

SENSIBILIDADE DE LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida*, ISOLADAS DE PACIENTES COM CÂNCER, A ANTIFÚNGICOS POLIÊNICOS

Sydney Hartz ALVES (1) & Arlete Emily CURY (2)

RESUMO

Por meio da determinação da CIM (Concentração Inibitória Mínima) e da CFM (Concentração Fungicida Mínima), os autores compararam a sensibilidade de amostras de *Candida* isoladas de pacientes com câncer, com as de cepas isoladas de pacientes sem câncer, frente à anfotericina B e a nistatina. Os autores não verificaram diferenças significativas entre os dois grupos estudados e discutem o fenômeno da resistência de *Candida* a antifúngicos poliênicos.

UNITERMOS: *Candida*, Sensibilidade, Antifúngicos.

INTRODUÇÃO

As freqüentes falhas da terapêutica antifúngica nos pacientes com câncer, tem sido atribuídas principalmente ao estágio de comprometimento imunológico destes pacientes⁴. Alguns autores^{1, 3, 6, 20, 24} admitem ainda que a emergência de leveduras resistentes, ocasionada pela ação dos agentes antineoplásicos, pode também justificar estas falhas.

O presente trabalho teve como objetivo comparar a sensibilidade de espécies de *Candida* isoladas de pacientes com e sem câncer, frente a antifúngicos poliênicos, utilizando-se as técnicas de diluição em caldo e diluição em ágar.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismos: As leveduras em estudo foram provenientes de 60 pacientes com câncer e submetidos a quimioterapia antineoplásica e

de 56 pacientes sem câncer. O isolamento e a identificação desses agentes foram realizados mediante a aplicação de técnicas convencionais²⁵. *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, foi utilizada como amostra de referência, sensível a poliênicos.

Antifúngicos: foram utilizados a anfotericina B e a nistatina, gentilmente cedidos pelos Laboratórios SQUIBB.

Testes de sensibilidade: foram realizados pela técnica de diluição em caldo (TDC), conforme SHADOMY et al²³, e pela técnica de diluição em ágar (TDA), conforme HOLT¹³, modificada por CURY et al⁵. Em ambas as técnicas foram determinadas a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração fungicida mínima (CFM).

Análise estatística: a comparação entre os resultados (CIMs e CFMs), obtidos para os dois gru-

(1) Laboratório de Análises Clínicas-Hospital Universitário; Universidade Federal de Santa Maria; Campus da UFSM. 97100, Santa Maria, RS, Brasil.

(2) Departamento de Análises Clínicas; Faculdade de Ciências Farmacêuticas; Universidade de São Paulo. Cx. Postal 30786, São Paulo, SP, Brasil.

pos de leveduras foi realizada mediante a aplicação do teste do Qui-quadrado (X^2).

RESULTADOS

A partir dos 60 pacientes com câncer e submetidos a quimioterapia antineoplásica, foram isoladas 71 amostras de *Candida*. A partir dos 56 pacientes sem câncer foram isoladas 56 leveduras pertencentes àquele gênero. As espécies incluídas nos grupos I e II e a proporção de cada espécie isolada estão dispostas na tabela I.

TABELA 1

Distribuição das espécies de *Candida*, isoladas de pacientes com câncer (Grupo I) e de pacientes sem câncer (Grupo II).

Espécies	Grupos		Total	
	I	II	Nº	%
<i>Candida albicans</i>	60	48	108	85,04
<i>Candida tropicalis</i>	8	1	9	7,09
<i>Candida glabrata</i>	2	2	4	3,14
<i>Candida parapsilosis</i>	—	3	3	2,36
<i>Candida pseudotropicalis</i>	—	1	1	0,79
<i>Candida guilliermondii</i>	—	1	1	0,79
<i>Candida krusei</i>	1	—	1	0,79
Total	71	56	127	100

Nos testes com anfotericina B, utilizando-se a TDC, foram obtidas CIMs variáveis de 0,25 $\mu\text{g/ml}$ a 1 $\mu\text{g/ml}$ para as leveduras provenientes de qualquer dos grupos de pacientes. Empregando-se a TDA, essas concentrações variaram de 0,25 $\mu\text{g/ml}$ a 2,0 $\mu\text{g/ml}$ para as leveduras oriundas do grupo I e de 0,25 $\mu\text{g/ml}$ a 4,0 $\mu\text{g/ml}$, para as leveduras do grupo II.

Os resultados das CFMs, empregando-se a TDC, ficaram entre 2 $\mu\text{g/ml}$ e 8 $\mu\text{g/ml}$ para as diferentes leveduras e variaram de 4 $\mu\text{g/ml}$ a 8 $\mu\text{g/ml}$ utilizando-se a TDA (Tabela 2).

Os testes com nistatina, realizados pela TDC, evidenciaram CIMs de 0,25 $\mu\text{g/ml}$ a 8,0 $\mu\text{g/ml}$ para as leveduras provenientes do grupo I e de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ e 8,0 $\mu\text{g/ml}$ para as do grupo II. As CIMs, para as leveduras de ambos os grupos, pela TDA, foram de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ a 16 $\mu\text{g/ml}$.

Em relação às CFMs, estas variaram de 4 $\mu\text{g/ml}$ a 32 $\mu\text{g/ml}$ na TDC e de 8,0 $\mu\text{g/ml}$ a 64 $\mu\text{g/ml}$ na TDA, para qualquer dos grupos estudados (Tabela 3).

TABELA 2

Variação da sensibilidade de *Candida* a Anfotericina B.

Grupos das leveduras (nº de isolados)	Variação da CIM ($\mu\text{g/ml}$)				Variação da CFM ($\mu\text{g/ml}$)			
	TDC	MG	TDA	MG	TDC	MG	TDA	MG
Grupo I (71)	0,25 — 1,0	0,453	0,25 — 2,0	0,573	2 — 8	3,84	4 — 8	4,54
Grupo II (56)	0,25 — 1,0	0,410	0,25 — 4,0	0,790	2 — 8	3,36	4 — 8	4,41

TDC = Técnica de diluição em caldo; TDA = Técnica de diluição em ágar; MG = Média geométrica.

TABELA 3

Variação da sensibilidade de *Candida* a Nistatina.

Grupos das leveduras (nº de isolados)	Variação da CIM ($\mu\text{g/ml}$)				Variação da CFM ($\mu\text{g/ml}$)			
	TDC	MG	TDA	MG	TDC	MG	TDA	MG
Grupo I (71)	0,25 — 8,0	1,77	0,5 — 16,0	3,35	4-32	10,51	8 — 64	25,72
Grupo II (56)	0,5 — 8,0	2,15	0,5 — 16,0	2,89	4-32	10,12	8 — 64	27,58

TDC = Técnica de diluição em caldo; TDA = Técnica de diluição em ágar; MG = Média geométrica.

Embora tenham sido observados resultados variáveis, dependendo da técnica empregada e/ou do grupo de leveduras, o teste de X^2 com $\alpha = 5\%$ não revelou importantes diferenças de sensibilidade entre os dois grupos, quer em relação às CIMS ou às CFMs, frente a qualquer dos antifúngicos em estudo. Por outro lado, as médias geométricas, obtidas para as CIMS e CFMs foram sempre menores para os resultados da TDC do que da TDA.

DISCUSSÃO

Leveduras resistentes aos poliênicos têm sido relatadas por diversos autores^{2, 6, 7, 8, 19, 20, 21, 26}, notadamente em pacientes submetidos à quimioterapia antineoplásica^{5, 6, 7, 8, 12, 20}. Neste caso, diversos estudos, relacionados à bioquímica e à genética das leveduras^{3, 11, 17, 24} comprovam que determinadas drogas utilizadas na terapêutica do câncer são responsáveis por mutações que originam a resistência a poliênicos.

Por outro lado, testes de sensibilidade com leveduras isoladas de pacientes com e sem câncer, têm sido realizados por diversos autores^{5, 6, 9, 18}; entretanto, devido a diversidade das técnicas empregadas, os achados são de difícil interpretação e as comparações às vezes impraticáveis.

A verificação da sensibilidade de *Candida*, por meio de técnicas de diluição em caldo (TDC) e diluição em ágar (TDA), teve como objetivo aumentar o rigor da avaliação, como também verificar o desempenho das mesmas, já que a literatura é controvertida a este respeito.

As comparações estabelecidas entre, as leveduras isoladas das diferentes classes de pacientes, mediante a aplicação do teste do Qui-quadrado, permitem afirmar que as amostras de *Candida*, isoladas de pacientes com câncer, foram tão sensíveis quanto as isoladas de pacientes sem câncer, frente a qualquer dos poliênicos estudados. Nestas condições, pode-se admitir que o fenômeno da resistência, induzido pelos antineoplásicos, possivelmente ocorra em situações específicas de combinações de drogas, concentrações utilizadas ou tempo de terapêutica, fatores que não foram analisados no presente estudo. De qualquer forma, nossos resultados

estão de acordo com os obtidos por vários autores que avaliaram leveduras oriundas de pacientes com diversas patologias^{10, 14, 15, 16}.

Os resultados obtidos pelas médias geométricas estão de acordo com os de SCHOLER & POLAK²². Segundo estes autores, o fato das CIMS e CFMs serem mais elevadas na TDA do que na TDC, ocorre porque a produção de ácido na TDC dilui-se no meio líquido, enquanto que na TDA, permanece no ponto de inoculação, o que promove a inativação dos poliênicos.

Considerando-se, ainda, as médias geométricas, pode-se afirmar que, de modo independente da origem da cepa estudada, a anfotericina B apresentou atividade fungistática e fungicida superiores às da nistatina (Tabelas 2 e 3).

SUMMARY

Candida from cancer patients: susceptibility "in vitro" to polyene antifungal agents.

Candida strains susceptibility from cancer patients were compared with *Candida* strains susceptibility from patients, without cancer by MIC (Minimal Inhibitory Concentration) and MFC (Minimal Fungicidal Concentration) to Amphotericin B and Nystatin. Broth dilution method and Agar dilution method were the procedure employed.

The authors find no significant differences between the studied groups. The problem of *Candida* resistance to polyene antifungals is discussed.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AHEARN, D. G. & MCGLOHN, M. S. — In vitro susceptibilities of sucrose negative *Candida tropicalis*, *Candida lusitanae*, and *Candida norvegensis* to amphotericin B, 5-fluorocytosine, miconazole, and ketoconazole. *J. clin. Microbiol.*, 19: 412-416, 1984.
2. BODENHOFF, J. — Development of strains of genus *Candida* and genus *Torulopsis* resistant to antimycotics. *Acta path. microbiol. scand.*, 75: 622-630, 1969.
3. BRAJTBURG, J.; ELBERG, S.; KOBAYASHI, G. S. & MEDOFF, G. — Interference with effects of amphotericin on *C. albicans* cells by 2-chloroethyl-1-nitrosoureas. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 15: 763-768, 1988.

4. BRINCKER, H. — Prevention of mycosis in granulocytopenic patients with prophylactic ketoconazole treatment. *Mykosen*, 26: 242-247, 1983.
5. CURY, A. E.; MICHE, M. P. & MINAMI, P. S. — Leveduras isoladas de pacientes com câncer: incidência e sensibilidade a antibióticos poliênicos. *Rev. Microbiol. (S. Paulo)*, 20: 102-107, 1989.
6. DICK, J. D.; MERZ, W. G. & SARAL, R. — Incidence of polyene resistant yeasts recovered from clinical specimens. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 18: 158-163, 1980.
7. DICK, J. D.; ROSENGARD, B. R.; MERZ, W. G.; STUART, R. K.; HUTCHINS, G. M. & SARAL, R. — Fatal disseminated candidiasis due to amphotericin B resistant *C. guilliermondii*. *Ann. intern. Med.*, 102: 67-68, 1985.
8. DRUTZ, D. J. & LEHRER, R. I. — Development of amphotericin B — resistant *Candida tropicalis* in a patient with defective leukocyte function. *Amer. J. med. Sci.*, 276: 77-92, 1978.
9. GHANNOUM, M. A. & AL-KHARS, A. — Effect of antineoplastic agents on the growth, and ultrastructure of *Candida albicans*. *Mykosen*, 27: 452-464, 1984.
10. GHANNOUM, M. A.; SHARIF, H. F. & AL-GHARREER, H. — Sensitivity of clinical yeast isolates in Kuwait against a number of antifungal agents. *Mykosen*, 27: 402-410, 1984.
11. GHANNOUM, M. A. — Effects of antineoplastic agents on growth, morphology and metabolism of *Torulopsis glabrata*. *Mycopathologia (Den Haag)*, 95: 175-181, 1986.
12. GUINET, R.; CHASNAS, J.; GOULLIER, A.; BONNEFOY, G. & AMBROISE-THOMAS, P. — A fatal septicemia due to amphotericin B resistant *Candida lusitanae*. *J. clin. Microbiol.*, 18: 443-444, 1983.
13. HOLT, R. J. — Laboratory tests of antifungal drugs. *J. clin. Path.*, 28: 767-774, 1985.
14. HOWARTH, W. R.; TEWARI, R. P. & SOLOTOROVSKI, M. — Comparative in vitro antifungal activity of amphotericin B and amphotericin B methyl ester. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 7: 58-63, 1975.
15. HUSSAIN QUADRI, S. M. H.; FLOURNOY, D. J.; QUADRI, S. G. M. & RAMIREZ, E. G. — Susceptibility of clinical isolates of yeasts to antifungal agents. *Mycopathologia (Den Haag)*, 95: 183-187, 1986.
16. KOSTIALA, I. A. A. & KOSTIALA, I. — Broth dilution and disc diffusion methods in the susceptibility testing of pathogenic *Candida albicans* against four antimicrobics. *Mycopathologia (Den Haag)*, 87: 121-127, 1984.
17. LAND, G. A.; HILME, K. L. & CHAFFIN, W. L. — The effects of selected antineoplastic agents on the morphology of *Candida albicans* 5865. *Canad. J. Microbiol.*, 28: 812-818, 1980.
18. MARTIN, M. V.; AL-TIKRITI, U. & BRAMLEY, P. A. — Yeast flora of mouth and skin during and after irradiation for oral and laryngeal cancer. *Amer. J. Med.*, 14: 457-467, 1981.
19. MERZ, W. G. & SANFORD, G. R. — Isolation and characterization of a polyene-resistant variant of *Candida tropicalis*. *J. clin. Microbiol.*, 9: 677-680, 1979.
20. PAPPAGIANIS, D.; COLLINS, M. S.; HECTOR, R. & REMINGTON, J. — Development of resistance to amphotericin B in *Candida lusitanae* infecting a human. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 16: 123-126, 1979.
21. SAFE, L. M.; SAFE, S. H.; SUBDEN, R. E. & MORRIS, D. C. — Sterols content and polyene antibiotic resistance in isolates of *Candida krusei*, *Candida parakrusei* and *Candida tropicalis*. *Canad. J. Microbiol.*, 23: 398-401, 1977.
22. SCHOLER, H. J. & POLAK, A. — Resistance to systemic antifungal agents. In: BRYAN, L. E., ed. *Antimicrobial drug resistance*. Orlando, Academic Press, 1984. p. 393-460.
23. SHADOMY, S.; ESPINEL-INGROFF, A. & CARTWRIGHT, R. — Laboratory studies with antifungal agents: susceptibility tests and bioassays. In: LENNETE, E. H.; BALLOWS, A.; HAUSLER Jr., W. J. & SHADOMY, H. J., ed. *Manual of Clinical Microbiology*. 4 ed. Washington, American Society of Microbiology, 1985. p. 991-999.
24. SOKOL-ANDERSON, M. L.; SLIGH, J. E.; ELBERG, S.; BRAJBURG, J.; KOBAYASHI, G. & MEDOFF, G. — Role of cell defense against oxidative damage in the resistance of *Candida albicans* to the killing effects of amphotericin B. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 32: 702-705, 1988.
25. VAN DER WALT, J. P. & YARROW, D. — Methods for the isolation, maintenance, classification and identification of yeasts. In: KREGERVAN RIJ, N. J. W., ed. *The Yeasts*. Amsterdam, Elsevier, 1984. p. 45-104.
26. WOODS, R. A.; BARD, M.; JACKSON, I. E. & DRUTZ, D. J. — Resistance of polyene antibiotics and correlated sterol changes in two isolates of *Candida tropicalis* from patient with an amphotericin B-resistant funguria. *J. infect. Dis.*, 129: 53-58, 1974.

Recebido para publicação em 20/09/1991.

Aceito para publicação em 17/03/1992.