
Candida albicans E *Candida tropicalis*

ISOLADAS DE ONICOMICOSE

EM PACIENTE HIV-POSITIVO:

CO-RESISTÊNCIA *IN VITRO* AOS AZÓLICOS

Kedma de Magalhães Lima, ¹ Marília Delgado, ² Rossana Sette de Melo Rego ³ e Célia Maria Machado Barbosa de Castro ⁴

RESUMO

O presente estudo analisa um caso de onicomicose por espécies de *Candida* com resistência *in vitro* a fluconazol e itraconazol em portadora do vírus da imunodeficiência humana (HIV). A paciente apresentava onicomicose distrófica parcial com paroníquia crônica e já havia feito uso de fluconazol para tratamento de candidíase oral. No exame microscópico direto de escamas ungueais das mãos, foram observadas células de leveduras arredondadas, blastosporadas, hialinas e pseudohifas; em cultura após crescimento, duas espécies de *Candida* foram identificadas como *C. albicans* e *C. tropicalis*. Foram realizados testes de sensibilidade com ATB® FUNGUS 2 e método de disco-difusão. Ambas as espécies apresentaram resistência a fluconazol e itraconazol. As peculiaridades apresentadas por diferentes espécies de *Candida* justificam a necessidade de se identificar leveduras no nível da espécie, bem como determinar o perfil de sensibilidade aos antifúngicos, com a finalidade de orientar uma melhor abordagem terapêutica e minimizar a exposição desses pacientes a condições de risco de uma infecção disseminada.

DESCRITORES: Onicomicose. Candidíase. Antifungograma.

INTRODUÇÃO

A onicomicose consiste na invasão da unha por fungos, sejam eles dermatófitos, leveduras ou fungos filamentosos não dermatófitos. Constitui um importante grupo de infecções fúngicas superficiais que afeta aproximadamente 5%

1 Mestranda em Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE.

2 Dermatologista do Hospital Correia Picanço, Recife, PE.

3 Setor de Microbiologia da NKB Medicina Diagnóstica Pernambuco, Recife, PE.

4 Departamento de Medicina Tropical e Setor de Microbiologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami, da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE.

Endereço para correspondência: Kedma de Magalhães Lima, Rua Helena de Lemos, 273, Madalena, CEP 50750-630, Recife, PE, Brasil. E-mail: kedma.biom@gmail.com

Recebido para publicação em: 17/5/2007. Revisto em: 28/11/2007. Aceito em: 6/12/2007.

da população mundial (23), representa cerca de 30% das micoses superficiais (19) e mais de 50% das onicopatias (10, 17, 31).

Pacientes imunodeprimidos fazem parte do grupo de risco para onicomicoses (30, 36). Alguns autores acreditam que essas infecções estejam presentes em mais de 30% dos indivíduos com sorologia positiva para o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (3). Neste caso, o maior índice ocorre quando esses pacientes apresentam declínio na contagem de linfócitos T CD4+ no sangue periférico (11, 27).

O tratamento das infecções ungueais causadas por fungos tem gerado muitos gastos para o sistema de saúde. A onicomicose é a micose superficial de tratamento mais difícil e, mesmo nos casos em que a medicação é adequada ao agente etiológico identificado, nem sempre se obtém cura, sendo frequentes as recidivas (12, 14, 34).

Entre as espécies de *Candida*, a resistência aos antifúngicos tem sido um problema crescente, pois muitas das espécies não-*albicans* mais comumente isoladas são menos susceptíveis aos derivados azólicos, o que dificulta o tratamento da candidíase e de outras infecções causadas por leveduras (32, 35). Essa é uma das razões da crescente importância dos testes de susceptibilidade, visto que o conhecimento da sensibilidade aos agentes antifúngicos possibilita melhorar as condições de tratamento (2, 9, 28, 37).

Este trabalho relata um caso de onicomicose mista em paciente HIV-positivo, causada por *Candida albicans* e *Candida tropicalis*, ambas com resistência *in vitro* a fluconazol e itraconazol.

RELATO DO CASO

A paciente do sexo feminino, de 41 anos, doméstica, residente na região metropolitana do Recife-PE, sem uso de antiretroviral, com contagem de linfócitos T CD4+ igual a 88 células/ μ L e histórico de uso de fluconazol para tratamento de candidíase oral, foi encaminhada para diagnóstico micológico por apresentar lesão clínica suspeita de onicomicose. As unhas da mão direita (primeiro e segundo quirodáctilos direitos) e as unhas da mão esquerda (primeiro, terceiro e quinto quirodáctilos esquerdos) apresentavam-se com distrofia parcial e paroníquia crônica há três meses (Figura 1A).

Na coleta micológica, as escamas ungueais foram retiradas da região superficial da unha com o auxílio de um bisturi e, no momento da remoção do material, não se observou exudato periungueal.

O exame microscópico direto, clarificado com KOH a 30%, demonstrou a presença de numerosas células de leveduras arredondadas, blastosporadas, hialinas e pseudohifas (Figura 1B). Na cultura realizada em ágar Sabouraud Dextrose (SDB; Difco, Detroit, USA) acrescido de cloranfenicol (50 mg/L), houve crescimento de dois tipos de colônia de leveduras, uma lisa e outra rugosa.

Por meio da morfologia macroscópica das colônias pode-se pressupor a existência de duas espécies diferentes sem, contudo, identificá-las. Assim, para a

identificação das espécies, as colônias características de leveduras foram submetidas a métodos *in house* propostos por Kurtzman e Fell (16). Foram usados testes de produção de tubos germinativos, de clamidoconídios e provas de assimilação e fermentação de carboidratos, além do crescimento em CHROMagar *Candida*® (Probac do Brasil, São Paulo) (Figuras 2A e 2B). As colônias foram identificadas, respectivamente, como *Candida albicans* e *Candida tropicalis* (Figuras 3A e 3B).

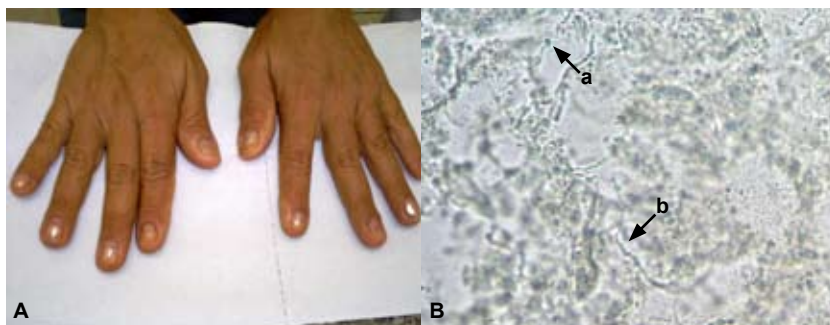


Figura 1. A - Unhas das mãos apresentando onicodistrofia parcial e paroníquia. B - Presença de células de leveduras blastosporadas (a) e pseudo hifas (b) em exame direto com KOH a 30% e aumento de 400x.

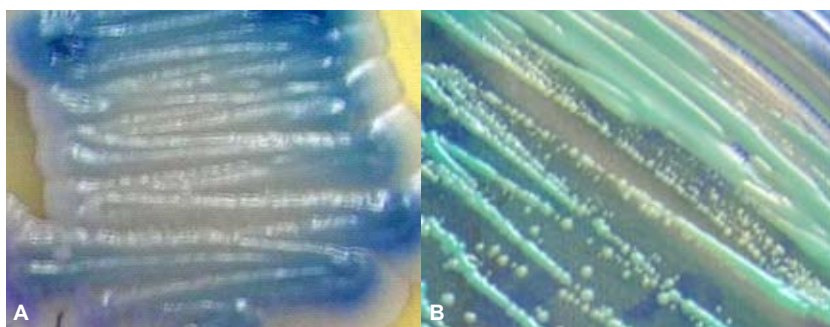


Figura 2. Colônias em meio CHROMagar *Candida*® (Probac do Brasil, São Paulo). A - Colônias azuis acinzentadas identificadas presuntivamente como *Candida tropicalis*. B - Colônias esverdeadas identificadas presuntivamente como *Candida albicans*.

Para determinar o perfil de sensibilidade *in vitro* aos antifúngicos, foi utilizado o ATB® FUNGUS 2 (API-BioMerieux, Marcy l'Étoile, France), que permite determinar a susceptibilidade de espécies de *Candida* aos antifúngicos, utilizando-se diferentes concentrações inibitórias mínimas (CIM): 5-fluocitosina (0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 e 64 mg/l), anfotericina B (0,5, 1, 2, 4, 8 e 16 mg/l), fluconazol (0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 e 128 mg/l) e itraconazol (0,125, 0,25, 0,5, 1, 2 e 4 mg/l). Para a interpretação

clínica das CIM (sensível, intermediária e resistente), foram utilizadas concentrações críticas recomendadas pelo NCCLS/CLSI, 2002 para *Candida* spp (24).

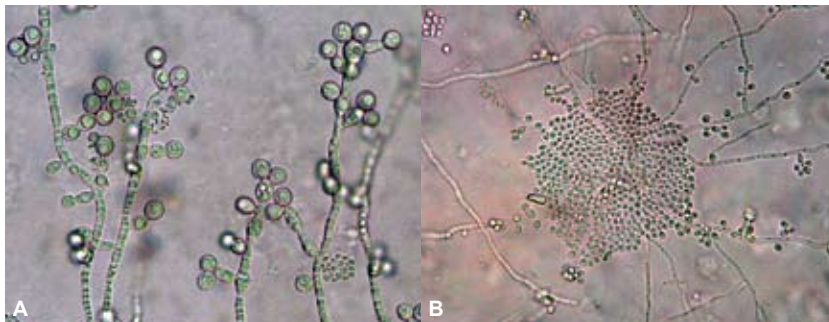


Figura 3. Aspectos microscópicos das leveduras (microcultivo em lâmina com Agar Fubá). A – Presença de clamidoconídios e blastoconídios em cachos sugestivos de *Candida albicans*. B – Presença de blastoconídios em cadeias simples ou ramificadas sugestivos de *Candida tropicalis*.

Discos de fluconazol a 25 µg (CECON, Brasil) foram utilizados para pesquisa de sensibilidade por meio do método de disco-difusão em ágar (25), quando a levedura apresentou resistência a este azólico no ATB® FUNGUS 2. No método de disco-difusão a espécie é considerada sensível quando apresenta zona de inibição superior a 19 mm, intermediária com zona de inibição entre 19 e 14mm e resistente quando apresenta menos de 14 mm de zona de inibição.

No ATB® FUNGUS 2, *Candida albicans* apresentou concentração inibitória mínima (CIM) de 64 mg/L para fluconazol e 1 mg/L para itraconazol, ao passo que *Candida tropicalis* apresentou CIM de 64 mg/L para fluconazol e 4 mg/L para itraconazol. Ambas apresentaram, portanto, resistência a esses azólicos.

No método de disco-difusão, as duas espécies apresentaram zona de inibição menor que 14 mm, confirmando a resistência ao fluconazol.

DISCUSSÃO

Desde a descoberta do HIV, houve um crescente número de casos de infecções fúngicas. As doenças dermatológicas estão classificadas entre as manifestações mais frequentes nos indivíduos HIV-positivos. A onicomicose pode ser considerada marcador clínico precoce da infecção por HIV por se apresentar antecipadamente a outros sintomas ou, ainda, como único quadro clínico do paciente durante parte do curso da infecção, sendo frequente quando a contagem de células CD4+ aproxima-se de 450 células/ml (13, 18). No presente caso, a paciente possuía contagem de células CD4+ abaixo de 100 células/mL, o que pode ter favorecido a instalação de infecção por *Candida* spp.

Entre os agentes etiológicos de onicomicose, destacam-se as leveduras, os dermatófitos e os fungos filamentosos não dermatófitos (1). Dermatófitos são responsáveis por aproximadamente 90% das onicomicoses dos pés; as leveduras, por 50% das infecções nas unhas das mãos (7).

Espécies de *Candida*, particularmente *Candida albicans*, são as principais responsáveis por onicomicoses em unhas das mãos (8, 26). Daniel et al. (4) observaram que *Candida albicans* é o principal agente de onicomicose distrófica em pacientes imunossuprimidos. Nesta paciente, como ocorrera uma associação entre duas espécies de *Candida*, não se soube qual delas possuía maior virulência ou era a responsável pelos aspectos clínicos da lesão.

A frequência de *Candida* em unhas das mãos de pacientes do sexo feminino se deve às atividades exercidas em ambiente doméstico, nas quais ocorre um maior contato com a água, o que propicia a penetração do fungo. Em várias casuísticas a *Candida* é a principal responsável por oníquia e paroníquia (8). Esses dados concordam com o presente caso, no qual a paciente é do sexo feminino e trabalhava em serviços domésticos.

São poucos os trabalhos que ressaltam as infecções mistas em unhas. Rugeles et al. (29), estudando a etiologia e as características das onicomicoses em pacientes imunodeprimidos na Colômbia, observaram a associação de *Candida* com outros fungos; entretanto não relataram a associação de diferentes espécies de *Candida*. Sabe-se que outras espécies, como *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, causam infecções em unhas, o que comprova a participação de espécies não-*albicans* como patógenos emergentes (20).

O uso frequente e prolongado do fluconazol para tratamento de candidíase mucocutânea e sistêmica tem determinado o aparecimento de leveduras resistentes a este azólico. Este perfil de sensibilidade começa a ser observado de forma similar para o cetoconazol e itraconazol (9). No caso descrito, as espécies de *Candida* isoladas em escamas ungueais apresentaram co-resistência a fluconazol e itraconazol.

Para testar a susceptibilidade aos antifúngicos, utilizou-se o ATB® FUNGUS 2, *kit* comercial desenvolvido pela BioMerieux, que se baseia no método de microdiluição em caldo do NCCLS/CLSI. Alguns trabalhos demonstram que o ATB® FUNGUS 2, quando comparado ao NCCLS M27-A2 (24) e EUCAST (33), é um método alternativo simples e fácil para a determinação da susceptibilidade *in vitro* de isolados de *Candida* spp para anfotericina B, 5-flucitosina, fluconazol e itraconazol (5, 6, 21).

O método de disco-difusão em ágar (25) propõe leituras em 24 e/ou 48 horas, apresentando como vantagens a sua fácil realização e similaridade com o antibiograma normal, até mesmo pela utilização do ágar Mueller Hinton como meio de cultura básico. Como a paciente fizera uso de fluconazol por período prolongado para tratamento de candidíase bucal, utilizamos o método de disco-difusão para confirmar a resistência do fluconazol apresentada pelas duas leveduras ungueais no ATB® FUNGUS 2.

Para a *C. albicans*, a análise de isolados provenientes de pacientes com infecções recorrentes tem mostrado que a resistência ao fluconazol ocorre nas mesmas cepas que anteriormente eram susceptíveis. Isso pode ser decorrente de modificações ocorridas nessas cepas ao longo da exposição do paciente à medicação (22). Alguns trabalhos demonstram que, para *Candida albicans*, a resistência ao fluconazol pode chegar a 45% entre os indivíduos que receberam terapêutica prévia e, dos isolados resistentes, 93% apresentam resistência cruzada ao itraconazol (15). Esse mesmo fato pode estar ocorrendo também com espécies não-*albicans*.

A identificação da espécie de *Candida* e a determinação da susceptibilidade *in vitro* aos antifúngicos têm sido recomendadas em alguns casos, principalmente quando se trata de candidíase em pacientes infectados com HIV. Torna-se necessário, então, o conhecimento do mecanismo de resistência das espécies de *Candida* ao fluconazol para auxiliar no desenvolvimento de estratégias em novas ações terapêuticas (22).

Neste contexto, não se pode deixar de mencionar que os azólicos fazem parte do arsenal antifúngico prescrito para o tratamento das micoses profundas, de evolução e prognóstico graves, portanto devem ser utilizados com cautela e quando houver a certeza do diagnóstico micológico.

CONCLUSÃO

Pacientes HIV-positivos, que apresentam baixa contagem de células CD4+ e com tratamento prévio com fluconazol para candidíase oral, podem desenvolver novas infecções por espécies de *Candida* resistentes aos azólicos. É de suma importância que, nestes pacientes, sejam feitas a identificação da espécie de *Candida* e a determinação do perfil de sensibilidade aos antifúngicos com a finalidade de orientar o tratamento e evitar uma possível disseminação.

ABSTRACT

Candida albicans and *Candida tropicalis* isolated from an HIV-positive patient suffering fingernail onychomycosis: resistance to fluconazole and itraconazole.

The present study analyzes a case of onychomycosis by *Candida* species with resistance “*in vitro*” to fluconazole and itraconazole in a patient infected by the human immunodeficiency virus (HIV). The patient presented partial dystrophic onychomycosis with chronic paronychia and previous use of fluconazole for treatment of oral candidiasis. Scales scraped from the fingernails demonstrated hyaline yeasts with blastoconidia and pseudohyphae; and in culture, after growth: two species of *Candida* that have been identified as *Candida tropicalis* and *Candida albicans*. Antifungal susceptibility tests with 2 ATB® FUNGUS and method of Disc diffusion for fluconazole were carried out. Both species presented resistance

to fluconazole and itraconazole. The peculiarities of the various species of *Candida* justify the need to identify yeast species, as well as the sensitivity profile to antifungal agents in clinical use, to better therapeutic and minimize the exposure of these patients to fungal dissemination.

KEY WORDS: Onychomycosis. Candidiasis. Antifungal agents.

REFERÊNCIAS

1. Ballesté R, Mousqués N, Gezuele E. Onicomycosis. Revisión del tema. *Rev Méd del Uruguay* 19: 93-106, 2003.
2. Colombo AL, Nucci M, Salomão R, Branchini MI, Richtmann R, Derossi A, Wey S. High rate of non-*albicans* candidemia in Brazilian tertiary care hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis* 34: 281-286, 1999.
3. Dahdah MJ, Scher RK. Onychomycosis – An Overview. *US Dermatology review (Reference Section)* 2006.
4. Daniel R, Norton L, Scher RK. The Spectrum of nail disease in patients with human immunodeficiency virus infection. *J Infect* 27: 93-97, 1992.
5. Durussel C, Nougier L, Bossy G, Parreno D, Zambardi G, Bille J. Evaluation of the new ATB FUNGUS 2 (bioMérieux) System in comparison with Reference Methods (NCCLS M27-A2, EUCAST) for the *In Vitro* Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Poster 302. In: Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-infectieuse (RICAI), December 04-05, Paris, France, 2003.
6. Durussel C, Parreno D, Nougier L, Monnin V, Zambardi G, Bille J. Comparative Study of various Methods (NCCLS M27-A2, EUCAST) and ATB FUNGUS 2 (bioMérieux) for the *In Vitro* Antifungal Susceptibility Testing of *Candida sp.* Poster 1628. In: 14th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), April 29-May 04, Prague, Czech Republic, 2004.
7. Elewski BE. Onychomycosis: pathogenesis, diagnosis and management. *Clin Microbiol Rev* 11: 415-429, 1998.
8. Ellabib MS, Agaj M, Khalifa Z, Kavanagh K. Yeasts of the genus *Candida* are the dominant cause of onychomycosis in Libyan women but not men: results of a 2 year surveillance study. *Br J Dermatol* 146: 1038-1041, 2002.
9. Evans EG. Resistance of *Candida* species to antifungal agents used in the treatment of onychomycosis: a review of current problems. *Br J Dermatol* 141 (Suppl 56): 33-35, 1999.
10. Ghannoum MA, Hajjeh RA, Scher R, Konnikov N, Gupta AK, Summerbell R, Sullivan S, Daniel R, Krusinski P, Fleckman P, Rich P, Odom R, Aly R, Pariser D, Zaiac M, Rebell G, Leshner J, Gerlach B, Ponce-De-Leon GF, Ghannoum A, Warner J, Isham N, Elewski B. A large-scale North American study of fungal isolates from nails: the frequency of onychomycosis, fungal distribution, and antifungal susceptibility patterns. *J Am Acad Dermatol* 43: 641-648, 2000.
11. Gregory N. Special patient populations: Onychomycosis in the HIV-positive patient. *J Am Acad Dermatol* 35: 13-16, 1996.
12. Gupta AK, Lambert J. Pharmaco-economic analysis of the new antifungal agents used to treat toenail onychomycosis in the USA. *Int J Dermatol* 38: 53-64, 1999.
13. Gupta AK, Taborda P, Taborda V, Gilmour J, Rachlis A, Salit I, Gupta, MA, MacDonald P, Cooper EA, Summerbell RC. Epidemiology and prevalence of onychomycosis in HIV-positive individuals. *Int J Dermatol* 39: 746-753, 2000.
14. Joish VN, Armstrong EP. Newer drugs and overall costs of treating onychomycosis. *Rev Iberoam Micol* 19: 130-132, 2002.
15. Kelly SL, Arnoldi A, Kelly DE. Molecular genetic analysis of azole antifungal mode of action. *Biochem Soc Trans* 21: 1034-1038, 1993.

16. Kurtzman CP, Fell JW. *The yeast's: a taxonomic study*, 4th Ed. Elsevier, New York, 1998. p. 919-925.
17. Lopes JO, Alves SH, Mari CRD, Oliveira LTO, Brum LM, Westphalen JB, Furlan FW, Altermann MJ. A ten-year survey of onychomycosis in the central region of the Rio Grande do Sul, Brazil. *Rev Inst Med trop São Paulo* 41:147-149, 1999.
18. Michelin L, Atti JL, Panarottob D, Lovatto L, Boniatti, MM. Dermatoses em pacientes infectados pelo HIV com a contagem de linfócitos CD4. *Rev Saúde Públ* 38: 758-763, 2004.
19. Midgley G, Moore MK, Cook JC, Phan QG. Mycology of nail disorders. *J Am Acad Dermatol* 31: 68-74, 1994.
20. Miranda KC, Araujo CR, Khrais CHA, Lemos JÁ, Costa CR, Souza LKH, Passos XS, Fernandes OFL, Silva MRR. Identificação de leveduras do gênero *Candida* nas unhas e em descamação de pele em Goiânia (GO), durante o ano de 2003. *Rev Patol Trop* 34: 123-128, 2005.
21. Morera Y, Nougier L, Bossy G, Monnin V, Canard I, Zambardi G, Torres JM. Comparison of the newly designed ATB FUNGUS 2 Strip (bioMérieux) and NCCLS Microdilution Method for the *In Vitro* Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Poster 301. In: Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-infectieuse (RICAI), December 04-05, Paris, France, 2003.
22. Morschhäuser J. The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. *Biochem Biophys Acta* 1587: 240-248, 2002.
23. Murray SC, Dawber RP. Onychomycosis of toe nails: orthopaedic and podiatric considerations. *Australas J Dermatol* 43:105-112, 2002.
24. National Committee For Clinical Laboratory Standards/ Clinical Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. M27-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, 2002.
25. National Committee for Clinical Laboratory Standards/ Clinical Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. M44-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, 2004.
26. Pontes ZB, Lima Ede O, Oliveira NM, Dos Santos JP, Ramos AL, Carvalho MF. Onychomycosis in João Pessoa city, Brazil. *Rev Argent Microbiol* 34: 95-99, 2002.
27. Raju PVK, Raghurama Rao G, Ramani TV, Vandana S. Skin disease: clinical indicator of immune status in human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Int J Dermatol* 44: 646-649, 2005.
28. Rogers TR. Antifungal drug resistance: limited data, dramatic impact?. *Int J Antimicrob Agents* 27(Suppl 1): 7-11, 2006.
29. Rugeles MJ, Vasqués JL, Jaramilo E, Orozco B, Estrada S, Ospina S. Etiología y características clínicas de la onicomicosis en un grupo de pacientes inmunosuprimidos. *Infectio (Revista de la Asociación Colombiana de Infectología)* 5: 7-13, 2001.
30. Scher RK, Baran R. Onychomycosis in clinical practice: factors contributing to recurrence. *Br J Dermatol* 149 (Suppl 65): 5-9, 2003.
31. Schlefman BS. Onychomycosis: a compendium of facts and a clinical experience. *J Foot Ankle Surg* 38: 290-302, 1999.
32. Sojakova M, Liptajova D, Borovsky M, Subik J. Fluconazole and itraconazole susceptibility of vaginal yeast isolates from Slovakia. *Mycopathologia* 157: 163-169, 2004.
33. Subcommittee of Antifungal Testing of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Method for the Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) by Broth Dilution of Fermentative Yeasts. EUCAST Discussion document E. Dis 7.1 *ESCMID*, 2002.
34. Torres-Rodríguez J. Actualización del diagnóstico micológico de las dermatomicosis. *Rev Iberoam Micol* 3: 9-17, 1986.
35. Tortorano AM, Kibbler C, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L, Grillof R. Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. *Int J Antimicrob Agents* 27: 359-366, 2006.
36. Tosti A, Hay R, Arenas-Guzman R. Patients at risk of onychomycosis--risk factor identification and active prevention. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 19 (Suppl 1): 13-16, 2005.
37. Zardo V, Mezzari A. Os antifúngicos nas infecções por *Candida* sp. *NewsLab* 63: 136-146, 2004.