

## ***Candida tropicalis* UM DESAFIO NO AMBIENTE HOSPITALAR: RESISTÊNCIA AOS ANTIFÚNGICOS E PERFIL DE VIRULÊNCIA**

Fernanda Leghi Garcia<sup>1</sup> (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Patrícia de Souza Bonfim de Mendonça<sup>1</sup>, Érika Seki Kioshima Cotica<sup>1</sup> (Orientador), e-mail: eskioshima@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá /<sup>1</sup>Centro de Ciências da Saúde/Maringá, PR.

### **Farmácia / Análise Toxicológica**

**Palavras-chave:** *Candida tropicalis*, susceptibilidade, biofilme

### **Resumo:**

As infecções fúngicas invasivas passaram a ser um grupo de grande importância no ambiente hospitalar. A *Candida tropicalis* apresenta grande relevância médica entre as espécies de *Candida não-C. albicans* (CNCA) por possuir importantes fatores intrínsecos de virulência dos registros de resistência aos antifúngicos convencionais. Assim, é fundamental para a epidemiologia a determinação do perfil de resistência aos antimicrobianos e a avaliação de atributos de virulência para a possível melhoria de medidas de controle e prevenção de infecções fúngicas hospitalares. Portanto, este projeto teve como objetivo determinar o perfil de susceptibilidade aos antifúngicos e avaliar a capacidade de adesão e formação de biofilme em superfícies abióticas de isolados clínicos de *Candida tropicalis* do Hospital Universitário Regional de Maringá (HUM). Foi realizada a determinação do perfil de susceptibilidade de 14 isolados de *C. tropicalis* aos antifúngicos Anfotericina, Micafungina, Caspofungina, Fluconazol e Voriconazol, no qual a maioria dos isolados foram suscetíveis. A adesão e formação do biofilme de um dos isolados clínicos, que foi capaz de causar infecção invasiva (Candidemia), apontou uma capacidade de filamentação mais evidente no isolado clínico, quando comparado a uma levedura padrão, indicando um potencial de patogenicidade e virulência aumentada em comparação a cepa padrão.

### **Introdução**

Infecções fúngicas invasivas (IFI) são infecções severas causadas por fungos, que atingem a corrente sanguínea ou se disseminam para órgãos profundos e são associadas a maior mortalidade em pacientes internados em unidades de terapia intensiva (UTI) (SHOHAM et al., 2010). A incidência dessas infecções hospitalares tem aumentado substancialmente nas últimas décadas, sendo o gênero *Candida* o agente etiológico responsável por pelo menos 80% dos casos de IFI (LUZZATI et al., 2016) e a maioria dessas infecções são quadros de alta gravidade com taxa podendo chegar a 72% (DOI et al., 2016). A espécie que mereceu maior atenção clínica até alguns anos foi a *C. albicans* mas as infecções causadas por *Candida não-C. albicans* (CNCA) tem emergindo de modo alarmante (LUZZATI et al., 2016).

Entre as espécies de CNCA, a *Candida tropicalis* possui diversos fatores de virulência como a formação de biofilmes (permite interação entre a comunidade, manutenção dos nutrientes e proteção contra ameaças do ambiente), além da adesão à células epiteliais e endoteliais e da secreção de enzimas líticas como proteinases e fosfolipases, que permitem a alteração das membranas do organismo humano. A capacidade de alternar entre as formas leveduriforme e filamentosa possibilita a adaptação ao ambiente em que o fungo se encontra e de invadir o tecido do hospedeiro de forma intensa. Esses fatores conferem à essas leveduras, uma maior capacidade de estabelecer com severidade, a infecção no hospedeiro. Portanto, este projeto teve como objetivo avaliar o perfil de susceptibilidade aos antifúngicos convencionais dos isolados da *C. tropicalis* de origem hospitalar, bem como avaliar seus atributos de virulência, podendo contribuir de maneira significativa no reconhecimento de focos de infecção, detecção de transmissão cruzada, acompanhamento da rota de transmissão entre outras importâncias epidemiológicas, facilitando a busca de estratégias eficientes para seu controle.

## Materiais e métodos

No teste *in vitro* de susceptibilidade aos antifúngicos, a concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, seguindo as normas de padronização preconizadas pelo Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2010), publicadas no documento M-27A4. Em cada placa foram incluídos controles: negativo, positivo e uma levedura de referência *C. parapsilosis* (ATCC 22019). Foi avaliada também a possível atividade fungicida. Para isso, alíquotas dos testes das várias diluições foram transferidas para placas contendo meio de cultura completo isento de drogas antifúngicas, a fim de avaliar se a atividade inibitória é também fungicida. Resumidamente, os inóculos das leveduras foram preparados em tampão salina estéril (0,85%). Os testes foram realizados em microplacas estéreis contendo 96 poços. Os controles eram RPMI sem inóculo (negativo) e RPMI acrescido de DMSO (controles positivos). O tempo de incubação foi de 48h, a 37°C. Para determinar a concentração mínima fungicida (MFC), subculturas de todos os poços que apresentaram inibição do crescimento foram plaqueadas em meio SDA para espécies de *Candida spp.*

E para determinar a adesão e formação de biofilme sobre superfícies abióticas, foi inoculado uma alçada dos isolados em diferentes tubos cônicos com 5mL de SDB que foram incubados a 37°C durante 18 horas. As células foram recolhidas por centrifugação a 8000 rpm por 5 minutos e lavadas 2 vezes com salina estéril (5mL). O inóculo foi acertado em câmara de Neubauer com concentração  $1 \times 10^7$  células/mL em meio SDB e 1mL desta suspensão celular em triplicata na placa de 96 poços. Incubou-se a placa durante 2 horas (adesão) e 24 horas (biofilme), 130 rpm a 37°C. Depois a suspensão foi lavada 1 vez com salina (para que as leveduras não aderentes fossem removidas) e fixadas com 1mL de metanol 100%. Após 15 minutos, o metanol foi retirado e a placa seca ao ar. Adicionou-se 1mL de solução cristal violeta (1%) a cada material, por 5 minutos. A solução de coloração foi removida e a placa lavada 2 vezes com água destilada. Ressolubilizou-se o corante adicionando 1mL de ácido acético 33% e homogeneizando até que todo o corante fosse ressolubilizado. A leitura foi feita a 570 nm.

## Resultados e Discussão

Para a determinação dos valores da CIM, foi considerada para anfotericina, micafungina e caspofungina a concentração na qual ocorreu a inibição de 90% do crescimento. Já para fluconazol e voriconazol está padronizado a leitura com inibição de crescimento em 50%. Os isolados apresentaram valores de CIM entre 0,06 a 0,25 ug/ml para anfotericina. Para micafungina, os valores variaram de 0,0001 a 0,03 ug/ml (com prevalência de valores menores que 0,003 ug/ml) e para caspofungina, a CIM variou de 0,125 a 2 ug/ml entre os isolados. Em relação ao fluconazol, os isolados apresentaram resultados entre 0,125 a 32 ug/ml e para o voriconazol, valores entre 0,03 a 8 ug/ml (**Tabela 1**).

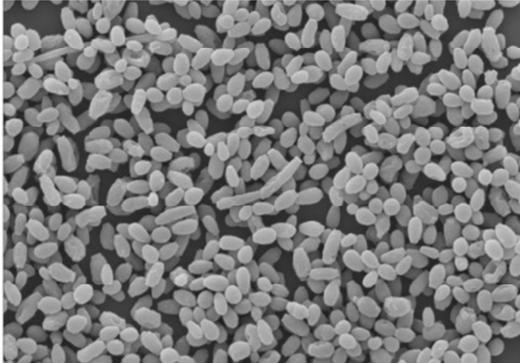
**Tabela 1.** Valores de CIM de isolados de *C. tropicalis* para diferentes compostos.

ISOLADOS	ANFOTERICINA	MICAFUNGINA	CASPOFUNGINA	FLUCONAZOL	VORICONAZOL
UrHUMCt11	0,25	0,0001	0,125	0,125	0,03
UrHUMCt22	0,25	0,0001	0,25	0,5	0,06
UrHUMCt24	0,25	0,03	1	0,5	0,06
UrHUMCt54	0,25	0,015	0,25	1	0,125
UrHUMCt67	0,25	0,003	1	32	8
SangHUMCt74	0,25	0,007	0,5	0,5	0,06
UrHUMCt80	0,125	<0,003	0,5	0,25	0,06
UrHUMCt92	0,06	0,0001	1	0,5	0,125
UrHUMCt101	0,06	<0,003	1	0,5	0,125
UrHUMCt109	0,06	<0,003	1	0,5	0,125
UrHUMCt117	0,125	<0,003	2	0,5	0,125
UrHUMCt132	0,125	<0,003	2	0,25	0,03
UrHUMCt150	0,06	<0,003	1	0,25	0,03
UrHUMCt155	0,125	<0,003	2	0,25	0,03

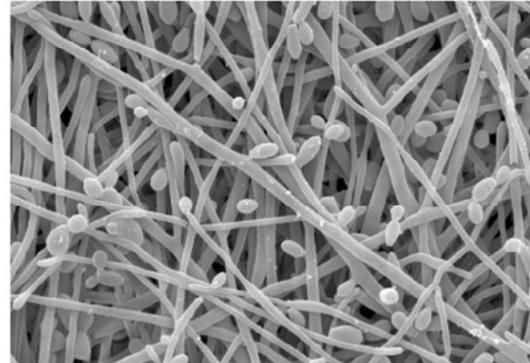
Não foram observadas variações na viabilidade dos fungos ou mesmo da quantidade de matriz formada na estrutura do biofilme. No entanto, a organização do biofilme nas leveduras recentemente isolados do paciente apontaram a presença de filamentação acentuada (SangHUM74), quando comparada a levedura padrão (ATCC) (**Imagem 1**).

**Imagem 1** – Comparação de filamentação entre a levedura padrão (ATCC) e isolado clínico (SangHUM74).

ATCC



SangHUM74



## Conclusões

Conforme os resultados obtidos, concluiu-se que a maioria dos isolados clínicos foram sensíveis ao voriconazol e ao fluconazol e que todos os isolados foram suscetíveis a anfotericina, caspofungina e micafungina. Os resultados sugerem também que a filimentação acentuada foi mais evidente na levedura vinda do ambiente hospitalar, indicando um perfil de virulência mais elevado nestes fungos recentemente isolados.

## Agradecimentos

À Fundação Araucária e ao Laboratório de Micologia Médica da UEM.

## Referências

DOI, A. M. *et al.* Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. **Plos One**, v. 11, n. 1, p. 0146909, 2016.

LUZZATI, R. *et al.* Nosocomial candidemia in patients admitted to medicine wards compared to other wards: a multicentre study. **Infection**, v. 44, n. 6, p. 747-755, 2016.

SHOHAM, S. *et al.* Invasive Fungal Infections in the ICU. **Journal Of Intensive Care Medicine**, v. 25, n. 2, p. 78-92, 2009.