

PREVALÊNCIA E IDENTIFICAÇÃO DE *CANDIDA* SPP. NAS LESÕES DE CANDIDOSE OROFARÍNGEA E NA SALIVA DE PACIENTES HIV-POSITIVOS

Rodnei Dennis Rossoni, Simone Furgeri Godinho Vilela, Júnia Oliveira Barbosa, Jamal Muhamad Abdul Hamid Suleiman, Antônio Olavo Cardoso Jorge, Juliana Campos Junqueira

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”/ Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal,
Av. Engenheiro Francisco José Longo, 777- Jardim São Dimas, São José dos Campos – SP,
rdrossoni@terra.com.br

Resumo- O objetivo foi isolar e identificar *Candida* spp. na saliva e nas lesões de candidose orofaríngea em pacientes HIV-positivos. Foram coletadas amostras de saliva de 54 pacientes sem lesões de candidose e amostras de lesões de 7 pacientes com candidose orofaríngea, no Instituto de Infectologia Emílio Ribas. As amostras foram semeadas em ágar Sabouraud com cloranfenicol e em meio cromogênico CHROMágar. Os isolados foram identificados por formação de tubo germinativo, microcultivo e API 20C AUX. Leveduras do gênero *Candida* foram encontradas na saliva de 34 pacientes (63%) sem candidose e 20 pacientes (37%) foram negativos para *Candida*. Entre os pacientes com lesões de candidose orofaríngea, foram obtidos 75 isolados e entre os pacientes sem lesões de candidose foram obtidos 232 isolados. Nas amostras identificadas, tanto no grupo de pacientes com candidose orofaríngea quanto no grupo não lesionados houve maior prevalência da espécie de *C. albicans* em relação às demais espécies. Concluiu-se que entre os pacientes portadores do HIV sem lesões de candidose bucal, 63% eram portadores de leveduras e *C. albicans* foi a espécie mais prevalente nos dois grupos estudados.

Palavras-chave: *Candida* spp., candidose orofaríngea, identificação fenotípica.

Área do Conhecimento: Odontologia.

Introdução

As leveduras do gênero *Candida* são responsáveis pela maioria das infecções fúngicas em pacientes imunologicamente comprometidos, tanto pelo uso de imunossuppressores como por fatores próprios do indivíduo, como idade avançada e doenças sistêmicas, sendo a cavidade bucal um dos sítios preferenciais para o desenvolvimento de infecção (MARTINS et al. 2005). A candidose orofaríngea é a infecção fúngica mais comum entre os pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), apresentando muitas vezes episódios recorrentes, principalmente quando a contagem dos linfócitos CD4 encontra-se baixa (MEILLER et al. 2009).

Os derivados azóis, particularmente o fluconazol, são efetivos no tratamento de candidoses em pacientes com imunodeficiência avançada e constitui o primeiro passo para tratar essas infecções (PEREA et al. 2002). A resistência de *C. albicans* e outras espécies do gênero *Candida* aos antifúngicos pode ser resultado de mutações ou expressões de genes (AL MOSAID et al. 2001). O tratamento com antifúngicos polienos (nistatina e anfotericina B) e clotrimazol resultam apenas em melhora transitória da candidose, sendo muito comum a ocorrência de recidivas, principalmente em casos de imunodeficiência. Essas terapias não erradicam totalmente o microrganismo e recidivas são

comuns. Em 74% dos pacientes com AIDS ocorre recolonização com a mesma cepa de *Candida* após 2 meses do tratamento com antifúngico (TEICHERT et al. 2002). Melhores resultados são obtidos com antifúngicos sistêmicos como cetoconazol, fluconazol e itroconazol. Entretanto, o uso desses medicamentos provoca efeitos colaterais e desenvolve resistência microbiana (WILSON E MIA 1993). Esses agentes antifúngicos demonstram efeito mais fungistático do que fungicida, resultando em uma profilaxia inadequada (DONNELLY et al. 2008).

HAMZA et al. (2008) coletaram amostras de 292 pacientes infectados pelo HIV com candidose orofaríngea primária e recorrente. *C. albicans* foi a espécie mais frequentemente isolada (84,5%), seguida por *C. glabrata* (6,8%) e *C. Krusei* (3,4%). Não foi observada diferença significativa na distribuição das espécies entre os pacientes com candidose primária e recorrente. Entretanto, os isolados dos pacientes com candidose recorrente foram menos sensíveis aos antifúngicos azóis quando comparados aos isolados das lesões de candidose primária.

Embora, *C. albicans* seja a espécie predominantemente isolada das lesões de candidose, a frequência de isolamento das espécies não *albicans* está aumentando progressivamente. MANINDER et al. (2008) avaliaram a prevalência, caracterização e a suscetibilidade antifúngica de espécies de

Candida spp. na candidose orofaríngea em pacientes HIV e verificaram que dos 100 pacientes portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, 61 eram portadores de lesões orofaríngeas por *Candida* spp. e desse grupo 29,50% eram colonizados por espécies não *albicans* e desse total 22,2% eram resistentes ao fluconazol. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi isolar e identificar por testes fenotípicos leveduras do gênero *Candida* da cavidade bucal de pacientes HIV-positivos.

Metodologia

Foram coletadas amostras de 61 pacientes portadores do HIV com idade superior a 18 anos atendidos no Instituto de Infectologia Emílio Ribas. Desses pacientes, 7 apresentavam lesões de candidose orofaríngea e 54 não tinham manifestações de candidose na cavidade bucal.

A coleta da amostra da lesão de candidose foi realizada por meio de um swab esterilizado imediatamente colocado em tubo de ensaio contendo solução fisiológica esterilizada (NaCl 0,85%) e transportado ao Laboratório de Análises Clínicas do Instituto de Infectologia Emílio Ribas, onde as amostras foram semeadas em ágar Sabouraud Dextrose com cloranfenicol (Difco, Detroit, EUA) e CHROMágar *Candida* (CHROMágar, Paris, França). As placas foram incubadas a 37°C durante 48 horas. A seguir, as placas foram transportadas para o Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP.

A coleta de amostra de saliva dos pacientes sem lesões de candidose foi realizada por meio de enxágüe bucal com 10 mL de solução fisiológica esterilizada e tamponada com fosfato (PBS) durante 30 segundos, utilizando coletor universal estéril e descartável. As amostras foram mantidas em gelo e bolsa térmica até serem levadas ao Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP, respeitando-se o período máximo de 3 horas entre a coleta e o processamento das amostras.

No Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, as amostras foram centrifugadas a 2300 Xg por 10 minutos, sendo o sobrenadante descartado. A seguir, o depósito foi ressuspensionado em 2,5 mL de PBS e misturado em agitador de tubos por 30 segundos, produzindo assim a suspensão de concentração final. As suspensões obtidas foram semeadas em duplicata em placas de petri contendo ágar Sabouraud Dextrose com cloranfenicol (Difco, Detroit, EUA) e CHROMágar *Candida* (CHROMágar, Paris, França). As placas foram incubadas a 37°C durante 48 horas.

Após o crescimento, as colônias características de leveduras do gênero *Candida* foram semeadas em tubos de ensaio contendo ágar Sabouraud Dextrose Inclinado (Difco, Detroit, EUA) para isolamento das cepas e obtenção da cultura pura. Esses tubos foram incubados a 37°C durante 48 horas.

As culturas puras foram identificadas fenotipicamente de acordo com as seguintes provas: formação de tubo germinativo, microcultivo e identificação pelo sistema API 20C AUX.

Para realização do tubo germinativo, uma alçada de cultura pura de 24 horas da levedura foi adicionada em tubo de ensaio contendo 0,5 mL de soro estéril de coelho. Os tubos foram incubados em banho-maria a 37°C por duas horas. A formação de tubo germinativo foi observada em microscópio de luz, colocando-se uma gota da suspensão entre lâmina e lamínula por período de até três horas.

Para a formação do microcultivo foi utilizado o meio Corn Meal Agar (Difco, Detroit, EUA) adicionado de 1% de tween 80. Para a execução da prova, o ágar previamente fundido foi distribuído em lâminas de vidro colocadas no interior de placas de Petri esterilizadas. Após solidificação do ágar, cada cepa de levedura a ser testada foi semeada em estria única na superfície do meio e foi colocada uma lamínula no centro da lâmina. Após incubação por 48 a 72 horas à temperatura ambiente, a leitura foi feita em microscópio óptico, observando-se presença de clamidoconídeo, leveduras e hifas.

As propriedades bioquímicas de fermentação e assimilação de carboidratos foram avaliadas pelo sistema API 20C AUX (BioMérieux, Paris, França).

Resultados

Foram coletadas amostras de 61 pacientes HIV-positivos, sendo 7 com lesões de candidose orofaríngea e 54 sem lesões de candidose na cavidade bucal. Dos 54 pacientes sem lesões de candidose na cavidade bucal, 34 pacientes (63%) apresentaram leveduras de *Candida* na cavidade bucal e 20 pacientes (37%) foram negativos para o gênero *Candida*.

Entre os pacientes com lesões de candidose orofaríngea, foram obtidos 75 isolados e entre os pacientes sem lesões de candidose foram obtidos 232 isolados. Todos os isolados foram testados quanto à capacidade de formar tubos germinativos e produzir hifas/clamidoconídeos em microcultivo. Os resultados obtidos nestes testes permitiram a diferenciação entre espécies de *Candida albicans* e não *albicans*, auxiliando na seleção das cepas

a serem submetidas ao sistema de identificação API 20C AUX.

Até o momento, foram identificados pelo API 20C AUX, 12 isolados de *Candida* dos pacientes com candidose orofaríngea. Entre os 34 pacientes portadores de *Candida*, foram identificados 44 isolados.

Na Figura 1 observa-se o percentual de isolados identificados como *C. albicans* nos pacientes com candidose orofaríngea e nos pacientes não lesionados. A Figura 2 mostra a distribuição das espécies não *albicans* identificadas.

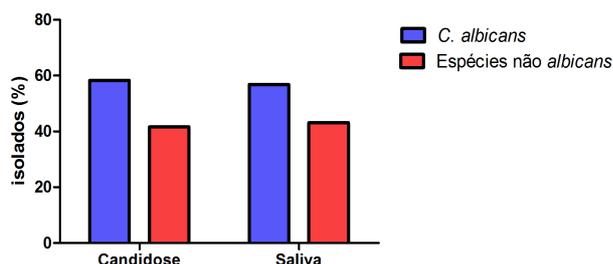


Figura 1 - Percentual de isolados identificados como *C. albicans* e espécies não *albicans* entre os pacientes com candidose orofaríngea e os pacientes sem lesões de candidose na cavidade bucal

Espécies não *albicans* identificadas

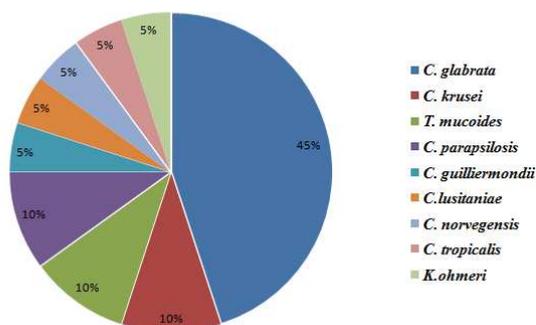


Figura 2- Distribuição das espécies não *albicans* isoladas da cavidade bucal de pacientes portadores do HIV.

Discussão

As amostras dos 61 pacientes coletadas neste trabalho foram semeadas em ágar Sabouraud Dextrose com cloranfenicol e CHROMagar *Candida*. No meio de cultura CHROMagar *Candida*, houve crescimento de colônias verdes, azuis, rosas, roxas e brancas. Segundo SIVAKUMAR et al. (2009), colônias verdes são sugestivas de *Candida albicans*,

colônias azuis acinzentadas de *Candida tropicalis*, e colônias rosas de *Candida krusei*.

Os resultados obtidos no API foram coerentes com os dados obtidos no CHROMagar e nos testes de tubo germinativo e microcultivo, pois a espécie identificada como *C. albicans* pelo sistema API, apresentou colônias verdes e foi positiva para tubo germinativo e clamidoconídeo. A espécie identificada como *C. tropicalis* formou colônias azuis e foi negativa para tubo germinativo e clamidoconídeos e a espécie identificada com *C. glabrata* formou colônias rosas e beges e foi negativa para o tubo germinativo e clamidoconídeos. Este resultado está de acordo com o estudo de GHELARDI et al. (2007).

Nas amostras identificadas, tanto no grupo de pacientes com candidose orofaríngea quanto no grupo não lesionados houve maior prevalência da espécie de *C. albicans* em relação às demais espécies. Os índices foram semelhantes entre os grupos: nos lesionados obtivemos 58,33% de *C. albicans* e nos não lesionados foram 59,52%. Esses dados estão de acordo com a literatura. DARWAZEH et al. (2010) estudaram 149 pacientes saudáveis e sua colonização pelas leveduras do gênero *Candida*. Os autores relataram que 57,7% dos pacientes eram portadores das leveduras e desses isolados 52,4% eram *C. albicans*. LUQUE et al. (2008) isolaram e identificaram *Candida* ssp. de 73 pacientes HIV-positivos e a frequência de *C. albicans* foi de 60,7%.

Em relação as espécies não *albicans* foram identificadas cepas de *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis*, *C. norvegensis*, *C. lusitanae* e *C. guilliermondii*. De acordo com a literatura, *C. norvegensis* tem sido causa rara de infecção em seres humanos. Foi isolada pela primeira vez na Noruega há 60 anos e o primeiro relatório de infecção clínica com esta espécie surgiu em 1990, num caso de paciente transplantado renal imunossuprimido em diálise peritoneal contínua (HOOD et al. 1996). *C. norvegensis* foi considerada uma espécie não *albicans* de alta patogenicidade em todos os casos de infecção por essa espécie da Dinamarca e de relevância clínica em dois de quatro casos no Reino Unido, portanto NIELSEN E STENDERUP (1996) relataram que esta espécie deve ser incluída entre as espécies não-*albicans* capazes de causar sérias infecções em pacientes imunocomprometidos.

Também houve a identificação de *Kodamaea ohmeri* no grupo de pacientes não lesionados. Esta é uma forma de levedura atípica que tem sido identificada recentemente como importante fator etiológico de fungemias, endocardite, celulite e peritonite em pacientes

imunocomprometidos. Pertencente a família Saccharomycetaceae, se reproduz sexuadamente e é amplamente utilizado na indústria de alimentos para a fermentação de frutas, picles e cascas (SHAABAN et al. 2010; YAMADA et al. 1995). Há somente 21 casos relatados na literatura médica mundial de infecção por *K. ohmeri* e estas são relacionadas a fatores predisponentes como diabetes mellitus, uso de cateteres venosos, neoplasias malignas, transplantes de órgãos e uso de drogas injetáveis (DE BARROS et al. 2009; BING-HENG et al. 2009; GARCIA-TAPIA et al. 2007; MAHFOUZ et al. 2008).

No grupo de pacientes não lesionados houve a identificação de *Trichosporon mucoides*. Este é um fungo da família Trichosporonaceae encontrado principalmente no solo e na microbiota da pele humana. Existem poucos relatos de infecções sistêmicas por *T. mucoides*, segundo LACASSE et al (2009) quando isso ocorre, esta levedura geralmente está associada a doenças hematológicas malignas, transplantados e outros estados patológicos em que o sistema imunológico humano esteja comprometido (NETTLES et al. 2003).

Em resumo, os resultados deste trabalho mostram a prevalência de espécies de *Candida* em pacientes portadores do HIV tanto nos isolados de candidose orofaríngea como nos isolados de pacientes sem lesões de candidose. Culturas mistas foram obtidas em maior quantidade no grupo de pacientes com candidose orofaríngea em relação ao grupo de pacientes sem candidose bucal e *C. albicans* foi a espécie mais prevalente nos grupos estudados.

Conclusão

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que:

- Entre os pacientes portadores do HIV sem lesões de candidose bucal, 63% eram portadores de leveduras;
- *C. albicans* foi a espécie mais prevalente tanto nos isolados de candidose orofaríngea como nos isolados de pacientes sem lesões de candidose;
- Entre as espécies não *albicans*, foram encontradas: *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis*, *C. norvegensis*, *C. lusitanae*, *C. guilliermondii*, *T. mucoides* e *K. ohmeri*.
- Culturas mistas foram obtidas em maior quantidade no grupo de pacientes com candidose orofaríngea em relação ao grupo de pacientes sem candidose bucal.

Agradecimentos

Agradecemos pelo suporte financeiro à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (processo 07/54442-3).

Referências

- AL MOSAID, A.; SULLIVAN, D.; SALKIN, I.F.; SHANLEY, D.; COLEMAN, D.C. Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* on Staib agar and caffeic acid-ferric citrate agar. **J Clin Microbiol.** 2001; 39:323-7.
- BING-HENG, Y.; MING-YIEH, P.; SHU-JIN, H.; JUN-REN, S.; SHIH-YI, L.; JANG-JIH, L. Fluconazole-resistant *Kodamaeae ohmeri* fungemia associated with cellulitis: case report and review of the literature. **Int J Infect Dis.** 2009; 13:493-97.
- DARWAZEH, A.M.G.; HAMMAD, M.M.; AL-JAMAEI, A.A. The relationship between oral hygiene and oral colonization with *Candida* species in healthy adult subjects. **Int J Dent Hygiene.** 2010; 8:128-33.
- DE BARROS, J.; DO NASCIMENTO, S.; DE ARAÚJO, F.; BRAZ, R.; ANDRADE, V. *Kodamaeae (Pichia) ohmeri* fungemia in a pediatric patient admitted in a public hospital. **Medical Mycology.** 2009; 47:775-79.
- DONNELLY, R.F.; MCCARRON, P.A.; TUNNEY, M.M. Antifungal photodynamic therapy. **Microbiol Res** 163:1-12, 2008.
- GARCIA-TAPIA, A.; GARCIA-AGUDO, R.; MARIN, P.; CONEJO, J.L.; GARCIA-MARTOS, P. *Kodamaeae ohmeri* fungemia associated with surgery. **Ver Iberoam Micol.** 2007; 24:155-6.
- GHELARDI, E.; PICHIERRI, G.; CASTAGNA, B.; BARNINI, S.; TAVANTI, A.; CAMPA, M. Efficacy of chromogenic *Candida* Agar for isolation and presumptive identification of pathogenic yeast species. **Clin Microbiol Infect.** 2008; 14:141-47.
- HAMZA, O.J.M.; MATEE, M.I.; MOSH, M.J.; SIMON, F.M.; MIKX, F.H.M.; MUGUSI, F.; HELDERMAN, W.H.P et al. Species distribution and *in vitro* antifungal susceptibility of oral yeast isolates from Tanzanian HIV infected patients with primary and recurrent oropharyngeal candidiasis. **BMC Microbiology.** 2008; 8:135.
- HOOD, S.V.; MOORE, C.B.; DENNING, D.W. Isolation of *Candida norvegensis* from clinical specimens: four case reports. **Clin Infect Dis.** 1996; 23:1185-1187.
- LACASSE, A.; CLEVELAND, K.O. *Trichosporon mucoides* fungemia in a liver transplant recipient: case report and review. **Transpl Infect Dis.** 2009;

11:155-9.

-LUQUE, A.G.; BIASOLI, M.S.; TOSELLO, M.E.; BINOLFI, A.; LUPO, S.; MAGARÓ, H.M. Oral yeast carriage in HIV-infected and non-infected populations in Rosario, Argentina. **Mycoses**. 2008; 52:53-59.

-MAHFOUZ, R.A.; OTROCK, Z.K.; MEHAWAJ, H.; FARHAT F. *Kodamaeae* (*Pichia ohmeri*) fungemia complicating acute myeloid leukaemia in a patient with haemochromatosis. **Pathol**. 2008; 40:99-101.

-MANINDER, J.; USHA, A. Isolation, characterization and antifungal susceptibility pattern PF *Candida* species causing oropharyngeal candidiasis in HIV positive patients. **J Commun Dis**. 2008; 40(3): 177-81.

-MARTINS, M.N.; DANESE, C.C.; UNFER, D.T. Bucal candidosis literature review. **Saúde**. 2005; 31:16-26.

-MEILLER, T.F.; HUBE, B.; SCHILD, L.; SHIRTLIFF, M.E.; SCHEPER, M.A.; WINKLER, R.; TON, A.; RIZK, M.A.J. A novel immune evasion strategy of *Candida albicans* proteolytic cleavage of a salivary antimicrobial peptide. **PLoS ONE**. 2009; 4:e5039.

-NETTLES, R.E.; NICHOLS, L.S.; BELL-MCGUINN, K.; PIPELING, M.R.; SCHEEL, P.J.JR.; MERZ, W.G. Successful treatment of *Trichosporon mucoides* infection with fluconazole in a heart and kidney transplant recipient. **Clin Infect Dis**. 2003; 36:63-6.

-NIELSEN, H.; STENDERUP, J. Invasive *Candida norvegensis* infection in immunocompromised patients. **Scand J Infect Dis**. 1996; 28:311-12.

-PEREA, S.; RIBOT, J.L.L.; WICKES, B.L.; KIRKPATRICK, W.R.; DIB, O.P.; BACHMANM, S.P. et al. Molecular mechanisms of fluconazole resistance in *Candida dubliniensis* isolates from HIV infected patients with oropharyngeal candidiasis. **Antimicrob Agents Chemother**. 2002; 46: 1695-703.

-SHAABAN, H.; CHOO, H.F.; BOGHOSSIAN, J.; PEREZ, G. *Kodamaeae ohmeri* fungemia in an immunocompetent patient treated with micafungin: case report and review of the literature. **Mycopathologia**. 2010; DOI: 10.1007/s11046-010-9315-4.

-SIVAKUMAR, V.G.; SHANKAR, P.; NALINA, K.; MENON, T. Use of CHROMagar in the differentiation of common species of *Candida*. **Mycopathologia**. 2009; 167:47-49.

-TEICHERT, M.C; JONES, J.W; USACHEVA, M.N; BIEL, M.A. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 93:155-160, 2002.

-WILSON, M; MIA, N. Sensitization of *Candida albicans* to killing by low-power laser light. **J Oral Pathol Med**. 22:354-357, 1993.

-YAMADA, Y.; SUZUKI, T.; MATSUDA, M.; MIKATA, K. The phylogeny of *Yamadazyma ohmeri* (Etchells ET Bell) Billon-Grand based on the partial sequences of 18S and 26S ribosomal RNAs: the proposal of *Kodamaeae* gen. nov. (Saccharomycetaceae). **Biosci Biotechnol Biochem**. 1995; 59:1172-4.