

---

## PERFIL DE SUSCETIBILIDADE DE *Candida tropicalis* A ANTIFÚNGICOS SISTÊMICOS

---

---

Everardo Albuquerque Menezes, Maria da Conceição dos Santos Oliveira Cunha, Élson Braga Ferreira, Lygia Guimarães Capelo, Bárbara Helena Lima Braz e Francisco Afrânio Cunha<sup>1</sup>

### RESUMO

Infecções fúngicas invasivas são uma ameaça crescente à saúde humana. Tem ocorrido um aumento considerável na taxa de infecções nosocomiais no sangue, causadas por espécies de *Candida*. *C. albicans* é a principal levedura isolada de candidemias, no entanto o isolamento de *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* também tem sido frequente. Este estudo teve como objetivos isolar, identificar e avaliar o perfil de suscetibilidade de *C. tropicalis* a antifúngicos sistêmicos. Foram utilizadas 50 cepas de *C. tropicalis* provenientes de amostras clínicas de sangue, urina e lavado bronco alveolar de pacientes atendidos no Ceará. Foi avaliado o perfil de sensibilidade das cepas aos antifúngicos sistêmicos anfotericina B, fluconazol, itraconazol e voriconazol pela metodologia de microdiluição em caldo RPMI. As cepas de *C. tropicalis* não apresentaram resistência, mas foram encontradas cepas com CIM elevada para o fluconazol, portanto deve ter continuidade o monitoramento de *Candida* spp. isoladas no Ceará com o fim de avaliar a evolução da resistência.

DESCRITORES: *Candida tropicalis*; sensibilidade a antifúngicos; voriconazol.

### ABSTRACT

Susceptibility profile of *Candida tropicalis* to systemic antifungals

Invasive fungal infections are an increasing threat to human health. There has been a considerable increase in the rate of nosocomial bloodstream infections caused by *Candida* species. *C. albicans* is the main isolated yeast from candidemias, however the isolation of *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* has been recently reported. The objectives of this study were to isolate, identify and evaluate the

---

1 Laboratório de Microbiologia de Leveduras, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará (DACT/FFOE/UFC), Brasil.

Endereço para correspondência: Everardo Albuquerque Menezes. Laboratório de Microbiologia de Leveduras. Rua Capitão Francisco Pedro 1210, Rodolfo Teófilo, CEP 60420-970, Fortaleza, Ceará, Brasil. E-mail: menezes@ufc.br

Recebido para publicação em: 10/4/2012. Revisto em: 5/9/2012. Aceito em: 27/3/2013.

susceptibility profile of *C. tropicalis* to systemic antifungals. Fifty samples of *C. tropicalis* were isolated from blood, urine and bronchoalveolar fluid from patients from Ceará State, Brazil. The sensitivity of the strains to amphotericin B, fluconazole, itraconazole and voriconazole by microdilution in RPMI broth were determined. Strains of *C. tropicalis* showed no resistance, but we found strains with high MIC for fluconazole, which indicates the need for monitoring *Candida* spp. isolated in Ceará State for evaluation of resistance.

KEY WORDS: *Candida tropicalis*; antifungal susceptibility; voriconazole.

## INTRODUÇÃO

Infecções fúngicas sistêmicas (IFS) são de difícil diagnóstico e estão associadas a elevada mortalidade e morbidade, constituindo um sério problema de saúde pública. A incidência de (IFSs) tem aumentado nas últimas duas décadas. Entre os fungos oportunistas, os mais importantes continuam sendo *Aspergillus fumigatus* e *Candida albicans*, no entanto outras espécies, como *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis* e *Trichosporon spp.*, começam a despontar (Menezes et al., 2009; Arendrup 2010; Gomes et al., 2010; Menezes et al., 2011; Vasconcelos et al., 2011; Menezes et al., 2012).

Candidemias são infecções na corrente sanguínea causadas por *Candida* spp. A principal espécie responsável por candidemias na América Latina é *C. albicans*, no entanto *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* estão se tornando cada vez mais frequentes e, em alguns casos, superam *C. albicans* (Nucci et al., 2010). No Brasil, *C. tropicalis* compete com *C. parapsilosis* pelo segundo lugar em número de isolamentos (França et al., 2008; Motta et al., 2010; Furlaneto et al., 2011). No Ceará, Região Nordeste do Brasil, *C. tropicalis* é a segunda levedura mais isolada de amostras biológicas (Menezes et al., 2009; Gomes et al., 2010; Menezes et al., 2011).

O tratamento de candidemias é realizado com antifúngicos sistêmicos como: anfotericina B, fluconazol, itraconazol, voriconazol e equinocandinas. Dentre esses antifúngicos citados, os azólicos são os mais utilizados, principalmente em razão de sua menor toxicidade, quando comparados à anfotericina B, e do baixo custo, quando comparados às equinocandinas. Os relatos de resistência aos antifúngicos disponíveis vêm aumentando nas últimas décadas e, no futuro, essa resistência pode dificultar ou mesmo impossibilitar o tratamento das IFSs (Pfaller, 2012).

Estudos que avaliem a resistência de *C. tropicalis* no Ceará ainda são escassos e conhecer esta espécie e seu perfil de sensibilidade é essencial para prevenir a disseminação da resistência (Menezes et al., 2009; Gomes et al., 2010). Este estudo teve como objetivos isolar, identificar e avaliar o perfil de sensibilidade de *C. tropicalis* a antifúngicos sistêmicos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Microrganismos

Foram utilizadas neste estudo 50 cepas de *Candida tropicalis* pertencentes ao banco de leveduras do Laboratório de Microbiologia de Leveduras da Universidade Federal do Ceará. Tais cepas foram isoladas de amostras biológicas de sangue (11), urina (30) e lavado broncoalveolar (9) provenientes de pacientes atendidos no Ceará.

### Isolamento, purificação das cepas e identificação presuntiva

As cepas em estoque foram descongeladas e semeadas em caldo YMB (extrato de levedura 3%, extrato de malte 2%) e incubadas a 37°C por 24/48 horas. Após o crescimento, foram inoculadas em ágar YMA (extrato de levedura 3%, extrato de malte 2%, 1,5% de ágar). Depois de isoladas, a pureza e a identificação presuntiva foram realizadas em meio cromógeno. As cepas foram semeadas em meio CHROMagar Candida® (Himédia-Índia) e incubadas a 37°C por 24/48 horas. Nesse meio, cepas de *C. tropicalis* apresentam-se como colônias azuis metálicas e o pigmento se difunde. A confirmação das identificações se deu por meio do teste de fermentação e assimilação de açúcares e a visualização da micromorfologia em ágar arroz com *tween* 80 (Menezes et al., 2009; Menezes et al., 2011; Vasconcelos et al., 2011).

### Suscetibilidade por microdiluição em caldo

As soluções em estoque dos antifúngicos anfotericina B 80 µg/mL (Inlab-São Paulo), itraconazol 80 µg/mL (ITR) (Sigma-USA) e voriconazol (VRZ) 160 µg/mL (Sigma-USA) foram preparadas em dimetil sulfóxido (DMSO); a do fluconazol (FLU) 1280 µg/mL (Sigma-USA) foi preparada em água destilada. As soluções foram diluídas em RPMI 1640, (pH 7,0) tamponado com MOPS (ácido morfolino propanossulfônico). A faixa testada para o fluconazol foi de 0,12 a 64 µg/mL; anfotericina B, itraconazol e voriconazol foram testados na concentração de 0,03 a 16 µg/mL. Todas as soluções foram estocadas a -20°C até o momento do uso. A preparação do inóculo e o teste de suscetibilidade foram realizados de acordo com o protocolo M27-A3 (CLSI, 2008a; CLSI, 2008b). A Concentração Inibitória Mínima (CIM) para anfotericina B foi considerada como a menor concentração e nela não ocorreu crescimento fúngico após 24h/35°C. Cepas com  $CIM \leq 1,0$  µg/mL foram consideradas sensíveis e  $CIM \geq 1,0$  µg/mL foram consideradas resistentes. As CIMs para os triazólicos foram definidas como a menor concentração capaz de inibir 90% do crescimento fúngico, quando comparados ao controle. Todas as leituras dos testes foram realizadas com 24 horas de incubação. Os pontos de corte para o fluconazol foram os seguintes: cepas com  $CIM \leq 8$  µg/mL (Sensíveis), 16-32 µg/mL (SDD-Sensível Dose-Dependente) e  $\geq 64$  µg/

mL (Resistente); para o itraconazol, cepas com CIM  $\geq 2\mu\text{g/mL}$  foram consideradas resistentes; para o voriconazol, cepas com CIM  $\leq 0,125\mu\text{g/mL}$  (Sensíveis) e com CIM  $\geq 1\mu\text{g/mL}$  (Resistentes). Como controles foram usadas as cepas *C. tropicalis* ATCC 750, *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6258 (Kiraz et al., 2010; Pfaller et al., 2010; Pfaller et al., 2011a; Cisterna et al., 2012).

## RESULTADOS

As principais amostras biológicas nas quais foi isolada *C. tropicalis* foram: a urina com maior percentual (60%), vindo em seguida o sangue (22%) e o lavado bronco alveolar (18%).

Na Tabela 1, são mostrados os perfis de suscetibilidade aos antifúngicos. Todas as cepas foram sensíveis à anfotericina B com CIM  $\leq 0,5\mu\text{g/mL}$ . Em relação ao fluconazol, a CIM variou de 0,12 a 4  $\mu\text{g/mL}$ , os antifúngicos itraconazol e voriconazol apresentaram CIM  $\leq 0,03\mu\text{g/mL}$ .

Tabela 1. Suscetibilidade *in vitro* de *Candida tropicalis* a antifúngicos sistêmicos

Levedura (n)	Antifúngico	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )								Resistência (%)
		$\leq 0,03$	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	
<i>C. tropicalis</i> (50)	Anf B	14	14	9	3	10				0
	Fluc			5	20	9	9	6	1	0
	Itra	50								0
	Vor	50								0

CIM: Concentração Inibitória Mínima. Anf B- Anfotericina B.; Flu – fluconazol; Itra – Itraconazol; Vor - Voriconazol.

## DISCUSSÃO

As infecções fúngicas sistêmicas (IFS) estão aumentando sua incidência provavelmente em virtude do surgimento de melhores técnicas diagnósticas. *Candida* spp. destaca-se como a levedura mais isolada e *C. albicans* como a principal representante, no entanto o isolamento de outras espécies como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. glabrata* também tem sido frequente (Pemán & Salavert, 2012). Identificar corretamente as espécies e realizar o teste de suscetibilidade a antifúngicos são métodos que podem auxiliar no início de um tratamento farmacoterapêutico adequado (Menezes et al., 2011; Vasconcelos et al., 2011).

*Candida tropicalis* é uma levedura isolada de diversas amostras biológicas, dentre elas urina, sangue e secreções, podendo causar artrites, meningite, infecção urinária, candidemia e outras doenças (Gomes et al., 2010; Kothavade et al., 2010; Motta et al., 2010; Furlaneto et al., 2011; Menezes et al., 2011; Pfaller et al., 2011b). Neste trabalho a urina foi a amostra na qual prevaleceu o isolamento de *C. tropicalis* com 60%, percentual semelhante tem sido verificado por outros pesquisadores

(Menezes et al., 2009; Gomes et al., 2010; Vasconcelos et al., 2011). No sangue, o índice de isolamento correspondeu a 22%.

Antifúngicos sistêmicos são aqueles que podem ser utilizados por via oral e/ou endovenosa. A anfotericina B já se encontrava disponível há 30 anos. Os antifúngicos azólicos, como cetoconazol, fluconazol, itraconazol, voriconazol e posaconazol, apresentam uma toxicidade menor que a anfotericina B (Denning & Hope, 2010; Heeres et al., 2010). Os resultados aqui obtidos não mostraram cepa resistente, sendo esta ainda uma opção terapêutica eficiente desde que observada a toxicidade. As novas formulações lipídicas de anfotericina B apresentam toxicidade menor, mesmo espectro de ação, porém maior custo (Klepser, 2011).

O fluconazol é um antifúngico triazólico de uso endovenoso e oral com custo baixo e poucos efeitos colaterais. Por ser ativo contra a maioria dos fungos e de fácil aquisição, é utilizado no mundo inteiro (Lewis, 2011). No Brasil, é comercializado sem receita médica em todas as farmácias do país e alguns trabalhos destacam o surgimento de resistência a esse antifúngico entre cepas de *C. tropicalis* (Kothavade et al., 2010; Gomes et al., 2010).

Neste estudo, nenhuma cepa apresentou resistência ao fluconazol (Tabela 1), pois a resistência é caracterizada por uma CIM  $\geq 64 \mu\text{g/mL}$ . No entanto, ocorreu uma redução da sensibilidade ao fluconazol que deve ser monitorada ao longo do tempo para observar o seu comportamento, pois o fluconazol tem largo uso nos hospitais brasileiros, o que pode fortalecer o mecanismo de resistência fúngica (Bruder-Nascimento et al., 2010). Em um estudo realizado no Brasil com 20 cepas de *C. tropicalis* ante o fluconazol, não foi encontrada resistência a esse antifúngico (Aquino et al., 2005).

O itraconazol é um antifúngico sistêmico muito utilizado por via oral para tratamento de infecções fúngicas (Andrade et al., 2011; Kim et al., 2011). No presente estudo, das 50 cepas de *C. tropicalis* nenhuma apresentou resistência ao itraconazol (Tabela 1), sendo este uma opção para o tratamento de candidúria, que é a infecção das vias urinárias causadas por cepas de *Candida* spp.

O voriconazol é um derivado do fluconazol muito ativo contra fungos. Oral ou endovenoso é recomendado para o tratamento de adultos com aspergilose invasiva, candidemia disseminada, candidíase esofágica e pacientes refratários ou intolerantes à terapia com outros antifúngicos (Nomura et al., 2008). Entre as cepas aqui estudadas, não foi detectada resistência ao voriconazol (Tabela 1). Em uma pesquisa realizada com 1.253 cepas de *C. tropicalis*, o voriconazol mostrou CIM mais baixa que o fluconazol, resultado semelhante ao encontrado neste trabalho (Pfaller et al., 2007).

Entre 38 *C. tropicalis* isoladas em um hospital terciário no Brasil, o perfil de sensibilidade aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e itraconazol ficou assim distribuído: 18,4% das cepas isoladas apresentaram resistência ao fluconazol, 21,1% de resistência ao itraconazol e 100% de sensibilidade à anfotericina B (Bruder-Nascimento et al., 2010).

Em outro estudo realizado no Brasil com 69 *C. tropicalis*, observou-se o percentual de 7,2% de resistência ao fluconazol (Furlaneto et al., 2011). Em nossos achados, somente uma cepa de *C. tropicalis* apresentou CIM de 4 µg/mL, como pode ser visto na Tabela 1. Todas as cepas se mostraram sensíveis a esse antifúngico.

Estudos relatam que *C. tropicalis* oriundas do Ceará mostraram resistência ao fluconazol e ao itraconazol, no entanto a metodologia de disco difusão utilizada para detecção é diferente daquela que empregamos. Pelo método de microdiluição em caldo, utilizado em nosso trabalho, não se verificou resistência a esses antifúngicos (Menezes et al., 2009; Gomes et al., 2010).

Concluindo, embora as 50 cepas de *C. tropicalis* não tenham apresentado resistência a anfotericina B, fluconazol, itraconazol e voriconazol, o teste de suscetibilidade pode ser útil no monitoramento da melhor terapia.

#### AGRADECIMENTOS

Projeto Financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), conforme o Processo nº 473417/2007, e pela Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Ceará (FUNCAP).

#### REFERÊNCIAS

1. Andrade AM, Puga BL, Guerra CC, Molina JE, Capurro MC. Resultados de profilaxis con itraconazol 800 mg/día vía oral en adultos con leucemia aguda y neutropenia de alto riesgo: Hospital del Salvador 2006-2008. *Rev Med Chil* 139: 1128-1134, 2011.
2. Aquino VR, Lunardi LW, Goldani LZ, Barth AL. Prevalence, susceptibility profile for fluconazole and risk factors for candidemia in a tertiary care hospital in southern Brazil. *Braz J Infect Dis* 9: 411-418, 2005.
3. Arendrup MC. Epidemiology of invasive candidiasis. *Curr Opin Crit Care* 16: 445-452, 2010.
4. Bruder-Nascimento A, Camargo CH, Sugizaki MF, Sadatsun T, Montelli AC, Mondelli AL, Bagagli E. Species distribution and susceptibility profile of *Candida* species in a Brazilian public tertiary hospital. *BMC Research Notes* 3: 1-5. 2010.
5. Cisterna R, Tellería O, Hernaez S, Ezpeleta G. Impact of the new clinical Breaking points proposed by the clinical and Laboratory standards Institute (CLSI) in the Antifungal Susceptibility Profile of Clinical Strains Isolated from Invasive Bloodstream *Candida* spp. Infections in Spain. *Clinical Medicine Insights: Therapeutics* 4:19-27, 2012.
6. CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: informational supplement, M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2008a.
7. CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: informational supplement, M27-S3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2008b.
8. Denning DW, Hope WW. Therapy for fungal diseases: opportunities and priorities. *Trends Microbiol* 18: 195-204, 2010.
9. Gomes CL, Cavalcante JE, Cunha FA, Amorim LN, Menezes EA. Identificação e perfil de sensibilidade de *Candida* spp. isoladas de urina de pacientes com candidúria em Iguatu-Ceará. *Rev Bras Anal Clin* 42: 223-225, 2010.
10. França JCB, Ribeiro CLE, Queiroz-Telles F. Candidemia em um hospital terciário brasileiro: incidência, frequência das diferentes espécies, fatores de risco e suscetibilidade aos antifúngicos. *Rev Soc Bras Med Trop* 41: 23-28, 2008.
11. Furlaneto MC, Rota JF, Quesada RMB, Furlaneto-Maia L, Rodrigues RO da S, Oliveira MT, Serpa R, França EJG. Species distribution and in vitro fluconazole susceptibility of clinical *Candida*

- isolates in a Brazilian tertiary-care hospital over a 3-year period. *Rev Soc Bras Med Trop* 44: 595-599, 2011.
12. Heeres J, Meerpoel L, Lewi P. Conazoles. *Molecules* 15: 4129-4188, 2010.
  13. Klepser M. The value of amphotericin B in the treatment of invasive fungal infections. *J Crit Care* 26: 225.e1-225.e10, 2011.
  14. Kim SY, Lim JS, Kim DH, Lee HJ, Cho JB, Lee JA, Kim DH. *Candida tropicalis* arthritis of the elbow in a patient with Ewing's sarcoma that successfully responded to itraconazole. *Korean J Pediatr* 54: 385-388, 2011.
  15. Kiraz N, Dag I, Oz Y, Yamac M, Kiremitci A, Kasifoglu N. Correlation between broth microdilution and disk diffusion methods for antifungal susceptibility testing of caspofungin, voriconazole, amphotericin B, itraconazole and fluconazole against *Candida glabrata*. *J Microbiol Meth* 82: 136-140, 2010.
  16. Kothavade RJ, Kura MM, Valand AG, Panthaki MH. *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. *J Med Microbiol* 59: 873-880, 2010.
  17. Lewis RE. Current Concepts in Antifungal Pharmacology. *Mayo Clin Proc* 86: 805-817, 2011.
  18. Menezes EA, Mendes LG, Cunha FA. Resistência a antifúngicos de *Candida tropicalis* isoladas no Estado Ceará. *Rev Soc Bras Med Trop* 42: 1-2, 2009.
  19. Menezes EA, Cunha MCSO, Cunha FA. Identificação Preliminar de Algumas Espécies do Gênero *Candida* spp. em Meio Cromógeno: Resultados de Dois Anos de um Estudo Multicêntrico Realizado no Ceará. *Rev Patol Trop* 40: 297-303, 2011.
  20. Menezes EA, Marinho JAS, Ângelo MRF, Cunha MCSO, Cunha FA, Vasconcelos AA. Isolation and Antifungal Susceptibility Testing of *Trichosporon asahii* In Ceará, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 54: 1-3, 2012.
  21. Motta AL, Almeida GMD, Almeida-Júnior JN, Burattini MN, Rossi F. Candidemia epidemiology and susceptibility profile in the largest Brazilian teaching hospital complex. *Braz J Infect Dis* 14: 441-448, 2010.
  22. Nomura K, Fujimoto Y, Kanbayashi Y, Ikawa K, Taniwak M. Pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis of voriconazole in Japanese patients with hematological malignancies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 27: 1141-1143, 2008.
  23. Nucci M, Queiroz-Telles F, Tobón AM, Restrepo A, Colombo AL. Epidemiology of Opportunistic Fungal Infections in Latin America. *Clin Infect Dis* 51: 561-570, 2010.
  24. Pemán J, Salavert M. Epidemiologia general de la enfermedad fúngica invasora. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 30: 90-98, 2012.
  25. Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, Rice C, Tendolcar S, Hollis RJ, Diekema DJ. Use of Fluconazole as a Surrogate Marker To Predict Susceptibility and Resistance to Voriconazole among 13,338 Clinical Isolates of *Candida* spp. Tested by Clinical and Laboratory Standards Institute-Recommended Broth Microdilution Methods. *J Clin Microbiol* 45: 70-75, 2007.
  26. Pfaller MA, Andes D, Diekema DJ, Espinel-Ingroff A, Sheehan D. Wild-type MIC distributions, epidemiological cutoff values and species-specific clinical breakpoints for fluconazole and *Candida*: Time for harmonization of CLSI and EUCAST broth microdilution methods. *Drug Resistance Updates* 13: 180-195, 2010.
  27. Pfaller MA, Castanheira M, Messer SA, Moet GJ, Jones RN. Echinocandin and triazole antifungal susceptibility profiles for *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus fumigatus*: application of new CLSI clinical breakpoints and epidemiologic cutoff values to characterize resistance in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program 2009. *Diagn Microbiol Infect Dis* 69: 45-50, 2011a.
  28. Pfaller MA, Messer SA, Moet GJ, Jones RN, Castanheira M. *Candida* bloodstream infections: comparison of species distribution and resistance to echinocandin and azole antifungal agents in Intensive Care Unit (ICU) and non-ICU settings in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008-2009). *Int J Antimicrob Agents* 38: 65-69, 2011b.
  29. Pfaller MA. Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology, and Consequences for Treatment. *Am J Med* 125: S3-S13, 2012.
  30. Vasconcelos AA, Menezes EA, Cunha FA. Chromogenic Medium for Direct Susceptibility Testing of *Candida* spp. Isolated from Urine. *Mycopathologia* 171: 125-130, 2011.