

Comportamento de amostras ambientais e clínicas de *Cryptococcus neoformans* frente a fungicidas de uso agrônômico e ao fluconazol

Behaviour azole fungicide and fluconazole in *Cryptococcus neoformans* clinical and environmental isolates

Elislene Dias Drummond¹, Juliana Quero Reimão¹, Amanda Latercia Tranches Dias¹ e Antônio Martins de Siqueira¹

RESUMO

Avaliou-se a atividade de fungicidas azólicos de uso agrônômico (epoxiconazol, difenoconazol e ciproconazol) em comparação ao antifúngico de uso terapêutico fluconazol sobre 23 amostras ambientais de *Cryptococcus neoformans* var *neoformans* isoladas de fezes de pombos, as quais foram coletadas em fazendas com práticas agrícolas empregando compostos azólicos e 11 amostras clínicas isoladas de pacientes portadores de criptococose. Os testes de sensibilidade foram realizados pela técnica de diluição em agar. A concentração inibitória mínima capaz de inibir 50% dos isolados ambientais (CIM 50) foi de 6,0µg/mL para epoxiconazol, 1,0µg/mL para difenoconazol, 2,0µg/mL para ciproconazol e 64,0µg/mL para fluconazol. Entre os isolados clínicos os valores de CIM 50 foram 2,0µg/mL, 0,38µg/mL, 1,0µg/mL e 16,0µg/mL para epoxiconazol, difenoconazol, ciproconazol e fluconazol, respectivamente. Os valores de CIM 50 em relação aos isolados de origem ambiental foram maiores do que os valores para os isolados de origem clínica. Em nosso estudo, frente ao mesmo antifúngico, as amostras ambientais apresentaram comportamento significativamente diferente em relação às amostras clínicas ($p < 0,05$). Diferenças ($p < 0,05$) também foram observadas entre os valores de concentração inibitória apresentados pelo fluconazol e os outros antifúngicos de uso agrônômico tanto no grupo dos isolados ambientais quanto clínicos.

Palavras-chaves: *Cryptococcus neoformans*. Fungicidas azólicos. Resistência. Isolados ambientais. Isolados clínicos.

ABSTRACT

The activity of azole fungicides for agronomical use (epoxiconazole, difenoconazole and cyproconazole) was evaluated in comparison with the therapeutic antifungal agent fluconazole, on 23 environmental samples of *Cryptococcus neoformans* var *neoformans* isolated from pigeon feces that were collected from farms with agricultural practices using azole compounds, and on 11 clinical samples isolated from patients with cryptococcosis. Sensitivity tests were performed using the agar dilution technique. The minimum inhibitory concentration capable of inhibiting 50% of the environmental isolates (MIC 50) was 6.00µg/ml to epoxiconazole, 1.00µg/ml for difenoconazole, 2.00µg/ml for cyproconazole and 64.00µg/ml for fluconazole. Among the clinical isolates the MIC 50 values were 2.00µg/ml, 0.38µg/ml, 1.00µg/ml and 16.00µg/ml for epoxiconazole, difenoconazole, cyproconazole and fluconazole, respectively. The MIC 50 values for environmental isolates were greater than the MIC 50 values for clinical isolates. In our study, in relation to the same antifungal agent, the environmental samples presented significantly different behaviour in relation to the clinical samples ($p < 0.05$). Differences in the MIC values ($p < 0.05$) presented by fluconazole and the other antifungal agents for agronomical use, both in the environmental isolates and in the clinical isolates, were also observed.

Key words: *Cryptococcus neoformans*. Azole fungicides. Resistance. Environmental isolates. Clinical isolates.

Cryptococcus neoformans é levedura capsulada, agente causador da criptococose, infecção grave que afeta principalmente pacientes imunocomprometidos. São descritas duas variedades e quatro sorotipos da levedura: *C. neoformans* var *neoformans* (sorotipos A e D), com distribuição mundial e responsável pela maioria das infecções associadas ao HIV; e *Cryptococcus neoformans*

var *gattii* (sorotipos B e C) limitado à regiões tropicais e subtropicais, o qual frequentemente causa infecção em indivíduos imunocompetentes⁴. A morbidade e a mortalidade por *C. neoformans* tem aumentado com o advento da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS).

1. Laboratório de Microbiologia, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG.

Endereço para correspondência: Dr. Antônio Martins de Siqueira. Lab. Microbiologia/DCB/UNIFAL. Rua Gabriel Monteiro da Silva 714, 37130-000 Alfenas, MG.

Tel: 55 35 3299-1062

e-mail: siqueira@unifal-mg.edu.br

Recebido para publicação em 12/6/2006

Aceito em 8/2/2007

Os compostos azólicos são substâncias químicas usadas tanto na medicina quanto na agricultura; atuam inibindo a enzima lanosterol-14 α -desmetilase, interrompendo assim a biossíntese do ergosterol, componente essencial à formação da membrana plasmática da célula fúngica¹¹. Até os anos 90, a resistência adquirida aos antifúngicos azólicos era incomum, porém, recentemente emergiram distintos padrões da mesma, provavelmente devido ao uso freqüente do fluconazol⁵.

Como *C. neoformans* é um fungo cosmopolita que pode ser encontrado em diferentes nichos em áreas ambientais, presume-se interferência direta da utilização de fungicidas azólicos nas lavouras com o aumento da resistência aos azóis de uso terapêutico. Diante disso, propõe-se verificar o comportamento de amostras ambientais e clínicas de *C. neoformans* em relação a fungicidas azólicos de uso agrônomico e ao fluconazol.

MATERIAL E MÉTODOS

Nos ensaios, foram utilizadas 23 amostras de *C. neoformans* var. *neoformans* obtidas de isolados de fezes de pombos, coletadas de fazendas no município de Alfenas, MG com práticas agrícolas empregando fungicidas azólicos e 11 amostras clínicas de *C. neoformans* var. *neoformans* provenientes do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP), as quais foram isoladas de pacientes portadores da micose. As amostras foram mantidas em agar Sabouraud a 25°C a partir de repiques a cada dois meses, na micoteca do laboratório de microbiologia da Universidade Federal de Alfenas.

Os fungicidas azólicos usados nas lavouras da região de Alfenas, MG, de origem comercial, e selecionados para o estudo foram: epoxiconazol (Opus®), difenoconazol (Score®) e ciproconazol (Alto 100®). O antifúngico de uso terapêutico usado foi o fluconazol, adquirido como droga pura (Pfizer®).

As amostras foram analisadas segundo a técnica de diluição em agar proposta por Alves e Cury¹, em que as substâncias foram diluídas em caldo Yeast Nitrogen Base Fosfato® (YNBP) e posteriormente em ágar YNBP, resultando em concentrações finais compreendidas entre 0,25 μ g/mL e 128 μ g/mL. Os experimentos foram realizados em duplicatas e a concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada a partir da observação da presença ou ausência de crescimento do microrganismo após 48 horas de incubação à temperatura ambiente. A concentração inibitória mínima considerada refere-se à média, entre as duplicatas, das menores concentrações que inibiram o crescimento da levedura. A análise estatística foi realizada empregando-se test T de Student com 95% de confiança e análise de variância.

RESULTADOS

Entre as amostras de leveduras de origem ambiental, o fungicida epoxiconazol apresentou CIM 50 de 6 μ g/mL. Para difenoconazol a CIM 50 foi de 1 μ g/mL e para ciproconazol, 2 μ g/mL. Na avaliação do fluconazol, a CIM 50 foi de 64 μ g/mL. Para os isolados clínicos, os valores de CIM 50 encontrados foram,

respectivamente, 2 μ g/mL, 0,38 μ g/mL, 1 μ g/mL e 16 μ g/mL. A relação de tais dados encontra-se na Tabela 1.

Pela análise de variância entre as amostras ambientais, a concentração capaz de inibir o crescimento das leveduras não revelou diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) dentre os compostos de uso agrônomico. A atividade antifúngica expressa pelo fluconazol apresentou diferença estatística significante ($p < 0,05$) em relação aos compostos de uso agrônomico, de acordo com teste T de Student e o método Kolmogorov e Smirnov, tanto sobre isolados clínicos quanto ambientais.

Tabela 1 - Sensibilidade de 23 amostras de *Cryptococcus neoformans*, isoladas de fontes ambientais no município de Alfenas, MG e 11 amostras clínicas, provenientes do ICB/USP, isoladas de portadores de criptocose.

Composto azólico	Concentração inibitória mínima (μ g/mL)			
	isolados ambientais		isolados clínicos	
	intervalo		intervalo	
	de variação	50% ^a	de variação	50% ^a
Epoxiconazol	0,25 – 12,0	6,0	0,25 – 6,0	2,0
Difenoconazol	0,25 – 4,0	1,0	0,25 – 1,5	0,4
Ciproconazol	1,00 – 6,0	2,0	1,00 – 4,0	1,0
Fluconazol	16,00 – 96,0	64,0	16,00 – 64,0	16,0

^aCIM 50: menor concentração do antifúngico capaz de inibir 50% dos isolados

DISCUSSÃO

A sensibilidade *in vitro* de *Cryptococcus neoformans* em relação a diferentes antifúngicos tem sido estudada por diversos autores^{2,6,8,9}. Entretanto, há poucos dados comparativos de valores de CIM entre isolados clínicos e ambientais. Em nosso estudo, frente ao mesmo antifúngico, as amostras ambientais apresentaram comportamento significativamente diferente em relação às amostras clínicas ($p < 0,05$) conforme teste T de Student com 95% de intervalo de confiança. Valores mais elevados de CIM 50 foram observados para os isolados de origem ambiental.

A exposição freqüente aos fungicidas azólicos usados nas lavouras pode proporcionar a seleção de *C. neoformans* de modo a torná-lo menos sensível à ação de tais substâncias⁷. Nossos resultados não comprovaram o desenvolvimento de resistência de *C. neoformans* aos compostos azólicos e ao mesmo tempo, a diversidade observada em relação aos perfis de sensibilidade pode ser devido à diversidade genética dos isolados bem como à distância geográfica entre os locais de isolamento dos mesmos.

Considerando-se, isoladamente, a atividade do antifúngico fluconazol sobre os isolados clínicos e ambientais, nossos resultados apresentaram-se diferentes dos observados por outros autores^{3 10}. Porém, a comparação direta de valores de CIM entre estudos é dificultada devido à diversidade de métodos de avaliação da sensibilidade antifúngica (diluição em agar, difusão em disco ou diluição em caldo) e às suas variações individuais (inóculo, grau de aeração, temperatura, atmosfera e período de incubação).

Conforme apresentado na Tabela 1, a CIM 50 do fluconazol tanto em relação aos isolados clínicos quanto ambientais foi

superior às apresentadas pelos compostos de uso agrônômico. De modo geral, os antifúngicos utilizados na prática médica apresentam menor toxicidade ao paciente do que aqueles empregados no combate das doenças fúngicas das lavouras, aos quais o indivíduo pode se expor involuntariamente. Entretanto, a eficiência como antifúngico parece ser maior nos compostos azólicos de uso agrônômico; de acordo com os resultados obtidos, tais compostos apresentaram grau de inibição mais elevado em comparação ao azólico de uso terapêutico fluconazol tanto sobre os isolados de origem clínica quanto ambiental.

REFERÊNCIAS

1. Alves SH, Cury AE. Sensibilidade de leveduras do gênero *Candida* isoladas de pacientes com câncer, a antifúngicos poliênicos. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 34:251-254, 1992.
2. Chandenter J, Adou-bryn KD, Douchet C, Sar B, Kombila M, Swinne D, Therizol-Ferly M, Buisson Y, Richard-Lenoble D. *In vitro* activity of amphotericin B, fluconazole and voriconazole against 162 *Cryptococcus neoformans* isolates from Africa and Cambodia. *European Journal Clinical Microbiology infectious Disease* 23: 506-508, 2004.
3. Franzot SP, Hamdan JS. *In Vitro* Susceptibilities of Clinical and Environmental Isolates of *Cryptococcus neoformans* to Five Antifungal Drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40: 822-824, 1996.
4. Harrison TS. *Cryptococcus neoformans* and Cryptococcosis. *Journal of Infection* 41:12-17, 2000.
5. Maertens JA. History of the development of azole derivatives. *Clinical Microbiology and Infection* 10:1-10, 2004.
6. Maxwekk MJ, Messer SA, Hollis RJ, Diekema DJ, Pfaller M.A. Evaluation of Etest method for determining voriconazole and amphotericin B MICs for 162 clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 97-99, 2003.
7. Meneau I, Sanglard D. Azole and fungicide resistance in clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* isolates. *Medical Mycology* 43:307-311, 2005.
8. Moraes EM, Primola NS, Hamdan JS. Antifungal susceptibility of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* to four antifungal drugs determined by two techniques. *Mycoses* 46: 164-168, 2003.
9. Soares MCB, Paula CR, Dias ALT, Caseiro MM, Costa SOP. Environmental strains of *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* in the city of Santos, SP, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 47: 31-36, 2005.
10. Souza LKH, Fernandes OFL, Kobayashi CCBA, Passos XS, Costa CR, Lemos JA, Souza- Junior AH, Silva MRR. Antifungal susceptibilities of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* in Goiânia city, Goiás, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 47:253-256, 2005.
11. Trosken ER, Fischer K, Volkel W, Lutz WK. Inhibition of human CYP19 by azoles used as antifungal agents and aromatase inhibitors, using a new LC-MS/MS method for the analysis of estradiol product formation. *Toxicology* 219:33-40, 2006.