicans SENSITIVITY PROFILE AGAINST FLUCONAZOLE ISOLATED FROM DIFFERENT ANATOMICAL LOCATIONS

ABSTRACT: The *Candida* genus comprises gram-positive round or oval yeasts, which lead to a diversity of infections known as candidiasis. The course of such infections depends greatly on the individual's immune system. *Candida albicans* is the main species involved in the infection in humans. Studies indicate that this species is responsible for 60% of isolates from clinical samples. Fungal infections caused by yeasts of the *Candida* genus are often treated with azole antifungals, mainly fluconazole. Resistance to antifungal agents such as fluconazole can have different origins, among which the alteration of the target enzyme, which consequently decreases the drug's binding, the reduction in the toxic effects of the drug, the increase in the amount of enzyme or intracellular accumulation of the drug. Within this context, this study assessed the sensitivity profile of *Candida albicans* isolates against fluconazole, with different patient groups and different anatomical sites. The assessment of yeast susceptibility with the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) to fluconazole determined using the E-test on supplemented Mueller-Hinton agar, following the M44-A2 document from the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). The susceptibility patterns were classified according to criteria in document M27-A3. In this study, 100% of *Candida albicans* isolates were sensitive to fluconazole, and no statistical difference were presented in MIC values when compared to gender, age and patient type, with the only difference found in MIC values occurring when compared to the anatomical site, since bloodstream isolates presented the highest values of minimum inhibitory concentration against fluconazole.

KEYWORDS: *Candida*. Fluconazole. Resistance.

Introdução

O gênero *Candida* compreende leveduras redondas ou ovaladas que acarretam em uma diversidade de infecções que recebem o nome de candidíase. O curso dessas infecções depende muito do sistema imunológico do indivíduo, pois, a lesão pode se apresentar de diferentes formas, com sintomas distintos e cronicidade variada (ARRAES, 2012).

O gênero *Candida* possui aproximadamente 200 espécies diferentes de leveduras, destas somente 20 tem capacidade de causar algum tipo de infecção no homem, das quais a *Candida albicans* se destaca sendo a principal espécie envolvida em infecções no ser humano. Estudos indicam que esta espécie é responsável por 60% dos isolados de amostras clínicas (PEIXOTO et al., 2014).

A espécie *Candida albicans*, apresenta dimorfismo,

ou seja, a 25°C apresenta-se na forma filamentosa e a 30 °C apresenta-se na forma de levedura, característica que auxilia a levedura no processo de invasão celular. Tal espécie é naturalmente sensível aos antifúngicos sistêmicos, eventualmente são resistentes a anfotericina B (polienos) e, são poucos os relatos de resistência às equinocandinas. A resistência aos azólicos está geralmente associada à exposição prolongada a estes fármacos (BENEDETTI, 2014).

Infecções fúngicas causadas por leveduras do gênero *Candida* são frequentemente tratadas com antifúngicos azólicos, principalmente, o fluconazol. A resistência a agentes antifúngicos, como a que acontece com o fluconazol, pode ter diferentes origens (BENEDETTI, 2014).

Segundo Morschhäuser (2016), as células micóticas podem apresentar resistência ao fluconazol, de diferentes maneiras, dentre elas estão a alteração da enzima alvo, que

DOI: 10.25110/arqsaude.v22i3.2018.6498

¹Acadêmica do Curso de Farmácia da Universidade Paranaense - UNIPAR – Unidade Francisco Beltrão. Endereço: Rua Palmas, 1750. Fone: (49) 99176-4541. E-mail: kelygirelli@outlook.com

²Docente do Curso de Farmácia da Universidade Paranaense - UNIPAR - Unidade Francisco Beltrão. Endereço: Av. Júlio Assis Cavalheiro, 2000. Fone: (46) 3520-2800. E-mail: volmir@prof.unipar.br

por consequência diminui a ligação do fármaco, redução dos efeitos tóxicos da droga, aumento da quantidade de enzima alvo ou também pela acumulação intracelular da droga.

Existem aproximadamente cinco mutações causadoras de resistência ao fluconazol em isolados clínicos de *Candida albicans*, dentre elas podemos citar a mutação do gene ERG3, que tem como decorrência a perda de função da $\Delta 5,6$ -dessaturase (essencial para a biossíntese de ergosterol), ocasionando no não acúmulo de esterol tóxico. A mutação do gene ERG11, que tem como resultado a mudança estrutural na enzima alvo, reduzindo assim a ligação ao fármaco. As mutações dos genes MRR1, TAC1 e UPC2 possuem como efeito de mutação o fator de transcrição hiperativo, podemos destacar o gene TAC1, que possui como mecanismo de resistência a sobre expressão da bomba de efluxo (CDR1, CDR2) (SILVA et al., 2012; MORSCHHÄUSER, 2016).

Durante a última década, as escolhas restringiam-se aos imidazólicos, aos poliênicos e aos triazólicos de primeira geração, como o fluconazol. Hoje, existem cinco classes de drogas antimicóticas que possuem diferentes mecanismos de ação e espectro. Fazem parte desta classe os alilaminas, azóis, poliênicos, equinocandinas e as fluoropirimidinas (COLOMBO et al., 2012).

Atualmente, a resistência da espécie *Candida albicans* ao fluconazol, está próximo de 3%, podendo ocorrer alterações deste percentual, devido às variações locais e regionais (QUINTERO, 2010).

Neste contexto, esta pesquisa avaliou o perfil de sensibilidade de isolados de *Candida albicans* frente ao fluconazol, com diferentes grupos de pacientes e diferentes sítios anatômicos.

Material e Métodos

Nesta pesquisa foram analisadas 31 amostras de *Candida albicans*, as quais foram isoladas de diferentes grupos de pacientes, como transplantados, diabéticos, pacientes com candidemia, mulheres com candidíase vulvovaginal (CVV) e idosos usuários de prótese dental, de diferentes sítios anatômicos, como corrente sanguínea, mucosa oral e mucosa vaginal. Sendo a corrente sanguínea referente a pacientes com candidemia, vagina por mulheres com CVV e boca por pacientes diabéticos, transplantados e idosos usuários de prótese, ainda este grupo foi composto por pacientes de ambos os sexos e distintas faixas etárias. As coletas para obtenção das linhagens utilizadas nesta pesquisa foram aprovadas pelo Conselho de Ética da Unipar - CEPEH e sob registro 41733015.9.0000.0109.

O material biológico colhido (sangue, saliva e secreção vaginal) foi semeado por técnica de esgotamento, em meio CHROMagar™ *Candida*, sendo em seguida incubado em estufa a 36° C por 48 horas. Para identificação das espécies de *Candida*, utilizou-se o padrão de cores estipulados pelo meio cromogênico (CHROMagar™ *Candida*).

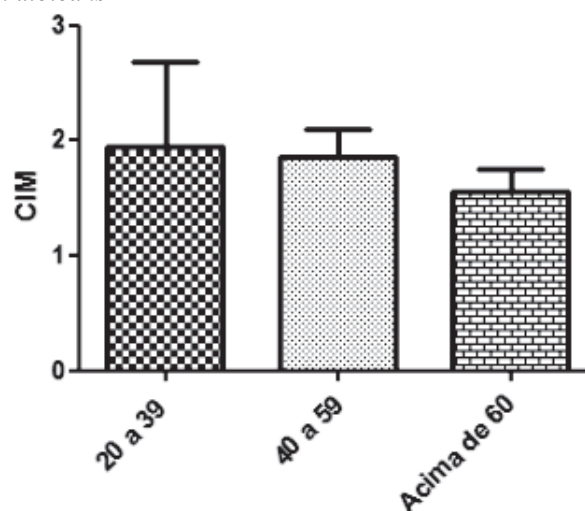
A avaliação da suscetibilidade das leveduras com determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) ao fluconazol foi realizada utilizando - se o *E-test* (Biomerieux®) em ágar Mueller-Hinton (Difco®) suplementado com 2% de glicose e 0,5 µg/mL de azul de metileno, de acordo com o documento M44-A2, do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2010). Os critérios utilizados para

a classificação dos padrões de suscetibilidade seguiram o documento M27-A3, no qual as leveduras do gênero *Candida* são classificadas como suscetíveis ao fluconazol para valores de CIM igual ou inferior a 8 µg/mL, suscetíveis dose-dependente para valores de CIM entre 16 e 32 µg/mL, e resistente quando a concentração inibitória mínima do crescimento é igual ou superior a 64 µg/mL (CLSI, 2008). Utilizou-se para as análises estatísticas o Teste de t para dados envolvendo apenas uma variável e o teste de ANOVA quando as análises envolverem múltiplas variáveis.

Resultados

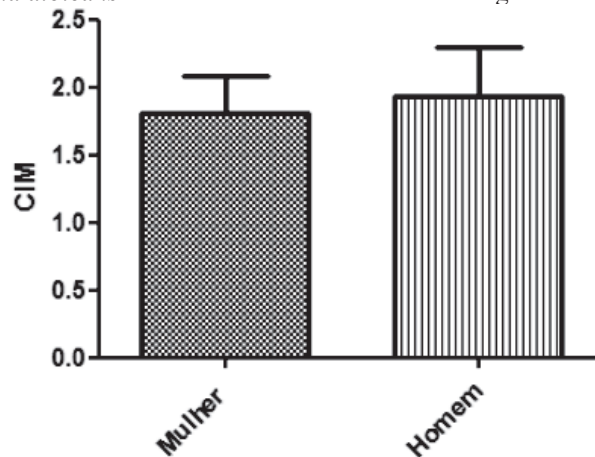
Examinando a figura 1, observamos que a faixa etária de 20 – 39 anos obteve um valor maior de CIM (1,98 ug / mL), em comparação as faixas etárias de 40 – 59 anos (1,95ug / mL) e os acima de 60 anos (1,60 ug / mL), estes resultados não apresentaram diferença estatística $p > 0,05$.

Figura 1: Concentração Inibitória Mínima – CIM da espécie *C. albicans* frente ao fluconazol em diferentes faixas etárias.



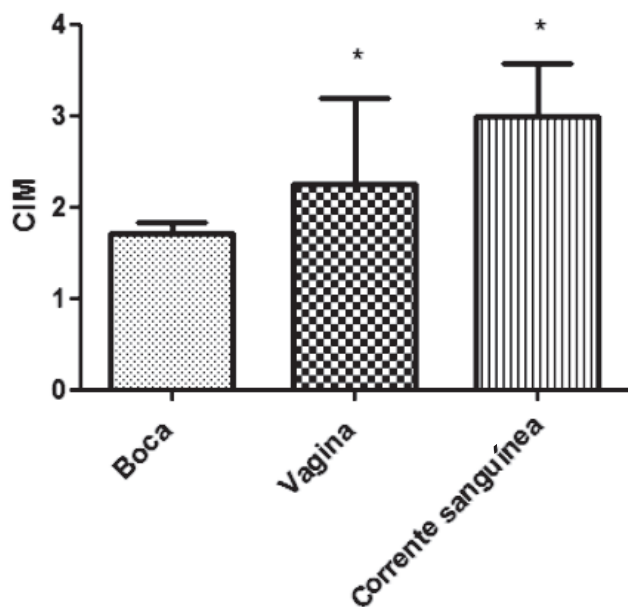
Considerando a figura 2, observou-se que para o gênero masculino o valor de CIM, foi de 1,95 ug / mL, já para o gênero feminino o valor foi de 1,90 ug / mL, contudo tais resultados não apresentaram diferença estatística $p > 0,05$.

Figura 2: Concentração Inibitória Mínima – CIM de *Candida albicans* frente ao fluconazol em diferentes gêneros.



Analisando a Figura 3, observa-se que a corrente sanguínea foi o sítio anatômico que apresentou um valor maior de CIM (3 ug / mL), logo após vagina (2,2 ug / mL) e boca (1,8 ug / mL), tais resultados apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$), apenas quando se comparou o sítio corrente sanguínea com vagina.

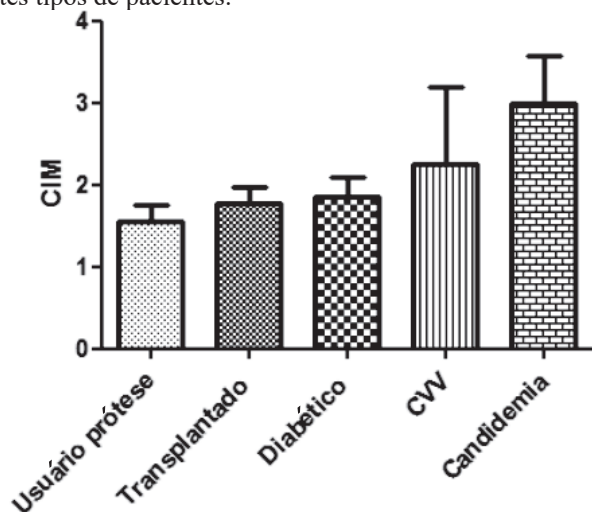
Figura 3: Valores de Concentração Inibitória Mínima – CIM da espécie *Candida albicans* frente ao fluconazol em diferentes sítios anatômicos.



* - Diferença estatística entre os dados

De acordo com a figura 4, pode-se observar que os pacientes com candidemia apresentaram um valor de CIM de 3 ug / mL, os pacientes com candidíase vulvovaginal o valor foi de 2,2 ug / mL, diabéticos de 1,9 ug / mL, transplantados de 1,8 ug / mL e pacientes usuários de prótese o valor foi de 1,7 ug / mL, tais resultados não mostraram diferença estatística $p > 0,05$.

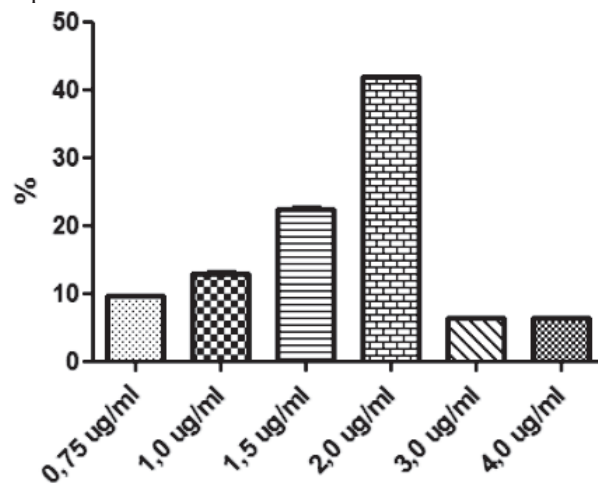
Figura 4: Valores de Concentração Inibitória Mínima – CIM da espécie *Candida albicans* frente ao fluconazol em diferentes tipos de pacientes.



Pode-se observar na figura 5, que 9,7% dos isolados

possuíam CIM de 0,75 ug / mL, 13% CIM de 1,0 ug / mL, 22,5% CIM de 1,5 ug / mL, 42% apresentaram CIM de 2,0 ug / mL, 6,4% CIM de 3,0 ug / mL e 6,4% exibiram CIM de 4,0 ug / mL, tais resultados apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$), exceto na comparação entre os valores de CIM de 3,0 ug / mL e 4,0 ug / mL ($p = 0,8$).

Figura 5: Valores de Concentração Inibitória Mínima – CIM da espécie *Candida albicans* frente ao fluconazol.



Discussão

Referente à análise da Concentração Inibitória Mínima – CIM da espécie *C. albicans* frente ao fluconazol em diferentes faixas etárias e ao gênero masculino e feminino, verificou-se que não houve diferença entre os resultados encontrados, este dado é semelhante ao obtido por Benedetti (2014), o qual estudou colonização de leveduras do gênero *Candida* na cavidade bucal de diferentes grupos de pacientes, constatou com bom suporte estatístico, que o sexo masculino ou feminino e a faixa etária, foram fatores epidemiológicos que não influenciaram no crescimento de levedura na amostra de saliva.

Outro aspecto epidemiológico analisado neste estudo refere-se ao local (sítio anatômico) de isolamento da levedura *C. albicans* e os valores de Concentração Inibitória Mínima – CIM de fluconazol. Neste estudo cada sítio anatômico era constituído por diferentes grupos de pacientes, sendo a corrente sanguínea referente à pacientes com candidemia, vagina por mulheres com CVV e boca por pacientes diabéticos, transplantados e idosos usuários de prótese.

Quando se comenta que as leveduras isoladas da corrente sanguínea apresentaram os maiores valores de CIM, podem-se explicar estes resultados pelo fato da maior exposição destes pacientes aos antifúngicos, pois pacientes com candidemia, são imunodeprimidos, geralmente estão no ambiente hospitalar, sob uso intensivo de antifúngicos ou antimicrobianos, correndo risco de alguma contaminação por procedimentos médicos invasivos, soluções de infusão ou pela colonização de cateteres vasculares (COLOMBO et al., 2012).

Analisaram-se também os valores de CIM da espécie *C. albicans* e correlacionou com os diferentes tipos de pacientes, de acordo com esta análise não se observou diferença estatística entre os resultados. Apesar de estatisticamente

não haver diferença entre os valores de CIM entre os diferentes grupos de pacientes, Althaus et al. (2015) comentam que indivíduos com candidemia, são pacientes hospitalizados, que estão expostos a um grande número de procedimentos invasivos e o uso intensivo de antimicrobianos, sugerindo a maior exposição ao antifúngicos, e conseqüentemente diminuindo o perfil suscetibilidade das leveduras, como foi observado neste estudo.

Ainda segundo Workowski et al.(2015), mulheres com candidíase vulvovaginal, também estão frequentemente expostas aos antifúngicos azólicos, de acordo com a agência americana *Food and Drug Administration* (FDA), o fluconazol é o único antifúngico oral aprovado, para o tratamento de candidíase vulvovaginal.

Corroborando com os resultados obtidos neste estudo, Zhang et al. (2014) observaram um resultado semelhante, onde o grupo de mulheres sem HIV apresentaram 100% de suscetibilidade ao fluconazol, enquanto que entre as mulheres com HIV a suscetibilidade era de 68%.

Segundo os critérios de classificação do padrão de suscetibilidade do protocolo M27-A3 que estipulado pelo CLSI (2008), o qual sugere que para ser sensível ao fluconazol o fungo tem que possui valor de CIM inferior a 8 µg/mL, observou-se que todos os isolados deste estudo foram sensíveis ao fluconazol.

Realizando-se comparação dos resultados deste estudo com o de outros autores, os quais também analisaram o padrão de sensibilidade de *Candida albicans* frente ao fluconazol, encontrou-se resultado semelhante no trabalho desenvolvido por Nunes et al. (2011), o qual obteve um percentual de 100% de sensibilidade nos antifúngicos testados, dentre eles o fluconazol, e os estudos de Goulart et al. (2016), e Owotade et al. (2016), os quais obtiveram um percentual, respectivamente de 93,1 e 100% de sensibilidade da espécie *Candida albicans* frente ao fluconazol, sugerindo similaridade entre os resultados desta pesquisa com o dos autores citados.

Conclusão

Os resultados obtidos nesta pesquisa revelaram que, apesar de se obter valores diferentes de CIM para a espécie *Candida albicans*, todos os isolados mostraram-se sensíveis ao fluconazol, segundo os critérios de classificação do CLSI.

Foi observado também, que o sexo, a faixa etária e o grupo de pacientes não influenciou no padrão de sensibilidade do fungo, apesar dos maiores valores de CIM serem encontrados em pacientes com candidemia.

Finalmente observou-se que o sítio anatômico foi um fator que influenciou para o aumento dos valores de concentração inibitória mínima ao fluconazol, pois os isolados que apresentaram os maiores índices de CIM foram os obtidos da corrente sanguínea.

Referências

ALTHAUS, V. A. et al. Espécies de *Candida* spp. em isolados clínicos e suscetibilidade a antifúngicos de uso hospitalar. **Saúde e pesquisa**. v. 8, n. 1, p. 7-17, 2015.

ARRAES, A. P. C. **Detecção da diversidade molecular de *Candida* spp. isolados de UTI neonatal**. 2012. 170 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências da Saúde – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012.

BENEDETTI, V. P. **Isolados de *Candida* provenientes de pacientes diabéticos e transplantados renais: análise filogenética, avaliação da resistência ao fluconazol e polimorfismo do gene *ERG11***. 2014. 102 f. Tese (Doutorado em microbiologia, Parasitologia e Patologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts: approved guideline M44-A2**. CLSI, Wayne, PA, USA, 2010.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard-third edition M27-A3**. CLSI, Wayne, PA, USA, 2008.

COLOMBO, A. L. et al. Brazilian guidelines for the management of candidiasis - a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. **Braz J Infect Dis**. v. 16, Suppl. 1, p: S1-S34, 2012.

GOULART, L. S. et al. Species distribution and antifungal susceptibility to vulvovaginal *Candida* spp. in southern Mato Grosso State. **J. Bras. Patol. Med. Lab**. v. 52, n. 4, p. 233-237, 2016.

MORSCHHÄUSER, J. The development of fluconazole resistance in *Candida albicans* – an example of microevolution of a fungal pathogen. **J. Microbiol**. v. 54, n. 3, p. 192-201, 2016.

NUNES, E. B. et al. Perfil de sensibilidade do gênero *Candida* a antifúngicos em um hospital de referência da Região Norte do Brasil. **Rev Pan-Amaz Saude**. v. 2, n. 4, p. 23-30, 2011.

OWOTADE, F. J. et al. Antifungal susceptibility of *Candida albicans* isolated from the oral cavities of patients with HIV infection and cancer. **S. Afr. Dent. J**. v. 71, n. 1, p. 8-11, 2016.

PEIXOTO, J. V. et al. Candidíase - uma revisão de literatura. **Braz. J. Surg. Clin. Res**. v. 8, n. 2, p. 75-82, 2014.

QUINTERO, C. G. H. Resistencia de levaduras del género *Candida* al fluconazol. **Infectio**. v. 14, n. S2, p. S172-S180, 2010.

SILVA, L. V. A. et al. Azole resistance by loss of function of the Sterol $\Delta^{5,6}$ -Desaturase Gene (*ERG3*) in *Candida albicans* does not necessarily decrease virulence. **Antimicrob**

Agents Chemother. v. 56, n. 4, p. 1960-1968, 2012.

WORKOWSKI, K. A.; BOLAN, G. A. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Sexually transmitted diseases treatment guidelines. **MMWR recomm. rep.** v. 63, n. 33, p. 1-137, 2015.

ZHANG, L. et al. Fluconazole resistance patterns in *Candida* species that colonize women with HIV infection. **Curr. ther. res. clin. exp.** v. 76, p. 84-89, 2014.

Recebido: 01/12/2017

Aceito: 12/04/2018