

Isolamento de *Candida dubliniensis* da mucosa oral de um paciente com SIDA, no Rio Grande do Sul

Candida dubliniensis isolation from AIDS patient's oral mucosa in Rio Grande do Sul

SINOPSE

Candida dubliniensis é uma espécie de *Candida* recentemente reconhecida, com características muito semelhantes a *C. albicans*, mas, causando, principalmente, candidíase oral em pacientes com SIDA. Relatamos o primeiro isolamento desta espécie no Rio Grande do Sul, em paciente com SIDA, mas sem lesões de candidíase oral. A identificação fenotípica se baseou na emissão de tubo germinativo, superprodução de clamidocóndios com disposição terminal em pares ou trios, assimilação da sacarose, mas não da xilose e incapacidade de crescimento a temperatura de 42-45°C. A identificação genotípica, confirmando a espécie, foi realizada através de RAPD (Randomly amplified polymorphic DNA). Aspectos relacionados ao isolamento, identificação e rápido desenvolvimento da resistência *in vitro* ao fluconazol são também discutidos.

UNITERMOS: *Candida dubliniensis*, Micoses Oportunistas, SIDA.

ABSTRACT

Candida dubliniensis is a newly described species which is closely related phylogenetically to *Candida albicans* and which is commonly associated with oral candidiasis in human immunodeficiency virus-positive patients. In this paper we relate the first isolation of *C. dubliniensis* in the state of Rio Grande do Sul (Brazil) in an AIDS patient without oral candidiasis lesions. The phenotypic identification was based on germ tube emission, the hyperproduction of chlamydoconidia that were arranged in contiguous pairs and triplets, on the assimilation of sucrose but not xylose and on the lack of growth at 42-45°C. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis confirmed the distinct genetic nature of *Candida dubliniensis*. Problems related with isolation, identification and ease with which it is possible to induce stable fluconazole resistance *in vitro*, are also discussed.

KEY WORDS: *Candida Dubliniensis*, Opportunistic Mycoses, AIDS.

SYDNEY HARTZ ALVES – Prof. Adjunto de Microbiologia. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

GILSON M. SILVA – Médico Residente do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM).

PAULA ADRIANA SCOPEL – Acadêmica do Curso de Veterinária, UFSM. Bolsista do Programa PBIC/CNPq.

LOIVAT. OTTONELLI OLIVEIRA – Farmacêutica-bioquímica. Laboratório de Micologia do HUSM.

JANE MARGARETH COSTA – Médica Infectologista do HUSM.

EVELINE P. MILÁN – Médica Infectologista do Laboratório Especial de Micologia da Escola Paulista de Medicina. São Paulo, Brasil.

ARNALDO L. COLOMBO – Médico Infectologista do Laboratório Especial de Micologia da Escola Paulista de Medicina. São Paulo, Brasil.

✉ Endereço para correspondência:

Sydney Hartz Alves
Rua Venâncio Aires 2766/403
97010-004 – Santa Maria – RS
Fone: (55) 220.8751
✉ hartzsa@fatecnet.ufsm.br

individualidade da nova espécie chamada *C. dubliniensis*. No presente trabalho, relatamos o primeiro isolamento de *C. dubliniensis* no Rio Grande do Sul.

RELATO DO CASO

No ambulatório para SIDA do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), dentro de um protocolo para monitoramento da suscetibilidade de fungos leveduriformes, todos os pacientes, apresentando ou não lesões orais, eram submetidos a tomada de amostra do sulco gengival e porção média da língua, com um swab.

R.G.M., feminina, branca, 32 anos, natural e procedente de Santa Maria, (RS) recebia atendimento regular no Ambulatório de SIDA do HUSM, desde 1997. A paciente tinha também diagnóstico de Linfoma de Burkitt de alto grau.

INTRODUÇÃO

Nos últimos vinte anos ocorreu significativo aumento de infecções oportunistas causadas pelo gênero *Candida*, sobretudo entre pacientes com SIDA ou apenas infectados pelo HIV (1).

Candida albicans ainda representa a espécie mais frequente nestas infecções, entretanto, outras espécies como *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. glabrata* têm tido significativo au-

mento. A menor suscetibilidade de *C. krusei* e *C. glabrata* ao fluconazol é uma das implicações terapêuticas importantes desta mudança no espectro das candidíases (1, 2).

Em 1995, na Irlanda, Sullivan et al. (3) descreveram uma espécie de *Candida*, freqüentemente isoladas da cavidade oral de pacientes com SIDA e que apresentavam história de candidíase recorrente, apesar da terapêutica com fluconazol. Com base em estudos fenotípicos e genotípicos confirmou-se a

Na consulta de 26.01.1999 apresentava-se sem queixas, referindo boa alimentação, ausência de alterações urinárias, intestinais ou respiratórias. Estava utilizando Indinavir (2,4 g/dia), Lamivudina/zidovudina (1 comp 12/12h) e Sulfametoxazol+trimetoprin (2 comp./dia). A paciente não apresentava lesões orais, mas foi coletado material da língua e sulco gengival. O material coletado foi semeado em ágar Sabouraud com antibacterianos. Após 48 h de incubação a 30°C observou-se o crescimento de colônias branco-cremosas que, em preparação a fresco com lactofenol azul-algodão, evidenciou apenas blastoconídios. A identificação preliminar consistiu na produção de tubo germinativo, sendo positivo em soro humano após 2 h de incubação a 37°C. Concomitantemente, a amostra foi semeada em Corn meal agar (Difco) para a produção de clamidoconídios. Após 5 dias de incubação observou-se grande quantidade de clamidoconídios formando pares ou trios nas extremidades das hifas. O grande número e a disposição dos mesmos era

compatível com as recentes descrições sobre *C. dubliniensis*. A incapacidade de crescimento a 42°C veio confirmar nossa suspeita e, provas adicionais como a assimilação da sacarose, mas não da xilose, confirmaram fenotipicamente *C. dubliniensis*. Os testes de suscetibilidade, realizados de acordo com os procedimentos preconizados pelo documento M27-A do NCCLS (4), evidenciaram concentração inibitória mínima (CIM) de 0,5µg/ml ao fluconazol e de 0,125µg/ml a anfotericina B, ou seja, franca sensibilidade aos antifúngicos. Posteriormente, o isolado foi submetido a identificação genotípica através da técnica de amplificação do DNA (PCR) no Laboratório Especial de Micologia da Escola Paulista de Medicina, confirmando-se como *C. dubliniensis*.

O acompanhamento da paciente com repetidas coletas não permitiram novo isolamento, assim como não se verificou o desenvolvimento de candidíase. A paciente continua sendo acompanhada no ambulatório de SIDA do Hospital Universitário de Santa Maria (RS).

DISCUSSÃO

C. dubliniensis é fenotipicamente muito semelhante a *C. albicans*, porque evidencia tubo germinativo e produz clamidoconídios. Seu reconhecimento tem importância porque sua presença está relacionada a candidíases recorrentes da cavidade oral de pacientes com SIDA e também porque existe a capacidade destes fungos, rapidamente, desenvolverem resistência ao fluconazol (5), mesmo que inicialmente sensíveis (1, 2, 5),

Esta espécie já foi identificada em pacientes da Argentina, Austrália, Bélgica, Canadá, França, Finlândia, Alemanha, Grécia, Irlanda, Espanha, Suíça, Reino Unido e Estados Unidos (2, 3, 5). No Brasil, em 1999, Milán et al (6), em São Paulo, relataram o primeiro caso brasileiro. Com relação a incidência desta levedura, os melhores dados disponíveis são os da população irlandesa, onde foi isolada da boca de 27% de indivíduos HIV positivos e de 32% de pacientes com SIDA e candidíase oral. Da cavidade oral de indivíduos sadios foi isolada de 3% e dos HIV negativos, mas com candidíase oral foi 14,6% (2,3,5). Segundo Sullivan & Coleman (2), na maioria dos casos se isola *C. albicans* e *C. dubliniensis* na mesma placa e, como a identificação é desenvolvida a partir de uma única colônia, *C. dubliniensis* pode ser negligenciada ou erroneamente identificada, com base na produção de tubo germinativo. Nesse sentido, há grande preocupação de vários autores na inclusão de meios de isolamento que permitam a identificação preliminar de *C. dubliniensis*, como é o caso do Chromagar Candida (CHROMagar Microbiology, Paris, França) e do ágar Sabouraud com azul de metileno que evidencia fluorescência de *C. albicans*, mas não em *C. dubliniensis*, permitindo diferenciá-las (7, 8, 9). Os testes fenotípicos que permitem a caracterização de *C. dubliniensis* incluem sacarose (+), xilose(-), ausência de crescimento a 42-45°C, ausência de β-glicosidase, coagregação com culturas de *Fusobacterium nucleatum* (10) e identificação por imunofluorescência indireta (11).

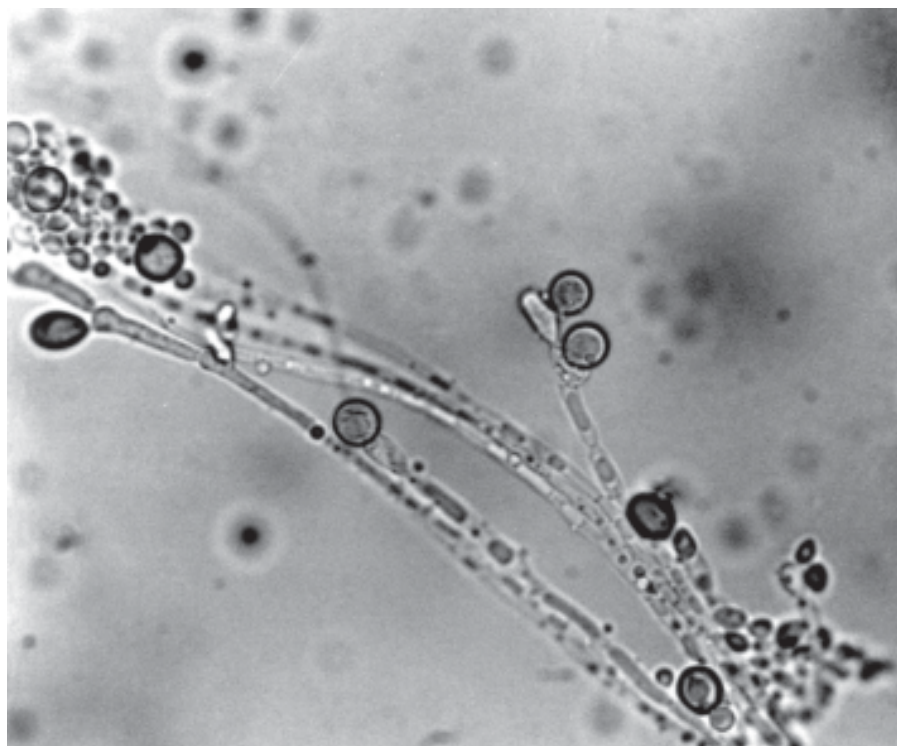


Figura 1 – Microcultivo de *C. dubliniensis* em ágar-fubá, evidenciando abundantes clamidoconídios (400x).

Clinicamente, *C. dubliniensis* aparece mais frequentemente associada com episódios recorrentes da forma eritematosa de candidíase oral. Quadros semelhantes também podem ocorrer em indivíduos não infectados pelo HIV e mesmo em indivíduos saudáveis. No presente caso, o isolamento ocorreu em circunstâncias distintas das relatadas pela maioria dos autores, ou seja, o isolamento a partir de paciente com SIDA, mas sem lesão oral. Além de ser isolada a partir da cavidade oral, *C. dubliniensis* tem sido mais raramente isolada da vagina e de fezes de pacientes imunocomprometidos; há um caso descrito de candidemia em paciente com câncer e dois outros em transplantados de medula óssea (12).

A emergência de *C. dubliniensis* tem sido atribuída a importante redução da imunidade e/ou à terapêutica antifúngica, que pode selecionar espécies menos sensíveis como *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. dubliniensis*. Apesar desta possibilidade, os estudos da suscetibilidade de *C. dubliniensis* têm revelado que a grande maioria dos isolados é inicialmente sensível ao fluconazol e à anfotericina B, embora 3% dos isolados tenham sido inicialmente resistentes ao fluconazol. Ademais, são também importantes as observações sobre a indução da resistência *in vitro*, que é rápida e duradoura, mas não cruzada com os demais azólicos e não se verificando em *C. albicans* (2, 5). No presente caso, observou-se sensibilidade ao fluconazol e anfotericina B, o que está de acordo com a maioria dos autores (1, 3, 5); todavia o potencial para desenvolvimento rápido da resistência ao fluconazol não foi observado após sucessivos subcultivos em presença de baixas concentrações de fluconazol.

O presente achado sugere que *Candida dubliniensis* também pode fazer parte da microbiota oral de pacientes imunocomprometidos; os estudos de

Jabra-Rizk (10) demonstrando a coagregação de *C. dubliniensis* com *Fusobacterium nucleatum* podem explicar tal ocorrência, e ao mesmo tempo sinalizam que as associações entre microrganismos de baixa virulência podem ser significativas nos pacientes imunocomprometidos. A potencialidade de *C. dubliniensis* em desenvolver resistência ao fluconazol impõe que nos pacientes com SIDA se valorize achados como os aqui apresentados. Frente ao exposto, cabe salientar que, devido ao pouco conhecimento sobre *C. dubliniensis*, é de grande interesse em infectologia determinar a incidência desta nova espécie, além do desenvolvimento de estudos clínicos e laboratoriais objetivados a esclarecer sua virulência, suas implicações terapêuticas e precisa função na patogênese das candidíases (1,11,12).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- MORAN GP, SULLIVAN DJ, HENMAN MC, MCCREARY CE, HARRINGTON BJ, SHANLEY DB, COLEMAN DC. Antifungal drug susceptibilities of oral *Candida dubliniensis* isolates from Human Immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected subjects and generation of stable fluconazole-resistant derivatives *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997; 41:617-623.
- SULLIVAN DJ, MORAN G, DONNELLY S, GEE S, PINJONE, MCCARTAN B, SHANLEY DB, COLEMAN DC. *Candida dubliniensis*: an update. *Revista Iberoamericana de Micologia* 1999; 16:72-76.
- SULLIVAN DJ, WESTERNENG TJ, HAYNES KA, BENNETT DE. Coleman DC. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology* 1995; 141:1507-1521.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1997. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Approved standard M27-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
- SULLIVAN D, COLEMAN D. *Candida dubliniensis*: characterization and identification. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36: 329-334.
- MILAN EP, COLOMBO AL, LAET SANT'ANA P, LEWIS DS, MELO ASA. Primeiro isolamento da *Candida dubliniensis* no Brasil. *Anais do XI Congresso Brasileiro de Infectologia*. São Paulo, agosto de 1999. Resumo.
- PINJON E, SULLIVAN D, SALKIN I, SHANLEY D, COLEMAN D. Simple, inexpensive, reliable method for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36:2093-2095.
- SALKIN IF, PRUITT WR, PADHYE AA, SULLIVAN D, COLEMAN D, PINCUS DH. Distinctive carbohydrate assimilation profiles used to identify the first clinical isolate of *Candida dubliniensis* recovered in the United States. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36:1467.
- KOEHLER AP, CHU KC, HOUANG ETS, CHENG AFB. Simple, reliable and cost-effective yeast identification scheme for the clinical laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37: 422-426.
- JABRA-RIZK MA, FALKLER WA, MERZ WG, KELLEY JI, BAQUI AM, MEILLER TF. Coaggregation of *Candida dubliniensis* with *Fusobacterium nucleatum*. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37: 1464-1468.
- BIKANDI J, SAN MILÁN R, MORAGUES MD, CEBAS G, CLARKE M, COLEMAN DC, SULLIVAN DJ, QUINDÓS G, PONTÓN J. Rapid identification of *Candida dubliniensis* by indirect immunofluorescence based on differential localization of antigens on *C. dubliniensis* blastospores and *Candida albicans* germ tubes. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36:2428-2433.
- KIRKPATRICK WR, REVANKAR SG, MCATEE RK, LOPEZ-RIBOT J, FOTHERGILLAW. MCCARTHY DI, SANCHE SE, CANTU RA, RINALDI MG, PATTERSON TF. Detection of *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples from human immunodeficiency virus-infected patients in North America by primary CHROMagar *Candida* screening and susceptibility testing of isolates. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36: 3007-3012.