

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS  
UNIFAL - MG**

**ANDRÉ LUÍS RIBEIRO CLAUDINO**

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Candida* spp DE CAVIDADE BUCAL  
QUANTO AOS ASPECTOS FENOTÍPICOS E MOLECULARES E OBTENÇÃO DE  
MUTANTES HETERORESISTENTES À ANTOTERICINA B E FLUCONAZOL**

**ALFENAS, MG**

**2007**

**ANDRÉ LUÍS RIBEIRO CLAUDINO**

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Candida* spp DE CAVIDADE BUCAL  
QUANTO AOS ASPECTOS FENOTÍPICOS E MOLECULARES E OBTENÇÃO DE  
MUTANTES HETERORESISTENTES À ANTOTERICINA B E FLUCONAZOL**

**Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado  
em Ciências Farmacêuticas da UNIFAL–MG como  
parte dos requisitos para obtenção do título de  
mestre.**

**Orientadora: Profa. Dra. Marília Caixeta Franco.  
Co-Orientador: Prof. Dr. Jorge Kleber Chavasco.**

**ALFENAS, MG**

2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS – UNIFAL/MG

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO

A comissão examinadora, abaixo-assinada, aprova a dissertação " CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Candida* spp DE CAVIDADE BUCAL QUANTO AOS ASPECTOS FENOTÍPICOS E MOLECULARES E OBTENÇÃO DE MUTANTES HETERORESISTENTES À ANTOTERICINA B E FLUCONAZOL", elaborada por André Luís Ribeiro Claudino, como requisito parcial para conclusão do Curso de Mestrado em Ciências Farmacêuticas.

Banca examinadora:

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Marília Caixeta Franco (UNIFAL/MG) - Presidente

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria José Soares Mendes Giannini (UNESP-SP)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Márcia de Souza Carvalho Melhem (Instituto Adolfo Lutz – SP)

Alfenas, 13 de julho de 2007.

Aos meus pais pelo amor e confiança incondicional em mim depositado, e por me fazer acreditar que não se pode ensinar tudo, mas sim ajudar a encontrar o caminho por si mesmo.

Aos meus irmãos Luciana, Cristhiano e Viviany pelo amor e carinho.

À Nara Heloise pelo amor e por fazer meus dias em Alfenas muito mais felizes.

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra Marília Caixeta Franco e ao Prof. Dr. Jorge Kleber Chavasco, pela orientação.

Ao amigo Rafael Fávero Peixoto Júnior pelo auxílio nos experimentos e por contar sempre com sua ajuda e à Angélica de Souza pela grande ajuda na fase inicial dos experimentos.

À Prof. Dra. Márcia de Souza Carvalho Melhem e à Profa. Dra. Maria Walderez Szeszs pela amizade e pela oportunidade de parceria com o Instituto Adolfo Lutz na execução de parte dos experimentos.

A todos os amigos do Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos por escutar minhas canções e fazer que dias difíceis se tornassem mais tranquilos.

A todos do Laboratório de Microbiologia pelos anos que passamos juntos. Em especial à prof. Dra. Amanda L. T. Dias e à profa. Dra. Juliana P. Lyon pela amizade.

A todos os amigos da seção de micologia do Instituto Adolfo Lutz que me fizeram sentir em casa na “selva de pedra”.

Aos membros da banca examinadora Maria J. S. M. Giannini, Márcia S. C. Melhem, Amanda L. T. Dias e Antonio M. Siqueira pelas valiosas sugestões em nosso trabalho.

E aos grandes amigos que conquistei durante minha formação: André, Brunin, Pablo, Alessandro, Feliciano, Ricardo, Rodrigo, Eduardo, Pedro, irmãos Paraizo, Maria Betânia, Maurette e Cristiane pelo companheirismo e pela amizade.

E a todos que contribuíram, direto ou indiretamente, na execução deste trabalho.

## RESUMO

Nos últimos anos o aumento na incidência de candidose superficial e invasiva causada por espécies emergentes resistentes tem sido atribuído a disseminação do uso de antibióticos e agentes imunossupressores. O aumento de *Candida não-albicans* deve-se ao incremento de pacientes imunodeprimidos, neutropênicos, recém nascidos de baixo peso, procedimentos invasivos e iatrogenia. Todos esses fatores permitem que agentes pouco virulentos, causem doenças. Vários estudos bioquímicos e moleculares foram realizados no sentido de elucidar as causas da resistência a antifúngicos em leveduras. Os objetivos do presente estudo foram: estudar leveduras do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal de pacientes com e sem HIV; comparação de métodos de identificação dos isolados; determinar o perfil de sensibilidade aos antifúngicos anfotericina B e fluconazol pelas metodologias de microdiluição CLSI, AFST-EUCAST e difusão em agar Etest e obter amostras heterorresistentes à anfotericina B e ao fluconazol por indução e seleção. Foram identificados 22 isolados de *C. albicans*, 3 de *C. tropicalis*, 3 de *C. parapsilosis* e 2 de *C. glabrata* segundo o método clássico. A identificação por métodos morfológicos e bioquímicos foi 100% concordante com o método molecular (PCR), tanto pela amplificação dos *primers* espécies-específicos (*C. albicans* e *C. dubliniensis*) quanto pela comparação do tamanho do fragmento amplificado pelos *primers* da região ITS2. A correlação entre a metodologia Etest e os dois métodos de microdiluição foi alta. Todas as amostras selvagens foram sensíveis a anfotericina B (CIM $\leq$ 2,0 $\mu$ g/mL) e apenas um isolado (3,33%) de *C. tropicalis* foi resistente ao fluconazol (CIM $\geq$ 64,0 $\mu$ g/mL por CLSI e CIM $\geq$ 64,0 $\mu$ g/mL por AFST-EUCAST). Foram selecionadas amostras heteroresistentes através da pressão seletiva utilizando meio adicionado de fluconazol (8 $\mu$ g/mL) e em seguida com anfotericina B (1,0 $\mu$ g/mL). A pressão seletiva também foi feita iniciando-se com anfotericina B e em seguida fluconazol. Paralelamente, as amostras selvagens foram submetidas à indução de resistência através do cultivo primeiro em concentrações crescentes de fluconazol (16,0; 32,0; 64,0; 128 e 256 $\mu$ g/mL) e em seguida com anfotericina B (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 $\mu$ g/mL). Os testes também foram feitos invertendo-se os antifúngicos, iniciando com anfotericina B e depois fluconazol. Foram obtidas três amostras heterorresistentes a fluconazol, das quais duas foram por indução (*C. glabrata* e *C. tropicalis*) e uma por seleção (*C. tropicalis*). Ambas amostras de *C. tropicalis* foram originadas de um mesmo isolado selvagem. Nenhuma amostra mudou seu perfil de sensibilidade para anfotericina B, apesar de alguns isolados apresentarem capacidade de crescimento em várias concentrações deste antifúngico (1,0 a 3,0 $\mu$ g/mL). Após cultivos sucessivos em meio livre de droga, somente a cepa obtida por seleção manteve seu fenótipo de resistência. As cepas selvagens e suas mutantes apresentaram o mesmo perfil quando comparadas pela amplificação da região ITS2. Conclui-se que, embora a maior parte das espécies estudadas seja *C. albicans* (73,33%) todas as amostras heteroresistentes ao fluconazol obtidas foram *Candida não-albicans* (10%). As duas cepas mutantes obtidas pelo mesmo isolado inicial possuem, possivelmente, mecanismos múltiplos e distintos de resistência que, associado ao isolado, conferem resistência e/ou adaptabilidade à levedura frente ao antifúngico.

**Palavras-chave:** Drogas - Resistência. *Candida*. Reação em cadeia de polimerase.

## ABSTRACT

In the last years the increase in the incidence of superficial and invasive candidosis caused by resistant species has been attributed to the use of antibiotics and immunosuppression drugs. The increase do *Candida non-albicans* isolate due to the increment of patient immunocompromised, immunodeficiency virus infection, neutropenic, newly born of low weight, procedures invasives and iatrogenic. All those factors allow that agents a little virulent, caused diseases. Several biochemical and molecular studies have been accomplished for elucidating the causes of resistance in yeasts. The aims of the present research were: to study yeasts of the gender *Candida* isolated of the buccal cavity patients with and without HIV; comparison of methods of identification of isolates ; to determine the sensibility profile to the amphotericin B and fluconazole antifungals by microdilution methodologies CLSI, AFST-EUCAST and Etest difusion agar and acquisition of heteroresistent samples to amphotericin B and to fluconazole by induction and selection experiments. Were identifications 22 *C. albicans*, 3 *C. tropicalis*, 3 *C. parapsilosis* and 2 *C. glabrata* through the classic methods. The identification by morphologic and biochemisth was 100% agreement with the results obtained by the molecular method (PCR), them by the amplification of the species with specific primers (*C. albicans* and *C. dubliniensis*) as for the comparison of the size of the fragment amplified by the primers of region ITS2. The correlation among the methodology Etest and the two microdilution methods (CLSI and AFST-EUCAST) was high. All samples wilds were suscetibility to amphotericin B (CIM $\leq$ 2,0 $\mu$ g/mL) and just one isolate (3,33%) of *C. tropicalis* was resistant to fluconazole (CIM $\geq$ 64,0 $\mu$ g/mL por CLSI e CIM $\geq$  64,0 $\mu$ g/mL por AFST-EUCAST). Resistant strains were obtained by selective pressure using a medium amended with Fluconazole (8  $\mu$ g/mL) and after that a medium with Amphothericin B (1.0  $\mu$ g/mL). The selective pressure was also performed using Amphothericin B at first followed by Fluconazole. Similarly, wild samples were submitted to the induction of resistance by culturing in increasing concentrations of Fluconazole (16.0; 32.0; 64.0; 128 e 256 $\mu$ g/mL) followed by culturing in increasing concentrations of Amphotericin B (0.5; 1.0; 1.5; 2.0; 2.5 e 3.0 $\mu$ g/mL) and, after that, inverting the antifungal agents: Amphotericin B at first, followed by Fluconazole. Three samples heteroresistant to Fluconazole were obtained, two of which obtained by induction (*C. glabrata* and *C. tropicalis*) and one by selection (*C. tropicalis*). Both *C. tropicalis* samples were originated from te same wild strain. None sample changed its susceptibily profile to amphotericin B, in spite of some isolates that presented capacity of growth in several concentrations of this antifungals (1,0 a 3,0 $\mu$ g/mL). After successive cultivations in medium free of drugs, only the sample obtained by selection maintained your resistance phenotype. The wild samples and their mutants presented the same profile when compared by the amplification of the region ITS2. In conclusion, although most of the studied species were *C. albicans* (73,33%), all the fluconazol-heteroresistant samples obtained were *Candida no-albicans* (10%). The two mutant samples obtained from the same initial isolate possibly possess multiple and different mechanisms of resistance that, associated to the isolate, confer resistance and/or adaptability to the yeast in front to antifungal.

**Key Words:** Resistance - Drug. *Candida*. Polimerase Chain Reaction.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|             |  |
|-------------|--|
| AB          | -Anfotericina B  |
| AFLP        | - <i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>  |
| AFST-EUCAST | - <i>Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing</i> |
| CFM         | -Concentração fungicida mínima   |
| CIM         | -Concentração Inibitória Mínima  |
| CLSI        | - <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>   |
| Fz          | -Fluconazol  |
| ITS         | -Região interna transcrita ( <i>internal transcribed spacer</i> )  |
| MOPS        | -Ácido 3-morfolino-propanossulfônico   |
| NOR         | -Regiões organizadoras de nucléolos  |
| PCR         | -Reação da Polimerase em cadeia ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )   |
| R           | -Resistente  |
| RFLP        | - <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>  |
| RAPD        | - <i>Random Amplification of Polymorphic DNA</i>   |
| S           | -Sensível  |
| SDD         | -Sensibilidade Dose-Dependente   |
| YEPD        | - <i>Yeast Extract Peptone Dextrose</i>  |
| AIDS        | -Síndrome da imunodeficiência adquirida ( <i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i> )                                  |
| HIV         | -Vírus da imunodeficiência humana ( <i>Human Immunodeficiency Virus</i> )  |
| ATCC        | - <i>American Type Culture Collection</i>  |
| NOR         | -Regiões organizadoras de nucléolos  |
| rDNA        | -DNA ribossômico   |



## SUMÁRIO

|           |   |
|-----------|---|
| 1         | <b>INTRODUÇÃO</b> .....   |
| 2         | <b>JUSTIFICATIVA</b> .....  |
| 3         | <b>OBJETIVOS</b> .....  |
| 4         | <b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....                                      |
| 4.1       | CANDIDOSE: A DOENÇA .....   |
| 4.2       | AGENTE ETIOLÓGICO .....   |
| 4.3       | IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES .....  |
| 4.3.1     | <b>Método clássico</b> .....  |
| 4.3.2     | <b>Identificação molecular</b> .....                                    |
| 4.4       | TRATAMENTO .....  |
| 4.5       | RESISTÊNCIA A ANTIFÚNGICOS .....  |
| 4.5.1     | <b>Heteroresistência</b> .....  |
| 4.6       | PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS.....                           |
| 4.6.1     | <b>Microdiluição em caldo: CLSI e EUCAST</b> .....                      |
| 4.6.2     | <b>Difusão em ágar: Etest</b> .....                                     |
| 4.7       | SELEÇÃO E OBTENÇÃO DE MUTANTES RESISTENTES .....                        |
| 5         | <b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....   |
| 5.1       | ORIGEM DOS ISOLADOS .....   |
| 5.2       | IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS .....  |
| 5.2.1     | <b>Método clássico: análise morfológica e bioquímica</b> .....          |
| 5.2.1.1   | <i>Teste de formação do tubo germinativo</i> .....                      |
| 5.2.1.2   | <i>Teste de formação de clamidoconídeo</i> .....                        |
| 5.2.1.3   | <i>Assimilação de carbono e de nitrogênio (auxanograma)</i> .....       |
| 5.2.1.4   | <i>Prova de fermentação de carboidratos (zimograma)</i> .....           |
| 5.2.2     | <b>Identificação molecular</b> .....                                    |
| 5.2.2.1   | <i>Extração do DNA</i> .....  |
| 5.2.2.2   | <i>Quantificação do DNA genômico</i> .....                              |
| 5.2.2.3   | <i>Reação da polimerase em cadeia</i> .....                             |
| 5.2.2.3.1 | <u>Amplificação da sub-unidade 26S do rDNA</u> .....                    |
| 5.2.2.3.2 | <u>Amplificação da região ITS2</u> .....                                |
| 5.2.3     | <b>Comparação de metodologias: método clássico e molecular</b> .....    |
| 5.3       | PERFIL DE SENSIBILIDADE ÀS DROGAS ANTIFÚNGICAS .....                    |
| 5.3.1     | <b>Difusão em ágar: Etest</b> .....                                     |
| 5.3.2     | <b>Microdiluição: CLSI e EUCAST</b> .....                               |
| 5.3.2.1   | <i>Antifúngicos</i> .....   |
| 5.3.2.2   | <i>Meio de cultura</i> .....  |
| 5.3.2.3   | <i>Preparo das placas de microdiluição</i> .....                        |
| 5.3.2.4   | <i>Inóculos</i> .....   |
| 5.3.2.5   | <i>Inoculação nas placas de microdiluição</i> .....                     |
| 5.3.2.6   | <i>Controle de qualidade</i> .....                                      |
| 5.3.2.7   | <i>Leitura e interpretação dos resultados</i> .....                     |
| 5.3.3     | <b>Análise quantitativa e qualitativa</b> .....                         |
| 5.3.4     | <b>Comparação de metodologias: Etest, CLSI e EUCAST</b> .....           |
| 5.4       | SELEÇÃO DE FENÓTIPOS DE RESISTÊNCIA A FLUCONAZOL E ANFOTERICINA B ..... |

|         |  |
|---------|--|
| 5.4.1   | <b>Fase de triagem</b> .....   |
| 5.4.2   | <b>Fase de seleção de fenótipos de resistência</b> .....                       |
| 5.4.2.1 | <i>Seleção A - Fluconazol → Anfotericina B</i> .....                           |
| 5.4.2.2 | <i>Seleção B – Anfotericina B → Fluconazol</i> .....                           |
| 5.5     | <b>INDUÇÃO DE FENÓTIPOS DE RESISTÊNCIA A FLUCONAZOL E ANFOTERICINA B</b> ..... |
| 5.5.1   | <b>Indução A</b> .....   |
| 5.5.2   | <b>Indução B</b> .....   |
| 5.6     | <b>VERIFICAÇÃO DA ESTABILIDADE DOS FENÓTIPOS DE RESISTÊNCIA</b> .....          |
| 5.7     | <b>ANÁLISE DA IDENTIDADE MOLECULAR DAS CEPAS MUTANTES</b> ..                   |
| 6       | <b>RESULTADOS</b> .....  |
| 6.1     | <b>IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES</b> .....  |
| 6.2     | <b>PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS</b> .....                          |
| 6.2.1   | <b>Fluconazol</b> .....  |
| 6.2.2   | <b>Anfotericina B</b> .....  |
| 6.3     | <b>COMPARAÇÃO DAS METODOLOGIAS Etest, EUCAST E CLSI</b> .....                  |
| 6.4     | <b>SELEÇÃO DE CEPAS RESISTENTES A FLUCONAZOL E ANFOTERICINA B</b> .....        |
| 6.4.1   | <b>Seleção iniciando com fluconazol (seleção A)</b> .....                      |
| 6.4.2   | <b>Seleção iniciando com anfotericina B (seleção B)</b> .....                  |
| 6.4.3   | <b>Perfil de sensibilidade das amostras mutantes</b> .....                     |
| 6.5     | <b>INDUÇÃO DE CEPAS RESISTENTES A FLUCONAZOL E ANFOTERICINA B</b> .....        |
| 6.5.1   | <b>Indução iniciando com fluconazol (indução A)</b> .....                      |
| 6.5.2   | <b>Indução iniciando com anfotericina B (indução B)</b> .....                  |
| 6.5.3   | <b>Perfil de sensibilidade das amostras mutantes</b> .....                     |
| 6.6     | <b>AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO FENÓTIPO HETERORRESISTENTE</b> .....           |
| 6.7     | <b>AVALIAÇÃO DA IDENTIDADE MOLECULAR DAS CEPAS MUTANTES</b> .....              |
| 7       | <b>DISCUSSÃO</b> .....   |
| 7.1     | <b>IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS</b> .....  |
| 7.2     | <b>SENSIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS</b> .....                                    |
| 7.3     | <b>AVALIAÇÃO DO FENÔMENO DE HETERORESISTÊNCIA</b> .....                        |
| 8       | <b>CONCLUSÕES</b> .....  |
|         | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....  |

## 1 INTRODUÇÃO

Espécies de *Candida* são comensais e fazem parte da microbiota intestinal, bucal e vaginal humana. As bactérias da microbiota competem com a população de fungos. Estes podem se apresentar como patógenos oportunistas com capacidade de causar várias infecções, dependendo de distintos fatores, como imunodepressão, terapias imunossupressoras, antibióticoterapia, uso de cateteres, diabetes mellitus e outros. A conversão de comensal para patogênico tem intrigado micologistas há décadas (BRAWNER e CUTLER, 1989; BARODKA et al., 2006; KAUFMAN, 2007).

Nos primeiros casos notificados que, posteriormente, foram diagnosticados como AIDS, a candidose foi descrita como uma das características da doença em quatro de cada cinco pacientes. A candidose é também encontrada como manifestação clínica em quase todos os pacientes com fatores de risco para infecção pelo HIV, hemofílicos, pacientes submetidos à transfusão sanguínea e usuários de drogas. A manifestação de candidose bucal pode ser o primeiro sinal, ou sintoma, de infecção pelo HIV. Observam-se três formas clínicas orais predominantes de candidose em pessoas com sorologia positiva para HIV: candidose eritematosa, candidose pseudomembranosa e queilite angular (BRASIL, 2004).

Espécies de *Candida* apresentam grau variado de sensibilidade a agentes antifúngicos. Em geral, *C. krusei* é considerada resistente ao fluconazol e *C. glabrata* e *C. tropicalis* possuem sensibilidade reduzida a este antifúngico, enquanto *C. lusitaniae* é menos sensível à anfotericina B em relação às outras espécies de *Candida* (YANG et al., 2005).

A nistatina foi um dos primeiros medicamentos utilizados no tratamento de candidose bucal. Esta droga, entretanto, apresentou toxicidade elevada quando usada por via intravenosa e em função deste problema, a anfotericina B, também um polieno como a nistatina, apesar de apresentar toxicidade elevada, começou a ser empregada dada a sua alta eficácia clínica. Além disso, outras drogas antifúngicas com reduzido efeito tóxico surgiram no mercado, como os derivados azólicos, equinocandinas e alilaminas (MEYER, 1994; PETRIKKOS e SKIADA, 2007). A eficácia e a sensibilidade dos diversos gêneros e espécies a esses antifúngicos é descrita em vários estudos.

Nos últimos anos, a incidência de isolados de leveduras patogênicas do gênero *Candida* resistentes aos azóis tem aumentado consideravelmente, o que está levando à

problemas no sucesso de terapias para candidose (MUKHOPADHYAY, et al., 2004; PASRIJA et al., 2005; PRASAD et al., 2005).

Atualmente anfotericina B e fluconazol são as duas drogas mais comumente utilizadas para o tratamento de infecções invasivas por *Candida* (BAKER et al., 2004).

O extenso uso de fluconazol, apesar de diminuir a mortalidade atribuída à candidoses, resulta de seleção de espécies de *C. krusei* e *C. glabrata* resistentes a vários antifúngicos (PETRIKKOS e SKIADA, 2007).

Uma grande variedade de genes está envolvida no processo de resistência a antifúngicos. Um exemplo é o gene ERG11, no qual várias mutações pontuais em sua seqüência resultam em mudanças de aminoácidos na proteína codificada, que, por sua vez, levam a alterações conformacionais resultando no decréscimo da afinidade dessa aos antifúngicos azólicos (RODERO et al., 2003; SANGLARD, 2002).

## 2 JUSTIFICATIVA

Nas últimas décadas é notável o aumento da incidência de infecções fúngicas, principalmente em pacientes imunocomprometidos.

Limitado número de agentes antifúngicos, incluindo azólicos (itraconazol, fluconazol, cetoconazol), polienos (anfotericina B) e análogos de pirimidinas (flucitosina), é utilizado no combate às infecções causadas por leveduras patogênicas. Casos de resistência a estes antifúngicos são freqüentemente documentados. Nos últimos anos, vários estudos bioquímicos e moleculares foram realizados no sentido de elucidar as causas da resistência nas leveduras. Recentemente, o desenvolvimento de resistência tem ocorrido em leveduras que infectam, principalmente, pacientes imunocomprometidos pela infecção com HIV, pela quimioterapia antineoplásica, antibióticoterapia e outros. Apesar de já existirem drogas antifúngicas que atuam na parede celular fúngica,

O desenvolvimento de antifúngicos mais seletivos para patógenos eucariotos como os fungos constitui-se num desafio científico, pois os seus hospedeiros também são organismos eucariotos e, portanto, possuem várias vias metabólicas e estruturas celulares comuns.

A obtenção de amostras de leveduras mutantes para resistência a antifúngicos e a comparação por métodos moleculares com seus análogos selvagens abrem novas perspectivas para tratamento das infecções fúngicas e dá subsídio para maior conhecimento da patogênese dessas doenças.

O estudo do potencial e dos mecanismos genéticos que levam à resistência a um antimicótico é fundamental para orientar a utilização desta droga.

### 3 OBJETIVOS

#### GERAL:

Contribuir para o conhecimento do fenômeno de resistência a antifúngicos em leveduras do gênero *Candida*.

#### ESPECÍFICO:

- Identificar, pelo método clássico e molecular, 30 amostras de *Candida* spp pertencentes à micoteca do Instituto Adolfo Lutz obtidas de mucosa oral de pacientes HIV positivos e HIV negativos com Candidose Eritematosa.
- Verificar o perfil de sensibilidade aos antifúngicos anfotericina B e fluconazol, pelos métodos Etest, EUCAST e CLSI.
- Fazer a correlação entre Etest e os dois métodos de microdiluição.
- Promover, *in vitro*, a seleção de amostras heteroresistentes à anfotericina B e ao fluconazol por pressão seletiva das drogas.
- Induzir, *in vitro*, o desenvolvimento de amostras heteroresistentes à anfotericina B e ao fluconazol na presença das drogas.
- Comparar os perfis de sensibilidade aos antifúngicos das amostras de *Candida* obtidas, por seleção e/ou indução, com os isolados selvagens homólogos.
- Analisar a identidade molecular das cepas selecionadas ou induzidas para resistência as drogas.

## 4 REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1 CANDIDOSE: A DOENÇA

A candidose pode atingir a superfície cutânea ou membranas mucosas e resultar em onícomicose, candidose oral, intertrigo, paroníquia, candidose vaginal entre outras manifestações. Dentre as formas de candidose oral, a mais comum é a candidose pseudomembranosa, caracterizada por placas brancas removíveis na mucosa oral, popularmente denominada sapinho, ou candidose eritematosa, que se apresenta como placas vermelhas, lisas, sobre o palato duro ou mole. A infecção mucocutânea crônica pode estar associada com: doenças endócrinas, como diabetes melittus, tratamento com antibióticos de amplo espectro ou imunodeficiência, sendo freqüente na infecção por HIV, onde assume caráter sistêmico grave (BRASIL, 2004). Nas últimas décadas o aumento na incidência de candidoses superficiais e invasivas foi atribuído a disseminação do uso de antibióticos e agentes imunossupressores, mas há também um paralelo entre o aumento da incidência de candidose e o uso de quimioterápicos antineoplásicos, nutrição parenteral e a prática de procedimentos cirúrgicos invasivos (BRASIL, 2004).

A candidose disseminada ou sistêmica pode ocorrer em recém-nascidos de baixo peso e hospedeiros imunocomprometidos, podendo atingir qualquer órgão e evoluir para óbito (KAUFMAN, 2007). Esta forma é freqüente em indivíduos que fazem uso prolongado de sondas gástricas, antibióticoterapia, quimioterapia, cateteres intravasculares, prótese valvular cardíaca, pacientes hematológicos e recém-nascidos de baixo peso (BRASIL, 2004; KAUFMAN, 2007). A transmissão ocorre através de contato com mucosas, pele e unhas de portadores ou pode ocorrer transmissão vertical durante o parto normal com disseminação endógena (BRASIL, 2004).

Recém nascidos com doenças gastrointestinais têm maiores chances de desenvolverem infecções fúngicas invasivas devido ao seu sistema imune estar em desenvolvimento (KAUFMAN, 2007).

As bactérias que, normalmente, fazem parte da microbiota intestinal, competem com o crescimento da população de fungos. Alterando-se a microbiota bacteriana intestinal com o uso de antibióticos sistêmicos, os fungos têm a possibilidade de crescer e invadir tecidos

profundos, vasos sangüíneos e linfáticos, podendo resultar em doença disseminada, principalmente nos indivíduos imunocomprometidos (NEVES et al., 1990; KAUFMAN, 2007). Associações com cirurgias gastro-intestinais e uso de antibioticoterapia sistêmica são fatores de risco para o aparecimento da endoftalmite fúngica endógena (NEVES et al., 1990). Tem sido postulado que mudanças fenotíficas e genotípicas é acompanhado de variações nos atributos de virulência e podem explicar parcialmente o fenômeno de conversão de parasita comensal para patogênico (BRAWNER e CUTLER, 1989).

Espécies de *Candida* compreendem a quarta mais comum causa de infecções sanguíneas nosocomiais entre os pacientes da unidade de terapia intensiva de hospitais nos Estados Unidos (WISPLINGHOFF et al., 2004)

#### 4.2 AGENTE ETIOLÓGICO

Espécies de *Candida* spp. são comumente associado a seres humanos e animais de sangue quente. São encontrados como comensais no sistema digestivo e no trato vaginal. Estão presentes na unha, pele, brônquios e ainda na cavidade oral, onde podem viver sem causar dano ao hospedeiro a menos que existam condições predisponentes para o desenvolvimento de candidose. Estes agentes são considerados importantes patógenos nosocomiais em pacientes imunocompetente ou imunocomprometido, mas pouco é conhecido de sua epidemiologia. (VRIONI et al., 2001; KAUFMAN, 2007)

As espécies de leveduras patogênicas mais comuns que acometem o homem são *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *Cryptococcus neoformans*. Contudo, outras espécies de *Candida* que não eram muito evidenciadas, como *C. lusitaniae* e *C. krusei* vem aumentando sua incidência nas últimas décadas (HAZEN, 1995; ZER et al., 2002).

A infecção por fungos do gênero *Candida* pode ser facilitada pelo desenvolvimento do micélio e do formato tubular da sua forma filamentosa, o qual diminui a capacidade de fagocitose de células do sistema imune, enquanto a forma de micélio proporciona maior aderência à superfície da célula (GHANNOUM e ABU-ELTEEN, 1990). *C. albicans* e *C. dubliniensis* são espécies capazes de crescer na forma leveduriforme ou na forma de hifa e pseudohifa. Em relação à morfogênese, há uma longa história de tentativa para provar a



relação entre a forma filamentosa de *Candida albicans* e a sua virulência (RICHARD et al., 2001).

*Candida dubliniensis* está associada também a infecções da cavidade bucal e orofaringe de pacientes imunodeficientes. Diferentemente de *C. albicans*, *C. dubliniensis* é raramente encontrada na microbiota normal de indivíduos sadios e é responsável por cerca de 2% dos casos de candidemia (comparado com *C. albicans* que é cerca de 65%), sendo que a grande maioria dos isolados de *C. dubliniensis* são sensíveis a todos os agentes antifúngicos na prática médica. Entretanto, tem sido observada redução da sensibilidade a azóis em isolados clínicos de *C. dubliniensis* (SULLIVAN et al., 2004).

Segundo Sullivan e colaboradores (2004) *C. dubliniensis* é menos patogênica do que *C. albicans*. Porém, isto foi sugerido de acordo com informações epidemiológicas observadas de um limitado número de amostras.

#### 4.3 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES

As doenças causadas por leveduras são, normalmente, tratadas como uma infecção fúngica geral. Agentes antifúngicos como anfotericina B ou drogas azólicas são utilizados para controle de uma ampla variedade de fungos e o tratamento é, em algumas infecções, por longo período de tempo. Estes agentes não são sempre eficazes, especialmente com o uso contínuo, que pode resultar em desenvolvimento de resistência a estas drogas (WHITE *et al.*, 1998). A análise de isolados clínicos indicam que a resistência não é devida somente a isolados de *C. albicans* resistentes, mas também pelo aumento do número de isolados não-*albicans*. Várias espécies de leveduras parecem desenvolver resistência com o uso de drogas com muito mais frequência do que em *C. albicans*. *Candida tropicalis* e *C. parapsilosis*, ambas associadas com infecções invasivas de corrente sanguínea e suas complicações graves, tais como endocardites, possuem resistência inerente ou podem desenvolver rapidamente resistência aos antifúngicos poliênicos e azóis (BODEY, 1992 e WALSH e PIZZO, 1988). *Candida dubliniensis*, geralmente associada à candidose oral, desenvolve resistência a fluconazol em altas taxas depois de expostos a estas a azóis (MORAN *et al.*, 1997). As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) das drogas azólicas para outras espécies de leveduras (não-*C. albicans*), tais como *C. glabrata*, a qual está associada a pacientes com câncer e transplantados de medula óssea, são significativamente maiores do que os valores

apresentados por espécies de *C. albicans*. (REX *et al.*, 1995; PETRIKKOS e SKIADA, 2007). O nível da droga presente no sangue pode suprimir o crescimento de leveduras sensíveis, mas permite o crescimento de mais cepas resistentes. Estes microrganismos que podem desenvolver resistência rapidamente ou que necessitam de doses mais elevadas da droga, provavelmente, são responsáveis por um grande número de infecções causadas por leveduras em certas populações. Assim, a identificação das espécies tem importante papel no tratamento de doenças.

#### 4.3.1 Método clássico

As leveduras são classificadas como fungos pertencentes à divisão Eumycota (Eumycetes), classe Ascomycetes, Basidiomycetes e Deuteromycetes. Leveduras ascomicéticas e basidiomicéticas produzem esporos e apresentam um ciclo sexual já conhecido. As leveduras deuteromicéticas, também conhecidas como leveduras imperfeitas, não possuem ciclo sexual conhecido ou descrito, apresentando características morfológicas semelhantes às leveduras ascomicéticas ou basidiomicéticas. Leveduras do gênero *Candida* pertencem a divisão *Ascomycota*, classe *Saccharomycete*, ordem *Saccharomycetales* e família *Saccharomycetaceae* (KURTZMAN, 1988).

As leveduras são tradicionalmente caracterizados, classificados e identificados através de características morfológicas e fisiológicas. Para a identificação específica, estudos bioquímicos e de exigências nutricionais são mais relevantes que traços morfológicos e sexuais, os quais são importantes na determinação genética. Diferenças na fermentação e assimilação de compostos de carbono e assimilação de nitrogênio são critérios importantes na taxonomia e identificação de leveduras, pois estes microrganismos apresentam uma variação na habilidade de utilização desses compostos. Em geral, apresentam habilidade de assimilar amônia, mas nem sempre a de assimilar nitratos, nitritos, aminas ou determinados aminoácidos (WALT e YARROW, 1984).

#### 4.3.2 Identificação molecular

A síntese de proteínas depende da participação do RNA ribossômico (rRNA) no processo de tradução da informação genética. A codificação do rRNA é feita em regiões

específicas do genoma pelo chamado DNA ribossômico (rDNA), muitas vezes visíveis com auxílio de microscópios, as chamadas “regiões organizadoras de nucléolo” (NOR). O número de NOR é aparentemente característico para cada espécie.

O rDNA contido nas regiões organizadoras do nucléolo tem sido objeto de grande número de estudos, com diversas aplicações em genética, evolução e melhoramento. Tal interesse está relacionado à estrutura desta região. O rDNA é caracteristicamente repetitivo, uma propriedade que permite uma série de aplicações. O fato de ser repetitivo significa que uma determinada estrutura ou seqüência de nucleotídeos (*core sequence*) se repita lado a lado (em *tandem*) inúmeras vezes.

Sendo assim, por ser repetitivo e por estar situado em regiões específicas do genoma, a proporção de rDNA é, em geral, alta em relação ao conteúdo total de DNA da espécie. O DNA total da espécie inclui DNA nuclear, ribossômico, mitocondrial e plasmidial. O rDNA é encontrado no núcleo e também no citoplasma celular.

Em geral, as regiões 26S, 18S e 5,8S das unidades de repetição não apresentam variação de seqüência em relação às espécies, enquanto que as regiões internas que são transcritas (ITS) variam grandemente. Esta característica é utilizada para se conhecer o polimorfismo de comprimento de fragmento nos locos de rDNA através do uso de enzimas de restrição. O número de cópias de uma determinada seqüência de rDNA também é utilizado em tais estudos, bem como variações na seqüência de nucleotídeos das unidades de repetição. Os dados gerados através desta técnica são utilizados para estudos de filogenia e evolução, bem como para caracterização de germoplasma e análise de diversidade genética (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Com o auxílio de técnicas moleculares a identificação de microrganismos tornou-se mais rápida e eficaz. Dentre as diversas técnicas utilizadas podemos citar, a do *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), *Restriction Fragment Length Polymorphisms* (RFLP), *Polymerase Chain Reaction* (PCR) e *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP).

A metodologia da PCR tem sua base na amplificação de um seguimento específico do DNA auxiliados por primers ou iniciadores específicos, que se ligam as fitas da molécula, iniciando então a síntese *in vitro* do DNA. A reação é catalisada pela DNA polimerase, que copia o DNA entre as seqüências correspondentes aos dois primers. O uso da técnica direta de PCR é uma ferramenta que inclui praticidade e rapidez na identificação de amostras de leveduras.

Em isolados de *Candida*, Mannarelli e Kurtzman (1998) utilizaram com sucesso a PCR para discriminar ao nível de espécie. Eles desenvolveram iniciadores que amplificam fragmentos na região conservada 26S do rDNA e, portanto, conseguiram estabelecer metodologia para a identificação de 14 espécies de leveduras patogênicas ao homem.

No estudo de mutantes é importante a comprovação da identidade da cepa mutante. Esta análise indicará a existência ou não de contaminação cruzada durante o procedimento experimental. Assim, Xu e colaboradores (2001) utilizaram a RAPD para comparar aleatoriamente o genoma das estirpes mutantes e sua respectiva estirpe selvagem. Eles verificaram que esta técnica foi eficiente na comprovação dessa identidade.

#### 4.4 TRATAMENTO

Um dos primeiros medicamentos eficazes no tratamento de candidose foi a nistatina. Esta droga, entretanto, apresenta toxicidade elevada quando usada por via intravenosa e não é absorvida pelo trato gastrointestinal. Em função deste problema, pesquisas continuaram a ser feitas propondo o uso de um outro antifúngico, a anfotericina B que, apesar de alta eficácia, é também dotada de alta toxicidade (MEYER, 1994).

Nos últimos 50 anos a anfotericina B deoxicolato tem sido o “padão ouro” in quimioterapia antifúngica, apesar de sua toxicidade. Entretanto, melhoras nas opções de tratamento para infecções fúngicas invasivas vêm sendo desenvolvidas nos últimos 15 anos. Isto inclui os novos agentes antifúngicos, como as preparações lipídicas menos tóxicas de anfotericina B, triazóis e equinocandinas (PETRIKKOS e SKIADA, 2007).

A maioria dos tipos de candidose oral é facilmente tratada por aplicação tópica de nistatina, anfotericina B ou miconazol. Atualmente, fluconazol e anfotericina B são as duas drogas mais comumente utilizadas para o tratamento de infecções por *Candida* spp. Ambos agentes exercem os seus efeitos na membrana celular do fungo. Fluconazol e outros azólicos são fungistáticos e inibem a enzima do citocromo P450 14 $\alpha$ -demetilase (codificada pelo gene ERG11), uma enzima chave na biossíntese do ergosterol (BAKER et al., 2004). Anfotericina B e todos os polienos têm mecanismos de ação sobre bloqueio na ligação do ergosterol, que é o esterol primário da membrana celular do fungo. A consequência desta ação é o comprometimento da integridade osmótica da membrana, com falta de potássio e magnésio

intracelular. Anfotericina B tem um largo espectro de ação e é comumente usado no tratamento de casos de candidose, criptococose, histoplasmose, blastomicose, paracoccidiodomicose, coccidiodomicose, aspergilose e outros. Resistência à anfotericina B é rara, quando considerado o ponto de corte (breakpoint) de 2µg/mL. CIM nesse valor é espécie-dependente e poucos isolados de leveduras desenvolvem resistência adquirida. Isto é válido não só para o patógeno mais freqüente de candidoses, *C. albicans*, mas também, para *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. lusitaniae*. O principal problema associado ao uso convencional de anfotericina B é devido à sua baixa solubilidade aquosa e alta toxicidade (ELLIS, 2002).

O fluconazol tem boa penetração na barreira hemato-encefálica, praticidade de administração via oral e baixa toxicidade. Esta droga é usada tanto no tratamento inicial quando na fase de manutenção, denominada profilática, em casos com doenças graves como a meningite por *Cryptococcus neoformans* associada à AIDS. Entretanto, estudos *in vitro* demonstraram que fluconazol, assim como todos os outros antifúngicos azólicos são fungistáticos. Itraconazol, cetoconazol e voriconazol fazem parte dessa classe de drogas. Nos testes *in vitro* com essas drogas, os fungos podem apresentar crescimento, dependente da espécie, mesmo em concentrações elevadas situadas acima da CIM (KARL et al., 2000).

Micafungina é um novo antifúngico da classe das equinocandinas com amplo espectro de ação em espécies de *Candida* spp. Segundo Messer et al. (2006), este novo fármaco apresentou boa atividade *in vitro* contra isolados de *Candida* spp resistentes a fluconazol. Todas as amostras foram inibidas com concentrações de micafungina menores ou igual a 1µg/mL.

Algumas combinações de antifúngicos, apesar de serem recomendadas, apresentam interações antagônicas, como por exemplo, a associação de anidulafungina e cetoconazol (KARLOWSKY et al., 2006).

A disponibilidade de novos agentes antifúngicos com novos mecanismos de ação tem aumentado o interesse nas terapias de combinações antifúngicas. Entretanto, não se pode simplesmente assumir que duas ou mais drogas com diferentes mecanismos de ação produzirão uma melhora nos resultados do tratamento comparado ao uso individual de cada fármaco. Terapias combinadas podem reduzir a potência e a eficácia do antifúngico, aumentar a capacidade de interação e a toxicidade da droga, além de ter um custo muito maior para o paciente sem haver benefício clínico (LEWIS e KONTOYIANNIS et al., 2001). Contudo, estudos têm demonstrado vários tratamentos com terapias combinadas que, dependendo do

momento da administração da droga, apresentaram resultados satisfatórios. Um exemplo é o efeito da combinação de anfotericina B e azóis: quando o azol é administrado antes da anfotericina B, antagonismo entre as duas drogas é observado; entretanto, quando eles são administrados simultaneamente, o efeito é sinérgico com azóis hidrofílicos (fluconazol), antagonismo com azóis lipofílicos (itraconazol) ou indiferente (VIUDES et al., 2001). A combinação de flucitosina com azóis demonstra ser sinérgico para *C. albicans* e para *Cryptococcus neoformans*. Estudos recentes mostram que a terapia combinada de anfotericina B lipossomal e equinocandinas melhoram os resultados terapêuticos *in vitro* no tratamento de infecções sistêmicas por *Candida* (OLSON et al., 2005). O efeito sinérgico também tem sido observado na combinação das equinocandinas e anfotericina B ou fluconazol (VIUDES et al., 2001).

#### 4.5 RESISTÊNCIA A ANTIFÚNGICOS

O constante e inadequado uso de antimicóticos e inibidores celulares, pode ter levado à seleção de isolados resistentes, tornando muitas drogas pouco ineficientes. Resistência clínica é observada nas últimas décadas principalmente em pacientes imunocomprometidos com candidose de orofaringe. O estudo de mecanismos genéticos que levam a resistência a um antibiótico é fundamental para orientar a adequada utilização da droga, pois esta vem sendo a forma de intervenção mais amplamente usada no combate a infecções (CASALI et al., 2003)

Existem diferentes tipos de mecanismos bioquímicos que contribuem para o fenótipo de resistência a drogas em eucariotos. Um mecanismo bastante estudado em espécies de *Candida* é o mediado pela superexpressão de bombas de efluxo, capazes de facilitar o efluxo de drogas citotóxicas pelas proteínas transportadoras ABC. Esse mecanismo leva a diminuição do acúmulo celular da droga. Um outro mecanismo é a alteração na composição dos esteróis e no alvo dos antifúngicos (MARICHAL et al., 1999; SANGLARD, 2002).

Dois tipos de transportadores de efluxos foram relatados em isolados resistentes do gênero *Candida*: transportador ABC (CDR1 e CDR2), que exporta grande variedade de azóis e outras substâncias não relacionadas e os “facilitadores principais” (CaMDR1) que possuem espectro menor de substratos (MARICHAL et al., 1999).

A afinidade reduzida de ligação da 14 $\alpha$ -demetilase ao antifúngico parece ser um importante determinante de resistência em diversas leveduras. O aumento da atividade desta

enzima e altos níveis de ergosterol são observados em cepas resistentes (ZAITZ et al., 1998). O ERG11 é o gene que codifica a proteína citocromo P450 14 $\alpha$ -demetilase em diversas espécies de interesse médico, incluindo *Cryptococcus* spp, *Histoplasma capsulatum* e *Candida* spp. (REVANCAR et al., 2004). Várias mutações de ponto na seqüência do gene ERG11 resultam em mudanças de aminoácidos na proteína que levam a alterações conformacionais resultando no decréscimo da afinidade desta aos antifúngicos azólicos (SANGLARD, 2002; RODERO et al., 2003).

Marichal et al. (1999) verificaram que, em estudos com isolados de *C. albicans*, houve substituições de aminoácidos não aleatórias na enzima codificada pelo gene ERG11. Elas se concentraram em três áreas delimitadas da proteína, sugerindo a existência de regiões com maiores chances de ocorrer substituição (regiões “hot spots”). Eles verificaram 29 substituições de aminoácidos nas regiões entre os aminoácidos 105 a 165, 266 a 287 e 405 a 488, caracterizando pontos de mutações importantes que levam à resistência desta levedura ao fluconazol.

Em relação à P450 14 $\alpha$ -dimetilase a resistência pode ocorrer também pelo aumento da concentração desta enzima no interior celular. Isto pode ocorrer pelo aumento da taxa de transcrição do gene ERG11 ou pela amplificação cromossômica do mesmo (MARICHAL et al., 1999).

Karl et al. (2000), analisando o mRNA de *C. albicans*, revelaram que a expressão do gene ERG11 varia de acordo com a fase de crescimento da levedura, sendo máxima durante a fase logarítmica e diminuída na fase estacionária. Eles verificaram que a incubação da levedura na presença de fluconazol resultou em aumento dos níveis de mRNA em até cinco vezes. Isto também ocorreu com a exposição a outros azóis: itraconazol, cetoconazol, clotrimazol e miconazol. Verificaram ainda que outros cinco genes ERG (ERG1, ERG3, ERG7, ERG9 e ERG25) foram também superexpressos. Em relação ao gene ERG11 foi observado, ainda, superexpressão em isolados de *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei*.

Segundo Baker et al. (2004), alterações em outros componentes da via de biossíntese do ergosterol também podem levar à resistência a fármacos e esta via é alvo para o desenvolvimento de antifúngicos. O gene ERG6 de *C. albicans* codifica a C-24-esterol-metiltransferase que contém 377 aminoácidos e participa dos passos finais da via de biossíntese do ergosterol (JENSEN-PERGAKES et al., 1998). Baker et al. (2004) mostraram que a deleção do gene ERG6 aumenta a taxa de difusão passiva de fluconazol, aumentando a

sua captação direta e comprometendo indiretamente a atividade do sistema de fluxo através da membrana.

Young et al. (2003) analisaram o nível de expressão do gene ERG6 e a quantidade de ergosterol em isolados clínicos de *C. lusitaniae* resistentes à anfotericina B. Eles verificaram que houve aumento na transcrição do gene ERG6 e redução do índice de ergosterol em comparação com amostras sensíveis a este polieno. Esta mudança sugere que outros genes da rota de biossíntese do ergosterol poderiam estar desregulados ou terem sofrido mutação. Análises de dois isolados de *C. lusitaniae* mostraram redução da expressão do gene ERG3. Existem relatos que, em isolados clínicos de *C. albicans*, a resistência combinada à anfotericina B e azóis está associada com acúmulo de esterol (ergosta-7,22dienol) e, também, com a redução da atividade da C5-desaturase, codificada pelo gene ERG3 (BAKER et al., 2004).

O acúmulo de esterol intermediário, através de alterações em outros componentes do ciclo de biossíntese do ergosterol, pode contribuir para o mecanismo de resistência (LUPETTI et al., 2002). Segundo Kelly et al. (1997), em pacientes nos últimos estágios da AIDS, mais de 10% das leveduras causadoras de candidose oral apresentam resistência a fluconazol. Trabalhando com dois isolados clínicos, eles observaram que o crescimento de *C. albicans*, inibido após tratamento com fluconazol, foi causado por acúmulo de 14 $\alpha$ -metilergosta-8,24(28)-dien-3beta,6alfa-diol. Esta resistência foi causada por deficiência da enzima esterol-delta-5,6-desaturase. Uma consequência deste tipo de mecanismo de resistência a azóis é que a ausência de ergosterol causa resistência cruzada a outros antifúngicos disponíveis, como a anfotericina B.

Em um estudo com amostras de *C. albicans* isoladas de pacientes pré-expostos a fluconazol, Goldman et al. (2004) verificaram que os mecanismos de resistência, incluindo mutações pontuais no gene ERG11 e superexpressão deste gene e de vários outros que codificam bombas de efluxo, podem ser encontrados mesmo em isolados sensíveis e, portanto, o fenótipo de resistência não está relacionado a estes mecanismos isolados.

#### 4.5.1 Heteroresistência

O rápido desenvolvimento de resistência antifúngica *in vivo* pode resultar de uma pré-exposição à droga, podendo selecionar clones resistentes ou conjuntos de células resistentes



com uma população heterogênea, fenômeno denominado de heteroresistência. Alternativamente, a presença da droga pode influenciar a transcrição de genes de resistência dentro de uma população clonal de células. O fenômeno de heteroresistência foi recentemente documentado em leveduras do gênero *Candida* (MARR, 2001) e *Cryptococcus* (MONDON, 1999; YAMAZUMI, 2003).

#### 4.6 PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS

Os métodos utilizados na execução dos testes de sensibilidade para fungos são adaptações daqueles empregados para bactérias. As técnicas disponíveis baseiam-se na diluição em caldo, diluição em ágar e difusão em ágar.

##### 4.6.1 Microdiluição em caldo: CLSI e EUCAST

Na metodologia CLSI a CIM é determinada a olho nu e para azóis e 5-fluorocitosina é definida como a menor concentração da droga que produz uma diminuição proeminente na turbidez em comparação com o controle de crescimento (sem o antifúngico), após 48h (no caso de *Candida* sp) e 72h (no caso de *C. neoformans*) de incubação. Para anfotericina B, a CIM é definida como aquela que inibe totalmente o crescimento da levedura (CLSI, 2002).

Na metodologia EUCAST, a leitura é espectrofotométrica. A densidade ótica de cada poço da microplaca é determinada após 24h (*Candida* sp) ou 48h (*C. neoformans*) de incubação. No caso de flucitosina e dos azóis, a CIM é definida como a menor concentração da droga capaz de promover redução de 50% de crescimento em relação ao observado no controle de crescimento. Para anfotericina B, a CIM corresponde a redução de 90% do crescimento (EUCAST, 2002).

##### 4.6.2 Difusão em ágar: Etest

O método clássico de difusão em ágar, usado em bacteriologia, consiste na utilização de discos com concentrações conhecidas dos antimicrobianos (BAUER et al., 1966). Nestas condições são observados os halos de inibição de crescimento e mensurados os diâmetros dos mesmos. De acordo com o tamanho das zonas de inibição, os microrganismos são

classificados, qualitativamente, em sensíveis, intermediários ou resistentes à determinada droga.

O Etest é um método de difusão em ágar disponível comercialmente que oferece a vantagem de produzir resultados quantitativos em valores de CIM. A metodologia consiste em uma fita plástica inerte e não porosa de, aproximadamente 5 mm de diâmetro, graduada com valores definidos e contínuos de antifúngicos expressos em  $\mu\text{g/mL}$ , que quando colocada sobre o meio de cultura inoculado passa a difundir a droga. Os microrganismos sensíveis à mesma deixam de se desenvolver na área em que ela se difundiu em grau correspondente à sensibilidade apresentada a uma determinada concentração. A leitura é feita na intersecção da elipse de inibição formada. No caso anfotericina B, a CIM é determinada no ponto de inibição completa (100%). Para a flucitosina e os azóis, a leitura é feita no primeiro ponto de inibição significativa, ou seja, no ponto onde ocorre diminuição característica na intensidade de crescimento (80% de inibição) (ESPINEL-INGROFF et al., 1992).

#### 4.7 SELEÇÃO E OBTENÇÃO DE MUTANTES RESISTENTES

A seleção ou obtenção de mutantes é uma etapa inicial importante em estudos que visam a elucidação dos mecanismos de resistência. Neste sentido, Sanglard et al. (2003) selecionaram mutantes fazendo a deleção dos genes ERG3 e ERG11. Os mutantes homocigotos (*erg3/erg3*) foram resistentes a derivados azóis, mas eram mais sensíveis à anfotericina B do que suas estirpes selvagens. Eles mostraram que mutantes de espécies de *C. albicans erg11/erg11*, portando um defeito no alelo *erg11* podem ser obtidos *in vitro* na presença de anfotericina B. Foi também relatado que a deleção do gene ERG11 que codifica a lanosterol 14alfa-demetilase foi possível somente em condições aeróbicas onde o ERG3 não é funcional.

Testes de sensibilidade a drogas *in vitro* para fungos fornecem informações valiosas quanto à pesquisa de novas substâncias, resistência aos antifúngicos de uso frequente, controle terapêutico de infecções e caracterização de amostras fúngicas (SHADOMY e PFALLER, 1991).

Estudos recentes mostram relatos em que a seleção de isolados de *Candida* spp resistentes a azóis pode ser por exposição das amostras à concentrações crescentes dessas drogas (PINJON et al., 2003).

Young et al. (2003) isolaram o gene *ERG6* e estudaram mutantes de *C. lusitaniae* resistentes à anfotericina B e verificaram que estes exibiram defeitos no crescimento e hipersensibilidade a outros inibidores do esterol.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi desenvolvido no laboratório de Microbiologia e Imunologia Básicas e no Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos da Universidade Federal de Alfenas (Unifal-MG). Parte dos experimentos foram realizados no Instituto Adolfo Lutz em São Paulo.

### 5.1 ORIGEM DOS ISOLADOS

Foram avaliados 30 isolados de *Candida* da micoteca mantidas em freezer a  $-30^{\circ}\text{C}$  da Seção de Micologia do serviço de Parasitologia do Instituto Adolfo Lutz, provenientes de pacientes HIV negativos e HIV positivos com candidose eritematosa bucal. Depois de identificadas, as amostras foram incorporadas à micoteca da Universidade Federal de Alfenas.

Para os testes bioquímicos, morfológicos, de sensibilidade e moleculares foram utilizadas as cepas-padrão da *American Type Culture Collection* (ATCC), que foram: *C. albicans* (ATCC 10231), *C. glabrata* (ATCC 2001), *C. tropicalis* (ATCC 750), *C. parapsilosis* (ATCC 22019) e *C. krusei* (ATCC 6258). *Candida dubliniensis* (CD25P/Unifal-MG) foi usada como cepa padrão nos testes moleculares também.

### 5.2 IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS

Para cada amostra previamente identificada como sendo do gênero *Candida* foi preparada uma solução com turbidez igual ao tubo 0,5 da escala de McFarland, sendo uma alíquota de  $100\mu\text{L}$  desta suspensão semeada em meio CHROMagar *Candida* e incubada à  $35^{\circ}\text{C}$  por 48h. Após o período de incubação, foi investigada a presença de culturas mistas pelo aparecimento de colônias de cores diferentes em CHROMagar. Confirmada a pureza do cultivo, foi preparado novo inóculo para confirmação da espécie de levedura. A identificação da espécie foi baseada na análise da formação do tubo germinativo, morfologia, perfil bioquímico e análise molecular, descritos a seguir.

### 5.2.1 Método clássico: análise morfológica e bioquímica

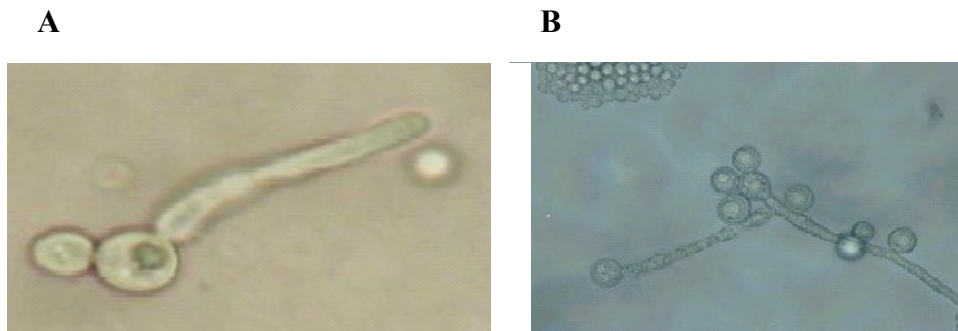
A identificação das leveduras foi feita pelos métodos clássicos com teste morfológicos e bioquímicos como auxanograma e zimograma (KRYGER VAN RIJ, 1984; KURTZMAN, 1998; LACAZ, 1991).

#### 5.2.1.1 *Teste de formação do tubo germinativo*

A partir de cultura pura de 24 h do isolado em ágar Sabouraud, uma alçada da mesma foi transferida para tubos de ensaio (13x17mm) identificados, contendo 0,5 mL de soro bovino estéril, os quais foram incubados em banho-maria a 37° C pelo período de duas a três horas. Neste período, realizou-se a leitura em microscópio (aumento 40X), colocando-se uma gota da suspensão obtida entre lâmina e lamínula e verificando a formação, ou não, de tubos germinativos (FIGURA 1-A).

#### 5.2.1.2 *Teste de formação de clamidoconídio*

O meio de cultura agar fubá acrescido de tween 80 (Anexo A) foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos. No momento do uso, 3mL foram distribuídos em lâminas de microscopia. As leveduras cultivadas anteriormente em agar Sabouraud (Difco) por 24 h foram semeadas em estrias nesta lâmina, e recobertas com lamínula estéril. Essa preparação foi mantida a 25°C e colocada em câmara úmida por até 5 dias. Leituras microscópicas diárias foram realizadas para a verificação de produção de filamentação e de clamidoconídios (FIGURA 1-B).



**Figura 1:** Amostra de *C. albicans* (ATCC 10231). **A**, formação de tubo germinativo. **B**, prova positiva para filamentação e produção de clamidoconídio.

#### 5.2.1.3 *Assimilação de carbono e de nitrogênio (auxanograma)*

Os meios C e N (Anexo A) foram esterilizados a 121°C por 15 minutos e distribuídos, com assepsia em tubos de ensaio estéreis. Foram empregados as seguintes fontes de carbono: dextrose, maltose, galactose, sacarose, rafinose, celobiose, eritritol, manitol, ribitol, ramnose, melibiose e trealose. E as seguintes fontes de nitrogênio: peptona e nitrato de potássio.

Para a realização dos testes de assimilação de carbono e de nitrogênio foi preparada suspensão de cada levedura, com turvação correspondente à escala 03 de MacFarland, e 2mL foram vertidas em placas de Petri. Em seguida foram adicionados 20mL de meio básico (meio N ou C), fundido e resfriado a 50°C. Após solidificação do meio básico, colocaram-se sobre os meios C, as fontes de carbono, e sobre o meio N, as fontes de nitrogênio, em pontos equidistantes. Após a incubação a 25°C por 96h, a assimilação foi verificada pela formação de halos opacos ao redor da fonte (KRYGER VAN RIJ, 1984).

#### 5.2.1.4 *Prova de fermentação de carboidratos (zimograma)*

A capacidade de fermentação das leveduras foram testada em tubo de ensaio contendo 10 mL de meio base (Anexo A), acrescido dos seguintes açúcares: glucose, galactose, sacarose, maltose, celobiose, melibiose lactose e rafinose. A cada tubo de ensaio foi adicionado um tubo de Durhan.

A partir de colônias, de cada uma das leveduras, cultivadas por 24 h em meio agar Sabouraud dextrose, preparou-se uma suspensão equivalente à opacidade do tubo 2 da Escala

de McFarland. Um volume de 100µL da suspensão das leveduras foi inoculado em 10mL de meio de cultura e incubados a 27°C por 120h. Foi observada a turvação e formação de gás, sempre se comparando o comportamento frente a um tubo controle (sem adição de açúcar) (SCHMIDT, 1994). As observações foram feitas por um período máximo de 21 dias.

Para efeito de identificação só foram considerados resultados positivos aqueles em que os tubos de Durham indicarem produção de gás e negativo aqueles que não apresentaram produção de gás. A formação de gás indica o potencial fermentativo das linhagens.

## 5.2.2 Identificação molecular

Para confirmação da identidade, o DNA de todas as amostras foi extraído e submetido à PCR para amplificação das seguintes regiões: a) Região 26S do rDNA espécie-específico (NL4CAL/CAL5 -*C.albicans* e NL4CAL/CDU2-*C.dublinsiensis*) (MANARELLI et al., 1998); b) Região interna transcrita 2 (ITS2) localizada entre as subunidades 5,8S e 28S do rDNA (ITS3/ITS4) (CHEN et al., 2000).

### 5.2.2.1 Extração de DNA

A metodologia de extração de DNA foi realizada conforme Bolano et al. (2001) descrita a seguir.

Foram utilizadas esferas de vidro de 425-600 µm lavadas em ácido. Colônias dos isolados crescidos foram inoculadas em meio ágar Sabouraud por 2 dias a 35°C. Foram transferidos 2 a 3 alçadas (aproximadamente 40mg) das colônias obtidas para tubo tipo Eppendorf (2ml) contendo 500µL de TENTS (10mM Tris-HCl pH 7,5; 1mM EDTA pH8; 200mM NaCl; 2% triton X-100; 1% SDS), para ressuspensão das células. Foram adicionados 200µL de pérolas de vidro e 500µL de fenol/clorofórmio (1:1). A agitação foi feita em vórtex por 2 minutos. Centrifugou-se a 13000 rpm por 15 minutos, removendo a fase superior para um novo tubo tipo eppendorf. A este tubo foi adicionado 1 volume de etanol absoluto e resfriado a -20°C por 1 hora. Em seguida centrifugou-se (13000 rpm, 15 minutos) e descartou o sobrenadante. As células foram ressuspensas em 500µl de TE (10mM Tris pH 8,2; 1mM EDTA pH 8) contendo RNase na concentração 50µg/ml. Incubou-se em banho-maria a 37°C por 30 minutos. Depois adicionou-se novamente fenol/clorofórmio (1:1) e centrifugou-se

(13000 rpm, 15 minutos). A fase aquosa (superior) foi transferida para um novo tubo tipo eppendorf contendo 20µL de NaCl 5M e um volume de etanol absoluto. O material foi colocado no freezer a -20°C por 1 hora e em seguida centrifugado (13000 rpm, 15 minutos). Por fim, descartou-se o sobrenadante, lavou-se as células com 500µL de etanol gelado a 70%. Depois de seco a temperatura ambiente, as células foram ressuspensas com 50µL de TE.

#### 5.2.2.2 *Quantificação do DNA genômico*

O gel de agarose a 0,8% foi preparado utilizando-se TBE 0,5X e brometo de etídio (10 µg/µL). Após fundição e resfriamento o gel foi corado com brometo de etídio na concentração de 3mg/mL. Foi colocado na forma e deixado polimerizar por 40 minutos. O DNA foi retirado da geladeira e deixado a temperatura ambiente por 15 minutos. No gel foi colocado um marcador de concentração ( $\lambda$ /Hind III) e as amostras em seguida (5 µL amostra para 2 µL de tampão de corrida). A eletroforese foi realizada em cuba submarina (Amersham Biosciences) por 60 min a 80 Volts. O gel foi observado em transluminador sob luz UV e sua imagem armazenada, usando o sistema digital Kodak (modelo EDAS-290).

Após esse procedimento foi analisada a qualidade do DNA extraído e a quantificação do mesmo através da comparação com o padrão  $\lambda$ /HindIII.

#### 5.2.2.3 *Reação da polimerase em cadeia*

##### 5.2.2.3.1 Amplificação na sub-unidade 26S do rDNA

Foram utilizados seqüências iniciadoras (primers) espécie-específicos para a caracterização das espécies de *C. albicans* e *C. dubliniensis* segundo descrito por Mannarelli e Kurtzman (1998). Os “primers” foram: CAL5 5'-TGTTGCTCTCTCGGGGGCGGCCG-3', CDU2 5'-AGTTACTCTTTTCGGGGGTGGCCT-3' e NL4CAL 5'-AAGATCATT ATGCCAACATCCTAGGTA-3'.

A mistura de PCR foi preparada em um volume total de 50 µL, contendo 10 mM de cada dNTP, 0,2 pmoles de cada primer espécie específico, uma unidade de Taq e 60 ng de DNA genômico. A amplificação foi realizada em termociclador modelo 9700 da Applied Biosystems com programa descrito por Mannarelli e Kurtzman (1998): um ciclo de 98° C por



3 minutos, 35 ciclos (95°C por 1 minuto, (T)°C por 1,5 minutos, 72° C por 1,5 minutos) e extensão final com 72° C por 10 minutos. A temperatura (T) de anelamento variou dependendo do conjunto de “primers” utilizados para a identificação da espécie (*C. albicans* T=58,5°C e *C. dubliniensis* T=52,0°C). Os fragmentos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,0% com brometo de etídeo (10µg/µL) em tampão TBE a 100 V por 45 minutos. A imagem do gel foi gravada utilizando-se o sistema digital Kodak (modelo EDAS-290).

#### 5.2.2.3.4 Amplificação da região ITS2

As amostras que não apresentaram amplificação com os “primers” CAL5, CDU2 e NL4CAL foram submetidas a PCR utilizando os “primers” universais específicos da região ITS2 (ITS3 – 5`-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3` e ITS4 – 5`-TCCTCCGCTTATT GATATGC-3`) para confirmação da identidade com cepas-padrão ATCC segundo Chen et al. (2000).

Foram utilizadas as seguintes cepas padrão ATCC: *C. albicans* (ATCC 10231), *C. glabrata* (ATCC 2001), *C. tropicalis* (ATCC 750) e *C. parapsilosis* (ATCC 22019) que, segundo Chen et al. (2000) amplificam, com os primers ITS3/ITS4, um produto de PCR de 339pb, 414pb, 327pb e 310pb característicos para cada espécie, respectivamente, permitindo, assim, a discriminação das mesmas.

A mistura de PCR foi preparada em um volume total de 50 µl, contendo 10 mM de cada dNTP, 20 pmoles de cada “primer” espécie específico, uma unidade de Taq e 20 ng de DNA genômico (20ng). A amplificação foi realizada em termociclador modelo 9700 da Applied Biosystems com programa descrito por Chen (2000): um ciclo de 95° C por 6 minutos, 25 ciclos ( 95°C por 30 segundos, 65°C por 30 segundos, 72° C por 30 segundos) e extensão final à 72° C por 10 minutos. Os fragmentos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,0% corado com brometo de etídeo (10µg/µL) em tampão TBE a 100 V por 45 minutos. A imagem do gel foi gravada utilizando-se o sistema digital Kodak (modelo EDAS-290).

### 5.2.3 **Comparação de metodologias: método clássico e molecular**

Os resultados obtidos pelo método clássico foram comparados com os obtidos pelo método molecular na identificação das espécies.

A análise estatística dos dados foi realizada através da determinação do Coeficiente *Kappa* (Program Analyse-it®, version 1,73. Copyright c 1997-2000, Analyse-it software Ltda, England, UK) pela correlação entre identificação bioquímica com a molecular. O coeficiente *Kappa* avalia a precisão de um método, comparando-o com um método-referência. A concordância total entre os resultados dos dois métodos resulta num valor de *Kappa* igual a 1,0 (um), enquanto a total discordância é igual a 0 (zero). De acordo com os resultados, classifica-se da seguinte forma: concordância leve ( $Kappa < 0,4$ ), concordância moderada ( $0,4 \leq Kappa < 0,8$ ), concordância forte ( $0,8 \leq Kappa < 1,0$ ) e concordância perfeita ( $Kappa = 1,0$ )

### 5.3 PERFIL DE SENSIBILIDADE ÀS DROGAS ANTIFÚNGICAS

Foi determinado o perfil de sensibilidade aos antifúngicos fluconazol e anfotericina B pelas metodologias de difusão em agar por Etest e microdiluição em caldo, segundo os documentos M27-A2 (CLSI, 2002) e E. Dis. 7.1 (EUCAST, 2002).

#### 5.3.1 Difusão em agar: Etest

As fitas Etest (AB BIODISK, Solna, Sweden) dos antifúngicos anfotericina B e fluconazol foram adquiridos comercialmente. Os gradientes de concentração para anfotericina B variam em uma escala de 0,002 a 32,0 µg/mL e para fluconazol de 0,016 a 256,0 µg/mL. As fitas foram estocadas a -20° C até o momento do uso. O meio de cultura utilizado foi agar Mueller-Hinton suplementado com 2,0% de glicose e azul de metileno 0,5 µg/mL (SIMS, 2006) (Anexo B). Foram utilizadas placas de 90mm de diâmetro contendo agar na espessura de 4 mm. A superfície do ágar foi inoculada com *swab* atóxico embebido na suspensão celular da amostra (turbidez equivalente a escala 0,5 de McFarland). Após o excesso de umidade ter sido adsorvido na superfície do agar e esta se mostrar completamente seca, uma fita de cada antifúngico foi aplicada na placa em posições antiparalelas. As placas foram incubadas à temperatura de 35° C e lidas após 24 horas e os alos de inibição foram lidos.

A interpretação dos resultados foi realizada conforme critérios estabelecidos pelo fabricante Etest. Para fluconazol a CIM foi estabelecida como a menor concentração na qual

as bordas da zona elíptica de inibição intercepta a fita e. Na presença de crescimento residual no interior da zona de inibição (*trailing*), o valor de CIM foi estabelecido como o ponto onde houve aproximadamente inibição de 80% do crescimento (PFALLER et al., 2003). A CIM para anfotericina B foi lida no ponto em que uma zona de inibição completa interceptou a fita (LOZANO-CHIU et al., 1998).

As CIMs nas quais 50% (CIM50) e 90% (CIM90) dos isolados foram inibidos foram determinadas.

### 5.3.2 Microdiluição: CLSI e EUCAST

#### 5.3.2.1 Antifúngicos

Fluconazol (Pfizer) foi cedido pela empresa fabricante e anfotericina B foi adquirida comercialmente (Sigma, EUA). Os antifúngicos foram obtidos na forma de pó e, para execução do teste, soluções-estoque das drogas foram preparadas conforme recomendado no documento M27-A2 do CLSI (CLSI, 2002).

#### 5.3.2.2 Meio de cultura

Foi utilizado o meio sintético RPMI-1640 (Sigma, EUA) com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio e com indicador de pH vermelho de fenol. O meio foi tamponado com ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico (MOPS) (Sigma, EUA) em concentração final de 0,165 mol/mL, pH 7,0 à temperatura de 25° C. Para o teste segundo EUCAST, o meio foi suplementado com glicose (2 %). A esterilização do meio foi feita por filtração em membrana com poros de 0,22µm (anexo B).

#### 5.3.2.3 Preparo das placas de microdiluição

As soluções-estoque foram diluídas em série, de modo que as concentrações finais dos antifúngicos variassem de 128 µg/mL a 0,25 µg/mL para fluconazol e 16 µg/mL a 0,06 µg/mL para anfotericina B, em meio RPMI (CLSI) e RPMI suplementado de glicose (EUCAST).

Foram utilizadas placas de microtitulação (Evergreen Scientific, EUA) com 96 poços e fundo plano. Cem microlitros de cada concentração da droga avaliada foram distribuídos em

ordem decrescente nos orifícios das colunas 2 a 11, com pipeta multicanal e ponteiros descartáveis estéreis. As placas foram cobertas com películas plásticas aderentes (Axygen Scientific, EUA), tampadas, acondicionadas em saco plástico e congeladas à  $-70^{\circ}\text{C}$ , até o momento do uso. As placas contendo anfotericina B foram envolvidas também em papel alumínio.

#### 5.3.2.4 *Inóculos*

Para preparo do inóculo, as amostras foram cultivadas em ágar Sabouraud sem cloranfenicol e incubadas a  $35^{\circ}\text{C}$  por 24 h. Com uma alça descartável, 1 a 5 colônias de cada isolado da levedura foram suspensas em 5mL de solução salina estéril. A suspensão foi homogeneizada e a turbidez foi ajustada, em espectrofotômetro (530nm), à equivalente a do tubo 0,5 da escala de McFarland.

Para o documento M27-A2 do CLSI, a suspensão foi diluída 1:50 em solução salina estéril e em, seguida, diluída a 1:20 em RPMI, para obtenção do inóculo contendo 1 a  $5 \times 10^3$  ufc/mL.

Para o documento Dis. 7.1 do EUCAST, a suspensão foi diluída 1:10 em RPMI suplementado de glicose, obtendo-se inóculo com 1 a  $5 \times 10^5$  ufc/mL.

#### 5.3.2.5 *Inoculação nas placas de microdiluição*

Alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  de inóculo foram distribuídas nos poços das 8 fileiras das colunas de 2 a 11 da placa de microtitulação. Cada fileira de A a F correspondeu a um isolado de *Candida* (6 isolados por placa). As fileiras G e H foram reservadas às cepas-padrão. Após a adição do inóculo, o intervalo de concentrações finais das drogas nas placas foi de 64  $\mu\text{g/mL}$  a 0,12  $\mu\text{g/mL}$  para fluconazol e de 8  $\mu\text{g/mL}$  a 0,015  $\mu\text{g/mL}$  para anfotericina B. A concentração final do inóculo foi de 0,5 a  $2,5 \times 10^3$  ufc/mL para o CLSI e 0,5 a  $2,5 \times 10^5$  ufc/mL para o EUCAST.

A coluna 1 foi preenchida com 200  $\mu\text{L}$  de RPMI em cada poço (sendo o RPMI do mesmo lote utilizado para preparo do inóculo) e serviu como controle negativo ou de esterilidade do meio. Essa coluna foi também utilizada como “branco” do espectrofotômetro na leitura automatizada.

A coluna 12, utilizada como controle positivo ou de crescimento, conteve 100 µL do meio RPMI e 100 µL de inóculo em cada poço. Essa coluna permitiu a avaliação quantitativa do crescimento de cada isolado durante o teste.

As placas foram homogeneizadas por rotação em agitador de Klime (Barnstead-Thermolyne, EUA), por 15 minutos a 60 rpm, e incubadas à temperatura de 35° C, sem agitação, por 24 horas (EUCAST) e 48 horas (CLSI).

#### 5.3.2.6 *Controle de qualidade*

Utilizou-se em todos os testes e em todas as placas, as cepas-padrão: *C. parapsilosis* ATCC 22019, e *C. krusei*, ATCC 6258, com perfil de sensibilidade conhecido, com valores de CIM menores que 8 µg/mL e acima de 16 µg/mL para fluconazol, respectivamente.

#### 5.3.2.7 *Leitura e interpretação dos resultados*

A leitura da turbidez resultante do crescimento dos inóculos, em cada poço das placas foi realizada em espectrofotômetro (Titertek Multiscan, Suécia) em comprimento de onda de 530nm. Os resultados foram impressos para análise e determinação da CIM.

O ponto final de leitura para obtenção do valor de CIM foi definido para fluconazol como a menor concentração na qual ocorreu 50% ou mais de inibição do crescimento do inóculo, em comparação com o poço da coluna 12 (controle positivo). Para anfotericina B, o ponto final foi definido no poço onde ocorreu inibição de pelo menos 90% de crescimento, com a mesma referência.

Os resultados obtidos pelas metodologias CLSI, EUCAST e Etest foram considerados equivalentes quando apresentaram variação de, no máximo, duas diluições (CUENCA-ESTRELLA et al., 2005)

#### 5.3.3 **Análise quantitativa e qualitativa**

As amostras foram classificadas em três categorias de acordo com os valores de CIMs: sensível (S), sensível dose-dependente (SDD) e resistente (R) aos antifúngicos (Anexo C). Embora a interpretação do *endpoint* para anfotericina B ainda não tenha sido estabelecida, valores arbitrários foram estabelecidos de acordo com estudos prévios de Cuenca-Estrella

(2005). As interpretações das CIMs para fluconazol foram: – suscetível  $\leq 2\mu\text{g/mL}$ , intermediário  $4\text{--}8\mu\text{g/mL}$  e resistente  $\geq 16\mu\text{g/mL}$ ; e para anfotericina B foram: suscetível  $\leq 0,25\text{ mg/L}$ , intermediário  $0,50\text{--}1,0\mu\text{g/mL}$  e resistente  $\geq 2\mu\text{g/mL}$ .

A variação de valores de CIM de cada droga foi avaliada representando os limites inferior e superior das CIMs de cada antifúngico para os métodos Etest, CLSI e AFST-EUCAST.

Foram determinados a CIM50 e CIM90 que representam a concentração inibitória mínima da droga capaz de inibir o crescimento de 50 e 90% das amostras testadas, respectivamente.

#### 5.3.4 Comparação de metodologias: Etest, CLSI e EUCAST

Os resultados obtidos pelo sistema alternativo de difusão em agar Etest (AB-Biodisk, Solna, Sweden) foram comparados com os obtidos pelo método de microdiluição em caldo referência M27-A2 do CLSI (NCCLS, 2002) e documento E. Dis. 2.1 (EUCAST, 2002).

A análise estatística dos dados foi realizada através da determinação e avaliação do Coeficiente de Correlação de Pearson ( $r$ ) (version 1.73, Analyse-it Software) pela correlação da CIM obtida pelo método Etest com as CIMs obtida pelos métodos CLSI e EUCAST. A correlação de Pearson também conhecida por correlação linear é um teste que avalia como as variáveis estão relacionadas linearmente.

O grau de associação é expresso pelo coeficiente de correlação ( $r$ ). O valor de  $r$  pode variar de  $-1$  a  $+1$ , com  $-1$  indicando uma correlação negativa perfeita,  $+1$  indicando uma correlação positiva perfeita e  $0$  indicando nenhuma correlação. Portanto, se  $r$  estiver dentro dos valores citados e  $P < 0,05$  os métodos são significativamente correlacionados. Tanto os resultados *on-scale* quanto *off-scale* foram incluídos na análise devido ao fato de as fitas Etest conterem um gradiente contínuo do antifúngico testado ao contrário do  $\log_2$  da diluição do antifúngico, esquema observado nos métodos de microdiluição em caldo. Assim sendo, os valores das CIMs obtidas pelo método Etest foram elevados até à próxima concentração equiparável ao esquema da microdiluição (CLSI e EUCAST) a fim de facilitar a comparação dos resultados.

A porcentagem de concordância entre Etest e os métodos EUCAST e CLSI foi definida como a proporção de diluições Etest que se encontravam na faixa de  $\pm 2 \log_2$  diluições dos

métodos de microdiluição. Portanto, os valores foram considerados como concordantes quando as discrepâncias entre os métodos não ultrapassavam mais de 2 log<sub>2</sub> diluições. Em adição, os resultados obtidos pelo Etest foram analisados no intuito de se determinar se os valores das CIMs obtidos foram maiores ou menores do que os estabelecidos pelos métodos CLSI e EUCAST.

Classificações interpretativas dos isolados, resultantes das análises dos valores das CIMs obtidos por cada um dos métodos, foram comparados e as discrepâncias definidas como se segue: 1) *minor*, isolado classificado como S ou R pelo método alternativo Etest e como S-DD pelo referência; 2) *major*, isolado classificado como S pelo CLSI ou EUCAST e como R pelo Etest; 3) *very major*, isolado classificado como R pelo CLSI ou EUCAST e como S pelo Etest (MATAR et al., 2003).

#### 5.4 SELEÇÃO DE FENÓTIPOS DE RESISTÊNCIA A FLUCONAZOL E ANFOTERICINA B

O teste foi realizado com base na metodologia empregada por Xu et al. (2001) com modificações. A capacidade de crescimento na presença de antifúngico foi avaliada em 2 fases: triagem e seleção de fenótipos resistentes à droga. Foi utilizado meio de cultura agar batata (Remel, EUA), contendo 8 µg/mL de fluconazol e agar RPMI (Sigma, EUA), acrescido de 1,0µg/mL de anfotericina B. Os critérios para escolha das concentrações dos antifúngicos foram de acordo com os valores de *breakpoint* estabelecidos por Cuenca-Estrella et al. (2005).

##### 5.4.1 Fase de triagem

Depois do cultivo de 24 h em meio ágar Sabouraud a 37°C, as 30 amostras de *C. albicans* foram inoculadas em dois tubos contendo solução salina, sendo um com turbidez ajustada para o tubo 0,5 da escala de McFarland e o outro com turbidez equivalente à do tubo 5 da mesma escala. O primeiro tubo foi diluído 100 vezes. Dessa forma, obteve-se duas concentrações de inóculo (da ordem de 10<sup>4</sup> e 10<sup>7</sup> ufc/mL) para cada cepa. Com auxílio de *swab* estéril inoculou-se a suspensão das leveduras por toda a superfície da placa de ágar batata adicionado de fluconazol (8µg/mL) e agar RPMI, acrescido de 1,0µg de anfotericina B por mL. Incubou-se por 24 horas à 37°C (Anexo D).

Como controle foram utilizadas cepas-padrão de *C. parapsilosis* (ATCC 22019) e *C. krusei* (ATCC 6258). As amostras que não apresentaram crescimento na presença de fluconazol foram utilizadas na fase de seleção A, descrita a seguir, e as amostras que não apresentaram crescimento na presença de anfotericina B foram utilizadas na fase de seleção B.

#### 5.4.2 Fase de seleção de fenótipos de resistência

##### 5.4.2.1 Seleção A - Fluconazol → Anfotericina B

As cepas selecionadas para esta fase foram aquelas amostras que não cresceram na fase de triagem, as quais, foram repicadas em ágar Sabouraud por 24h. Com auxílio de *swab* descartável estéril, inoculou-se as leveduras em tubos contendo 3 mL de caldo *Yeast Extract Peptone Dextrose* (YEPD) (Difco, EUA) e incubou-se à temperatura de 37°C. Após 24 h, os tubos foram centrifugados (4.000 rpm por 5 minutos) e as células lavadas duas vezes com solução salina estéril. Ressuspendeu-se as células em solução salina ( $10^9$  ufc/mL) e aferiu-se a concentração espectral por espectrofotometria. A suspensão foi, então, vertida na superfície do meio ágar batata acrescido de 8 µg de fluconazol por mL. As placas foram incubadas a 37°C por até 48 h. As colônias que apresentaram crescimento visível foram selecionadas, aleatoriamente, e cultivadas em 3 mL de caldo YEPD a 37°C. Após 24 h, os tubos foram centrifugados (4.000 rpm por 5 minutos) e as células lavadas duas vezes com solução salina estéril. Ressuspendeu-se as células em solução salina ( $10^9$  ufc/mL). O material foi então vertido na superfície do meio agar RPMI acrescido de 1,0 µg de anfotericina B por mL. A placa foi incubada a 37°C por até 48 h. Três a quatro colônias foram selecionadas, aleatoriamente, e cultivadas em meio ágar Sabouraud a 37°C por 24 h para determinação da CIM (Anexo E).

##### 5.4.2.2 Seleção B – Anfotericina B → Fluconazol

As cepas selecionadas para esta fase foram aquelas amostras que não cresceram na fase de triagem, as quais, foram repicadas em ágar Sabouraud por 24h. Com auxílio de *swab* descartável estéril, inoculou-se as leveduras em tubos contendo 3 mL de caldo YEPD e incubou-se à temperatura de 37°C. Após 24 horas, os tubos foram centrifugados (4.000G por 5 minutos) e as células lavadas duas vezes com solução salina estéril. Ressuspendeu-se as células em solução salina ( $10^9$  ufc/mL). A suspensão foi então vertida na superfície do meio



agar RPMI acrescido de 1,0µg/mL de anfotericina B. As placas foram incubadas a 37°C por até 48 horas. As colônias que apresentaram crescimento visível foram selecionadas, aleatoriamente, e cultivadas em 3 mL de caldo YEPD a 37°C. Após 24 horas, os tubos foram centrifugados (4.000 rpm por 5 minutos) e as células lavadas duas vezes com solução salina estéril. Ressuspendeu-se as células em solução salina ( $10^9$  ufc/mL, medido por espectrofotometria). O material foi então vertido na superfície do meio ágar batata acrescido de 8,0µg de fluconazol por mL. As placas foram incubadas a 37°C por até 48 horas. Três a quatro colônias foram selecionadas, aleatoriamente, e cultivadas em meio agar Sabouraud a 37°C por 24 horas para determinação da CIM (Anexo E).

## 5.5 INDUÇÃO DE FENÓTIPOS DE RESISTÊNCIA A FLUCONAZOL E ANFOTERICINA B

Os testes para indução de resistência cruzada foram realizados com as amostras que apresentaram capacidade de crescer em meio ágar batata contendo 8,0µg de fluconazol por mL e/ou meio RPMI contendo anfotericina B na concentração 1,0µg/mL.

Os testes se iniciaram com o cultivo das amostras em meio ágar batata adicionado de fluconazol em concentrações crescentes e em seguida foi feito cultivo em meio RPMI adicionado de anfotericina B em concentrações crescentes (Indução A). Também foi feita a indução inversa, iniciando com meio RPMI contendo anfotericina B e por fim com meio agar batata contendo fluconazol (Indução B).

### 5.5.1 Indução A

Foram escolhidas três amostras que apresentaram crescimento na presença de fluconazol (8,0 µg/mL) e que tiveram os maiores resultados de CIM.

Depois do cultivo de 24 h em agar Sabouraud a 35°C as amostras foram repicadas em placas de Petri com meio ágar batata contendo 8,0µg de fluconazol por mL e incubado por até 48 horas. Depois foram feitos repiques sucessivos de até 48 horas para placas de Petri com meio ágar batata, adicionado de fluconazol nas concentrações de 16,0; 32,0; 64,0; 128 e 256µg/mL. Colônias foram selecionadas nas placas de maior concentração que apresentaram crescimento. Estas foram, então, submetidas a repiques sucessivos em meio agar RPMI

contendo concentrações crescentes de anfotericina B (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0µg/mL). Colônias que apresentaram crescimento nos meios contendo a maior concentração do antifúngico, foram selecionadas, aleatoriamente, e submetidas a testes de sensibilidade a fluconazol e anfotericina B conforme descrito no item 5.3.

### **5.5.2 Indução B**

Foram escolhidas três amostras que apresentaram crescimento na presença de anfotericina B (1,0µg/mL).

Depois do cultivo de 24 h em agar Sabouraud a 35°C as amostras foram repicadas em placas de Petri com meio ágar RPMI contendo 1,0µg de anfotericina B por mL e incubadas por até 48 h. Depois foram feitos repiques sucessivos de até 48 h para placas de Petri com meio ágar RPMI adicionado de anfotericina B nas concentrações: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0µg/mL. Colônias que apresentaram crescimento nos meios com maior concentração, aleatoriamente, foram selecionadas. para repiques sucessivos em meio ágar batata contendo concentrações crescentes de fluconazol (16,0; 32,0; 64,0; 128 e 256µg/mL). Na placa de maior concentração do antifúngico que apresentou crescimento, colônias foram selecionadas, aleatoriamente, e submetidas a testes de sensibilidade aos antifúngicos fluconazol e anfotericina B conforme descrito no item 5.3.

### **5.6 VERIFICAÇÃO DA ESTABILIDADE DOS FENÓTIPOS DE RESISTÊNCIA**

As amostras que apresentaram perfil SDD ou R, aos antifúngicos anfotericina B e fluconazol, foram avaliadas quanto à estabilidade deste fenótipo. Estas cepas foram submetidas a até 30 repiques sucessivos a intervalos de 24 h em meio ágar Sabouraud sem droga, e incubadas à temperatura de 35°C. Foram realizados testes de sensibilidade aos dois antifúngicos pela metodologia Etest semanalmente.

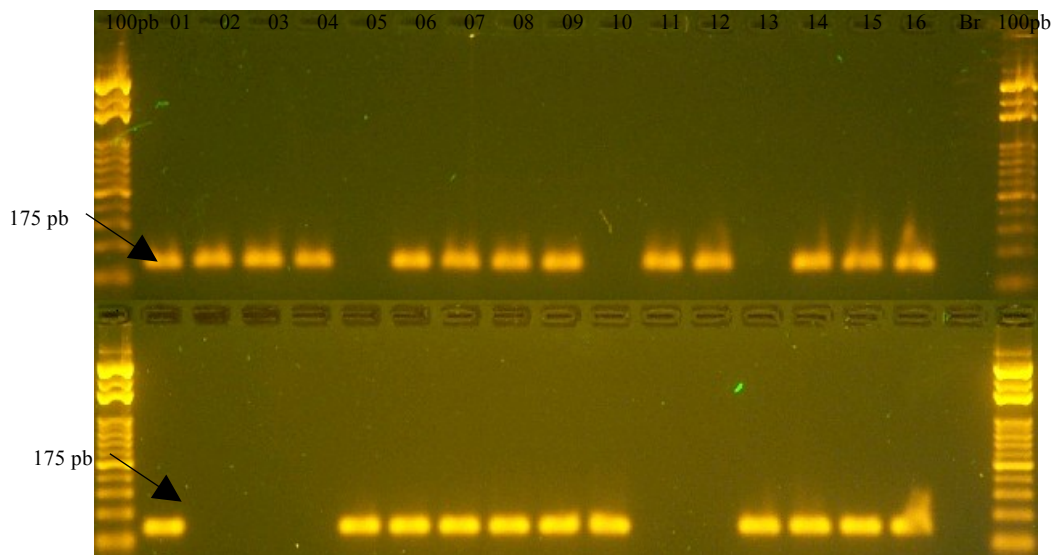
### **5.7 ANÁLISE DA IDENTIDADE MOLECULAR DAS CEPAS MUTANTES**

A identidade molecular dos fenótipos de resistência e seus respectivos isolados de origem foram realizados pela amplificação da região ITS2 utilizando a metodologia descrita no item 5.2.2.3.4.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES

Dentre os isolados, foram identificados pelo método clássico 22 (73,33%) *C. albicans*, 3 (10%) *C. tropicalis*, 3 (10%) *C. parapsilosis* e 2 (6,67%) *C. glabrata*. Na análise molecular da região 26S rDNA, nenhuma das 30 amostras foi classificada como *C. dubliniensis*, pois não apresentaram amplificação com os primers NL4CAL e CDU2 (específicos para *C. dubliniensis*). Com os primers, NL4CAL e CAL5, específicos para *C. albicans*, 22 amostras apresentaram amplificação e as oito amostras que não amplificaram, foram identificadas no método clássico como não albicans (FIGURA 2). Essas amostras, *C. glabrata* (18Unif/06 e 25Unif/06), *C. parapsilosis* (16-Unif/06, 17-Unif/06 e 26-Unif/06) e *C. tropicalis* (04-Unif/06, 09-Unif/06 e 12 -Unif/06) foram submetidas à análise do tamanho do fragmento da região ITS2.



**Figura 2** - Gel de agarose mostrando os produtos de amplificação pela PCR das 30 amostras de levedura com os primers espécie-específico de *C. albicans* NL4CAL e CAL5. 01-Cepa-padrão *C. albicans* ATCC 10231; 02 a 16 - amostras; Br-Branco; 100pb – padrão de peso molecular.

A amplificação da região ITS2 também confirmou os resultados obtidos nas identificações pelo método clássico. Os produtos de PCR da região ITS2 das amostras de *Candida* não-*albicans* foram comparados com produtos de PCR de padrões ATCC. As

comparações foram feitas de acordo com os resultados obtidos pela classificação segundo método clássico obtido: a) *C. glabrata* foi comparada com cepas-padrão de *C. albicans* e *C. glabrata* (FIGURA 3); b) *C. parapsilosis* foi comparada com cepas-padrão de *C. albicans* e *C. parapsilosis* (FIGURA 4); c) *C. tropicalis* foi comparada com cepas-padrão de *C. albicans* e *C. tropicalis* (FIGURA 5).

Os resultados da amplificação pela PCR da região ITS2 mostraram duas amostras (18Unif/06 e 25Unif/06) com bandas coincidentes com a do padrão de *C. glabrata* (FIGURA 3), três amostras (16-Unif/06, 17-Unif/06 e 26-Unif/06) com bandas coincidentes com a do padrão de *C. parapsilosis* (FIGURA 4) e três amostras (04-Unif/06, 09-Unif/06 e 12 -Unif/06) com bandas coincidentes com a do padrão de *C. tropicalis* (FIGURA 5). Conforme Chen et al. (2000), estas espécies produzem bandas de PCR de aproximadamente 414 pb, 310 pb e 327 pb para *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, respectivamente.

A Tabela 1 mostra o resumo dos resultados das identificações.

**Tabela 1** - Comparação entre método clássico e molecular para identificação de 30 amostras de *Candida* spp.

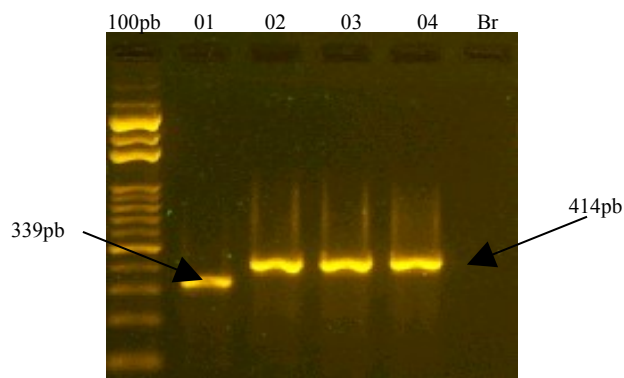
| Espécies               | Número de amostras identificadas |                       |                   |
|------------------------|----------------------------------|-----------------------|-------------------|
|                        | Método clássico                  | PCR                   |                   |
|                        |                                  | 26S rDNA <sup>1</sup> | ITS2 <sup>2</sup> |
| <i>C. albicans</i>     | 22                               | 22                    | -                 |
| <i>C. parapsilosis</i> | 03                               | -                     | 03                |
| <i>C. tropicalis</i>   | 03                               | -                     | 03                |
| <i>C. glabrata</i>     | 02                               | -                     | 02                |
| <i>C. dubliniensis</i> | 00                               | 00                    | -                 |

<sup>1</sup> Amostras que amplificaram com os “primers” espécie-específico para *C. albicans* ou *C. dubliniensis*.

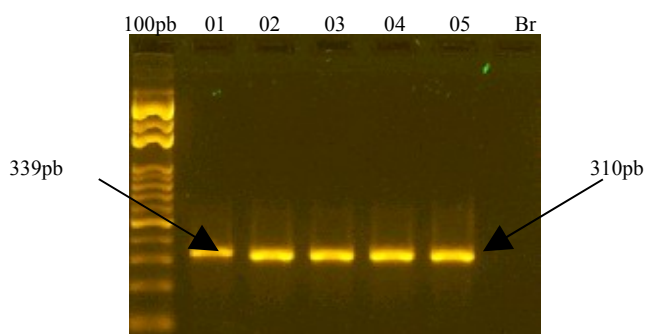
<sup>2</sup> Amostras que possuíram perfis de bandas semelhantes ao de *C. parapsilosis*, *C. glabrata* ou *C. tropicalis* com os “primers” da região ITS2.

Toda amostra classificada como *C. albicans* ou como *Candida* não-*albicans* pelo método clássico apresentou o mesmo resultado na análise molecular, mostrando uma equivalência de 100% entre as duas identificações (Anexo F).

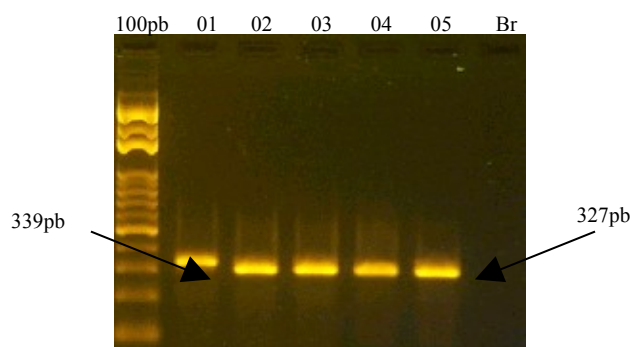
O coeficiente Kappa foi usado para comparar o método clássico com o molecular. O valor encontrado para as 30 amostras identificadas foi 1 (um). Portanto, houve concordância total nos resultados obtidos entre as duas metodologias.



**Figura 3** - Produtos de amplificação pela PCR, em gel de agarose 1,5%, utilizando os primers ITS3 e ITS4 das amostras identificadas como *C. glabrata* pelo método clássico. 1 – padrão de *C. albicans* ATCC 10231; 2 – padrão de *C. glabrata* ATCC 2001; 3 e 4 amostras 18Unif/06 e 25Unif/06; Br – Branco.



**Figura 4** - Produtos de amplificação pela PCR, em gel de agarose 1,5%, utilizando os primers ITS3 e ITS4 das amostras identificadas como *C. parapsilosis* pelo método clássico. 1 – padrão de *C. albicans* ATCC 10231; 2 – padrão de *C. parapsilosis* ATCC 22019; 3, 4 e 5 amostras 16Unif/06, 17Unif/06 e 26Unif/06; Br – Branco



**Figura 5** - Produtos de amplificação pela PCR, em gel de agarose 1,5%, utilizando os primers ITS3 e ITS4 das amostras identificadas como *C. tropicalis* pelo método clássico. 1 – padrão de *C. albicans* ATCC 10231; 2 – padrão de *C. tropicalis* ATCC 750; 3, 4 e 5 amostras 04Unif/06, 09Unif/06 e 12Unif/06; Br – Branco.

## 6.2 PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS

O perfil de sensibilidade foi expresso em valores de CIM dos antifúngicos frente aos 30 isolados de *Candida* (anexo G). As cepas controle *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6258 apresentaram valores de CIM dentro dos limites esperados.

### 6.2.1 Fluconazol

Os valores das CIMs de fluconazol (Fz) variaram de 0,125 a 48,0 µg/mL para Etest e entre 0,125 a 64,0 µg/mL para CLSI e EUCAST, para o total de 30 amostras de *Candida* (TABELA 2). Os valores de CIM50 e CIM90 para Fz foram respectivamente, 0,75µg/mL e 1,0µg/mL com a metodologia Etest, 0,12µg/mL e 0,5µg/mL com CLSI e 0,25µg/mL a 1,0µg/mL com EUCAST (TABELA 2).

Os resultados de sensibilidade a fluconazol de todas as 30 amostras mostraram que a maioria das amostras foi sensível a fluconazol. Pelos métodos CLSI e Etest, 28 (93,34%) foram sensíveis, 1 (3,33%) sensível dose-dependente e 1 (3,33%) resistente; com o método EUCAST, 28 (93,34%) amostras foram sensíveis e 2 (6,66%) resistentes (Anexo G).

**Tabela 2** - Sensibilidade *in vitro* de 30 amostras de *Candida* frente a anfotericina B e fluconazol pelos métodos EUCAST, CLSI e Etest e a correlação de Pearson entre os valores de CIM obtidos pelo método Etest e os métodos de microdiluição AFST-EUCAST e CLSI.

| Agente antifúngico | Metodologia | CIM (µg ml <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup> |       |       | Correlação de                     |
|--------------------|-------------|---|-------|-------|-----------------------------------|
|                    |             | Limites                                 | 50%   | 90%   | Pearson (r) <sup>2</sup><br>Etest |
| Anfotericina B     | EUCAST      | 0,015-0,25                              | 0,060 | 0,120 | 0,77                              |
|                    | CLSI        | 0,015-0,25                              | 0,015 | 0,120 | 0,51                              |
|                    | Etest       | 0,006-0,50                              | 0,047 | 0,125 | -                                 |
| Fluconazol         | EUCAST      | 0,12 ≥ 64                               | 0,250 | 1,000 | 0,98                              |
|                    | CLSI        | 0,12 ≥ 64                               | 0,120 | 0,500 | 1,0                               |
|                    | Etest       | 0,38-48,0                               | 0,750 | 1,000 | -                                 |

<sup>1</sup> 50% e 90%, CIMs que inibiram 50% e 90% das amostras testadas, respectivamente.

<sup>2</sup> Coeficiente de correlação de Pearson (r). (ver item 5.3.4)

### 6.2.2 Anfotericina B

Os valores das CIMs de anfotericina (AB) variam de 0,006 a 0,5 µg/mL para Etest e entre 0,015 a 0,25 µg/mL para CLSI e EUCAST, para o total de 30 amostras de *Candida* spp. Os valores de CIM50 e CIM90 para anfotericina B foram respectivamente, 0,047µg/mL e 0,125µg/mL com a metodologia Etest; 0,015µg/mL e 0,12µg/mL com o documento CLSI e 0,06µg/mL a 0,12µg/mL com EUCAST (TABELA 2).

### 6.3 COMPARAÇÃO DAS METODOLOGIAS Etest, EUCAST E CLSI.

Os Coeficientes de correlação encontrados nas comparações dos métodos Etest vs CLSI ( $r=0,98$ ) e Etest vs EUCAST ( $r=1,0$ ) para fluconazol foram maiores do que os apresentados para anfotericina B [Etest vs CLSI ( $r=0,77$ ) e Etest vs EUCAST ( $r=0,51$ )] (TABELA 2).

A CIM das amostras padrão apresentou-se dentro dos intervalos esperados (CLSI, 2002). Os valores de CIM50 e CIM90 apresentaram-se similares pelos três métodos. A comparação das CIMs obtidas pela metodologia Etest com as metodologias CLSI e EUCAST resultaram em índices de correlação variando de 1, como no caso de fluconazol (Etest/CLSI), a 0,51 como observado para anfotericina B (Etest/CLSI) (TABELA 2).

Os níveis gerais de concordância entre os métodos (CIMs Etest que se encontram  $\pm 2$  log<sub>2</sub> diluições das CIMs obtidas com os métodos CLSI e AFST-EUCAST) foram mais elevados para anfotericina B (93,33% Etest/CLSI e 90,00% Etest/EUCAST) e menores para fluconazol (66,66% Etest/CLSI e 86,66% Etest/EUCAST) (TABELA 3).

A sensibilidade *in vitro* das 30 amostras de *Candida* está resumida na Tabela 4 onde as classificações interpretativas S, SDD e R podem ser observadas. As CIMs de anfotericina B e fluconazol concentram-se na categoria S, com exceção das amostras (12-Unif/06 e 18-Unif/06). Os dois antifúngicos testados apresentaram uma alta concordância na categoria (anfotericina 100%, fluconazol  $\geq 96,66\%$ ). Nenhum isolado resistente foi observado em relação a anfotericina B. Enquanto que, para fluconazol, uma amostra (12Unif/06) foi classificada como resistente por todas as metodologias e outra (18Unif/06) como resistente pela metodologia EUCAST e como sensível dose-dependente pelas metodologias Etest e CLSI. Nenhuma das classificações em relação à anfotericina B, pelo método alternativo Etest representou discrepâncias “minor”, “major” ou “very major” em relação às duas metodologias propostas CLSI e AFST-EUCAST. Entretanto, uma discrepância em relação ao fluconazol foi



observado, pois a amostra 18-Unif/06 foi enquadrada na categoria “menor” em relação à metodologia AFST-EUCAST (TABELA 4).

**Tabela 3** - Distribuição das diferenças das CIMs para 30 amostras de *Candida* e porcentagem de concordância dentre 3 diluições para metodologia Etest e microdiluição (CLSI e AFST-EUCAST).

| Comparação | Agente          | Número de amostras com valores de CIM pelo método |    |    |   |    |    |     | ± 2 log <sub>2</sub> diluições (%) <sup>1</sup> |
|------------|-----------------|---|----|----|---|----|----|-----|---|
|            |                 | Etest diferentes dos métodos de microdiluição     |    |    |   |    |    |     |   |
|            |                 | >+2   | +2 | +1 | 0 | -1 | -2 | >-2 |   |
| Etest/     | AB <sup>2</sup> | 1   | 8  | 8  | 3 | 7  | 2  | 1   | 93,33   |
| CLSI       | Fz <sup>3</sup> | 10  | 15 | 1  | 3 | 1  | -  | -   | 66,66   |
| Etest/     | AB <sup>2</sup> | 1   | 2  | 2  | 6 | 15 | 2  | 2   | 90,00   |
| EUCAST     | Fz <sup>3</sup> | 4   | 13 | 8  | 2 | 2  | 1  | -   | 86,66   |

<sup>1</sup> Proporção de concordância entre os resultados é definida como a proporção de CIMs Etest que se encontram dentre os valores ±1 ou 2 log<sub>2</sub> CIMs obtidos pelos métodos de microdiluição em caldo.

<sup>2</sup> Anfotericina B.

<sup>3</sup> Fluconazol.

**Table 4** - Comparação entre as metodologias Etest com EUCAST e Etest com CLSI segundo as categorias de concordância e a taxa de erros.

| Comparação | Agente | % concordância na categoria <sup>1</sup> | Número de amostras por categoria <sup>2</sup> |      |   | Número de amostras com resultados discrepantes <sup>3</sup> |       |            |
|------------|--------|--|---|------|---|---|-------|------------|
|            |        |  | S   | S-DD | R | Minor   | Major | Very major |
| Etest vs   | AB     | 100,00                                   | 30  | 0    | 0 | 0   | 0     | 0          |
| EUCAST     | Fz     | 96,66                                    | 28  | 0    | 2 | 1   | 0     | 0          |
| Etest vs   | AB     | 100,00                                   | 30  | 0    | 0 | 0   | 0     | 0          |
| CLSI       | Fz     | 100,00                                   | 28  | 1    | 1 | 0   | 0     | 0          |

<sup>1</sup> As taxa de concordância refletem a porcentagem de amostras classificadas na mesma categoria pelo método CLSI e AFST-EUCAST e pelo alternativo Etest.

<sup>2</sup> Número de amostras classificadas em determinada categoria (S, S-DD, R), ver definições em material e métodos.

<sup>3</sup> Número de amostras que apresentou discrepância menor, major ou very major em relação aos resultados obtidos pelos métodos CLSI e AFST-EUCAST, ver definições em material e métodos.

## 6.4 SELEÇÃO DE CEPAS RESISTENTES A FLUCONAZOL E ANFOTERICINA B

### 6.4.1 Seleção iniciando com fluconazol (seleção A)

Na fase de triagem todas as 30 amostras selvagens foram inoculadas em meio ágar batata acrescido de fluconazol (8µg/mL). Apenas quatro amostras (8-Unif/06, 9-Unif/06, 16-Unif/06, e 26-Unif/06) não apresentaram crescimento em nenhuma das suspensões inoculadas

( $10^4$  e  $10^7$  UFC/ml). Estas, então, foram utilizadas para os testes de seleção de mutantes resistentes ao fluconazol.

A seleção A foi feita iniciando-se com fluconazol seguida de anfotericina B. Depois do cultivo em caldo YEPD as amostras selvagens 8-Unif/06, 9-Unif/06, 16-Unif/06, e 26-Unif/06 apresentaram crescimento visível em placas de Petri contendo ágar batata acrescido de fluconazol ( $8\mu\text{g/mL}$ ) com suspensões da ordem de  $10^9$  ufc/mL. Destas quatro amostras três foram capazes de crescer em meio RPMI adicionado de anfotericina B ( $1,0\mu\text{g/mL}$ ), após um novo cultivo em caldo YEPD e, por isso, foram consideradas fenótipos de resistência e denominadas 9-SFA, 16-SFA, e 26-SFA.

#### **6.4.2 Seleção iniciando com anfotericina B (seleção B)**

Na fase de triagem as 30 amostras foram cultivadas em meio RPMI acrescido de anfotericina B ( $1,0\mu\text{g/ml}$ ). Nenhuma amostra foi capaz de crescer em 24 horas em ambas as suspensões inoculadas ( $10^4$  e  $10^7$  UFC/mL), porém, a amostra 12-Unif/06 apresentou algumas colônias apenas com inóculo de  $10^7$  ufc/mL. As 23 amostras que apresentaram pelo menos uma colônia na placa após 48 horas de incubação (1-Unif/06, 4-Unif/06, 6- Unif/06, 7-Unif/06, 8- Unif/06, 9-Unif/06, 10- Unif/06, 11-Unif/06, 12-Unif/06 13- Unif/06, 14-Unif/06, 15-Unif/06, 16-Unif/06, 17-Unif/06, 18-Unif/06, 20- Unif/06, 21-Unif/06, 24- Unif/06, 25-Unif/06, 26-Unif/06, 27-Unif/06, 29- Unif/06 e 30-Unif/06) não foram utilizadas nos testes subsequentes de seleção. As 7 amostras que não cresceram em  $1,0\mu\text{g/mL}$  em 24 horas (2-Unif/06, 3-Unif/06, 5-Unif/06, 19-Unif/06, 22-Unif/06, 23-Unif/06 e 28-Unif/06) foram utilizadas na fase de seleção de mutantes resistentes à anfotericina B.

A seleção B foi feita iniciando com anfotericina B e depois com fluconazol. Depois do cultivo em caldo YEPD, com exceção de 2 amostras selvagens (2-Unif/06 e 5-Unif/06), as cinco amostras (3-Unif/06, 19-Unif/06, 22-Unif/06, 23-Unif/06 e 28-Unif/06) apresentaram crescimento visível em placas de Petri contendo meio RPMI acrescido de anfotericina B ( $1,0\mu\text{g/ml}$ ). Destas cinco amostras mutantes três foram capazes de crescer em meio ágar batata adicionado de fluconazol ( $8,0\mu\text{g/mL}$ ), após um novo cultivo em caldo YEPD e, por isso, foram consideradas fenótipos de resistência e denominadas 3-SAF, 19-SAF, e 22-SAF.

#### 6.4.3 Perfil de sensibilidade das amostras mutantes

As cepas selecionadas foram submetidas ao teste de sensibilidade ao fluconazol e à anfotericina B segundo a metodologia proposta pelo CLSI, AFST-EUCAST e Etest. Os resultados das CIMs foram comparados aos resultados obtidos com as mesmas cepas antes do teste de crescimento na presença de fluconazol e anfotericina B. A Tabela 5 apresenta os resultados dos testes de sensibilidade antes e após a seleção.

A amostra 09-SAF que foi selecionada a partir da cultura de 09-Unif/06 (sensível a anfotericina B e fluconazol) em meio contendo fluconazol e em seguida em meio com anfotericina B, apresentou-se como resistente a fluconazol em todas as metodologias. Mas, em relação a anfotericina B, o perfil de sensibilidade manteve-se o mesmo.

**Tabela 5** - Resultado do teste de sensibilidade ao fluconazol e à anfotericina B antes e após a seleção em meios adicionado dos antifúngicos fluconazol e anfotericina B.

| Cepas               | CIM inicial/ CIM final ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sup>1</sup> |           |           |                |            |           |
|---------------------|--|-----------|-----------|----------------|------------|-----------|
|                     | Fluconazol   |           |           | Anfotericina B |            |           |
|                     | Etest  | CLSI      | EUCAST    | Etest          | CLSI       | EUCAST    |
| 09-SFA <sup>2</sup> | 0,75/48,0  | 0,12/64,0 | 1,00/64,0 | 0,190/0,230    | 0,250/0,12 | 0,25/0,25 |
| 16-SFA <sup>2</sup> | 0,38/0,75  | 0,12/0,50 | 0,12/0,50 | 0,064/0,640    | 0,120/0,25 | 0,06/0,50 |
| 26-SFA <sup>2</sup> | 0,50/1,00  | 0,12/0,12 | 0,12/0,25 | 0,190/0,016    | 0,250/0,25 | 0,12/0,50 |
| 03-SAF <sup>3</sup> | 0,38/0,50  | 0,12/0,25 | 0,12/0,12 | 0,023/0,023    | 0,015/0,12 | 0,06/0,12 |
| 19-SAF <sup>3</sup> | 0,50/0,75  | 0,12/0,12 | 0,25/0,25 | 0,094/0,047    | 0,015/0,25 | 0,12/0,12 |
| 22-SAF <sup>3</sup> | 0,75/1,00  | 0,12/0,12 | 0,25/0,25 | 0,047/0,230    | 0,015/0,25 | 0,06/0,25 |

<sup>1</sup> CIM antes da seleção/CIM depois da seleção.

<sup>2</sup> SFA- Amostra selecionada a partir de meios adicionados primeiro com fluconazol e em seguida em meios adicionados de anfotericina B.

<sup>3</sup> SAF- Amostra selecionada a partir de meios adicionados primeiro com anfotericina B e em seguida em meios adicionados com fluconazol.

Nenhuma das amostras estudadas apresentaram resultados de CIM menores para fluconazol nas três metodologias empregadas.

As amostras 16-SAF, 26-SAF, 03-SFA, 19-SFA e 22-SFA apresentaram pequeno aumento (até duas diluições) nos valores das CIMs para fluconazol, mantendo-se classificado como sensíveis. Apenas a amostra 22-SAF apresentou aumento nos valores da CIM para anfotericina B nas três metodologias utilizadas (Etest: de 0,047 para 0,23; CLSI: de 0,015 para 0,25; EUCAST: de 0,06 para 0,25), porém este aumento não levou a mudança de sensibilidade ao antifúngico, permanecendo como sensível a droga (TABELA 5).

## 6.5 INDUÇÃO DE CEPAS RESISTENTES A FLUCONAZOL E ANFOTERICINA B

### 6.5.1 Indução iniciando com fluconazol (indução A)

Três amostras (04-Unif/06, 13-Unif/06 e 18-Unif/06), que foram selecionadas para os teste de indução A, apresentaram crescimento em todas as concentrações de fluconazol (16,0; 32,0; 64,0; 128 e 256 µg/mL) e de anfotericina B (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 µg/mL) e, por isso, foram consideradas fenótipo de resistência e denominadas 4-IFA, 13-IFA e 18-IFA.

### 6.5.2 Indução iniciando com anfotericina B (indução B)

Nesta fase três amostras (04-Unif/06, 09-Unif/06 e 12-Unif/06), que foram selecionadas para os teste de indução B, apresentaram crescimento frente às concentrações de anfotericina B de 2,5, 3,0 e 2,0 µg/mL, respectivamente e em seguida cresceram em todas as concentrações de fluconazol analisadas, portanto, estas cepas foram consideradas fenótipo de resistência e denominadas 04-IAF, 09-IAF e 12-IAF.

### 6.5.3 Perfil de sensibilidade das amostras mutantes

Todas as seis amostras utilizadas nos teste de indução foram submetidas ao teste de sensibilidade a fluconazol e a anfotericina B segundo a metodologia proposta pelo CLSI, AFST-EUCAST e Etest (CLSI, 2002; CUENCA-ESTRELLA, 2005). Os resultados das CIMs foram comparados aos resultados obtidos pelas mesmas cepas, antes da indução de crescimento na presença de fluconazol e anfotericina B. A Tabela 6 apresenta os resultados dos testes de sensibilidade antes e após a indução.

Em relação a anfotericina B nenhuma das amostras obtida por indução foi classificada como resistente ( $CIM \geq 2,0 \mu\text{g/ml}$ ). As CIMs não variaram mais do que duas diluições para cima ou para baixo, mantendo-se todas as amostras sensíveis a droga (TABELA 6).

Para fluconazol, as mudanças nos valores da CIM das amostras 04-IFA, 13-IFA e 04-IAF foram pequenas (até duas diluições) e não modificaram suas classificações iniciais, mantendo-se sensíveis a droga. A amostra 18-IFA, inicialmente classificada com sensibilidade intermediária ( $CIM_{4,0-8,0} \mu\text{g/ml}$ ) a fluconazol pelas metodologias Etest ( $CIM=4,0 \mu\text{g/ml}$ ) e CLSI ( $CIM=4,0 \mu\text{g/ml}$ ) e como resistente ( $CIM \geq 16,0 \mu\text{g/ml}$ ) por AFST-EUCAST ( $CIM=16,0$

µg/ml) apresentou-se, após a indução, com sensibilidade intermediária segundo as metodologias CLSI (CIM=8,0µg/ml) e AFST-EUCAST (CIM=8,0µg/ml) e resistente pela metodologia Etest (CIM=64,0µg/ml).

A amostra 09-IAF, inicialmente classificada como sensível (CIM≤2,0µg/ml), apresentou CIM=64,0µg/ml nas três metodologias após a indução e foi classificado como resistente.

**Tabela 6** - Resultado dos testes de sensibilidade ao fluconazol e a anfotericina B antes e após a indução de crescimento na presença de concentrações crescentes de fluconazol e anfotericina B.

| Cepas               | CIM inicial/ CIM final (µg/mL) <sup>1</sup> |           |           |                |            |           |
|---------------------|---|-----------|-----------|----------------|------------|-----------|
|                     | Fluconazol                                  |           |           | Anfotericina B |            |           |
|                     | Etest                                       | CLSI      | EUCAST    | Etest          | CLSI       | EUCAST    |
| 04-IFA <sup>2</sup> | 0,50/0,50                                   | 0,12/0,25 | 0,12/0,50 | 0,125/0,032    | 0,015/0,25 | 0,06/0,50 |
| 13-IFA <sup>2</sup> | 0,75/1,00                                   | 0,25/0,12 | 0,25/0,12 | 0,047/0,047    | 0,015/0,12 | 0,06/0,12 |
| 18-IFA <sup>2</sup> | 4,00/64,0                                   | 4,00/8,00 | 16,0/8,00 | 0,047/0,023    | 0,015/0,12 | 0,12/0,12 |
| 04-IAF <sup>3</sup> | 0,50/1,00                                   | 0,12/1,00 | 0,12/1,00 | 0,125/0,016    | 0,015/0,12 | 0,06/0,12 |
| 09-IAF <sup>3</sup> | 0,75/64,0                                   | 0,12/64,0 | 1,00/64,0 | 0,190/0,380    | 0,250/0,25 | 0,25/0,25 |
| 12-IAF <sup>3</sup> | 48,0/64,0                                   | 64,0/64,0 | 64,0/64,0 | 0,500/0,380    | 0,030/0,25 | 0,25/0,25 |

<sup>1</sup> CIM antes da indução/CIM depois da indução.

<sup>2</sup> IFA- Amostra selecionada a partir de crescimento na presença de fluconazol em concentrações crescentes e depois em anfotericina B em concentrações crescentes.

<sup>3</sup> IAF- Amostra selecionada a partir de crescimento na presença de anfotericina B em concentrações crescentes e depois em fluconazol em concentrações crescentes

## 6.6 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO FENÓTIPO HETERORESISTENTE

Foi avaliado a estabilidade do fenótipo de resistência ao fluconazol para as três amostras heteroresistentes obtidas por seleção (09-SFA) e indução (18-IFA, 09-IAF). Estas amostras apresentaram variações nos valores das CIMs depois de serem submetidas a 30 repiques sucessivos em meio ágar Sabouraud sem droga. As amostras obtidas por indução (18-IFA, 09-IAF) reverteram seus fenótipos de resistentes para sensíveis. Estas mudanças foram menores nas primeiras semanas, sendo que a amostra 09-IAF voltou a ser sensível na terceira e a 18-IFA na quarta semana. A amostra 09-SFA não apresentou reversão de fenótipo após os repiques sucessivos em meio sem droga e a CIM ficou estável em 24 µg/mL (09-

SFA). A amostra 12-IAF também foi avaliada quanto à estabilidade de seu fenótipo de resistência original, mantendo-se resistente ao fluconazol após 30 repiques em meio livre da droga. (TABELA 7).

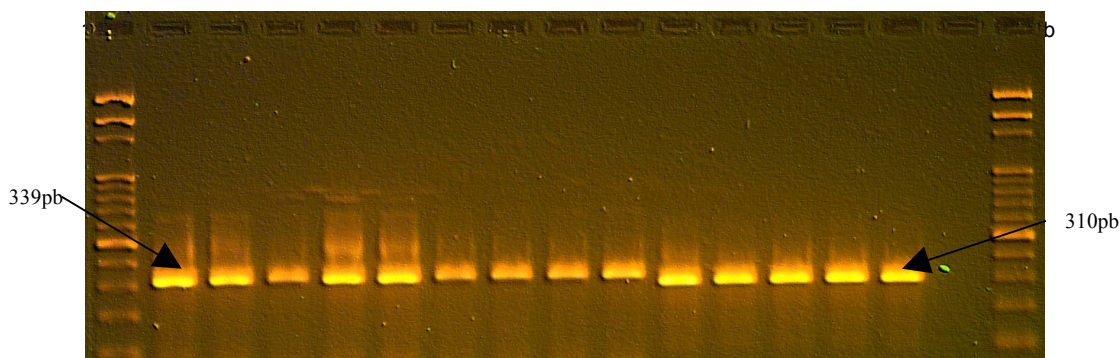
A amostra 18-IFA obtida por indução experimental apresentou-se resistente ao fluconazol (CIM= 48 $\mu$ g/mL) somente na metodologia Etest. Pela microdiluição esta amostra de *C. glabrata* manteve-se como sensível dose-dependente igual à cultura selvagem que a originou. Porém, após cultivos sucessivos com meio livre da droga, o valor de CIM pela fita Etest, reverteu ao da zona de Sensibilidade dose-dependente (CIM= 4 $\mu$ g/mL).

**Tabela 7** - Avaliação da estabilidade do fenótipo da resistência de 4 amostras de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol.

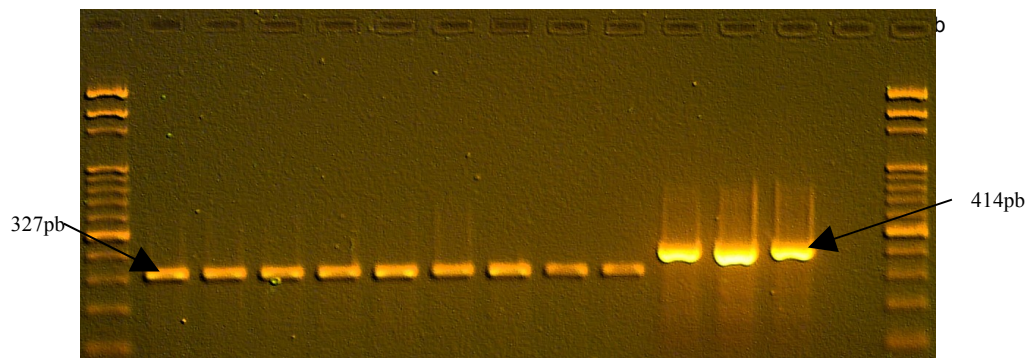
| Amostras | CIMs em 4 semanas ( $\mu$ g/mL) |         |          |        |
|----------|---------------------------------|---------|----------|--------|
|          | primeira                        | segunda | terceira | quarta |
| 09-SFA   | 48                              | 32      | 24       | 24     |
| 09-IAF   | 64                              | 16      | 4        | 2      |
| 12-IAF   | 64                              | 64      | 48       | 48     |
| 18-IFA   | 48                              | 16      | 16       | 4      |

## 6.7 AVALIAÇÃO DA IDENTIDADE MOLECULAR DAS CEPAS MUTANTES

A análise genotípica pela amplificação da região ITS2 pela PRC está representada na Figura 6 e 7. Não houve discrepância entre o tamanho dos fragmentos apresentados pelas cepas mutantes e seus respectivos isolados selvagens.



**Figura 6** - Produto de amplificação, em gel de agarose 1,5%, da região ITS2 utilizando os primers ITS3 e ITS4. Ca = *C. albicans* ATCC 10231; Cp = *C. parapsilosis* ATCC 22019; S = amostra selvagem; MS = mutante obtido por seleção; MI = mutante obtido por indução; Br = branco.



**Figura 7** - Produto de amplificação, em gel de agarose 1,5%, da região ITS2 utilizando os primers ITS3 e ITS4. Ct = *C. tropicalis* ATCC 750; Cg = *C. glabrata* ATCC 2001; S = amostra selvagem; MS = mutante obtido por seleção; MI = mutante obtido por indução; Br = branco.

## 7 DISCUSSÃO

### 7.1 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

O método clássico para identificação de microrganismos consiste na análise da morfologia e do perfil bioquímico co-nutricional específico, permitindo a diferenciação entre as espécies de leveduras, especialmente as do gênero *Candida*. No método molecular, a identificação é baseada nas características genóticas específicas de cada espécie.

As duas metodologias, clássica e molecular (PCR), identificaram quatro espécies diferentes de *Candida* entre as 30 amostras estudadas. Os métodos foram 100% concordantes, mostrando que a metodologia clássica de identificação para espécies de leveduras é bastante segura.

Apesar do resultado deste trabalho indicar correlação perfeita entre as duas metodologias, outros estudos mostram que as provas de identificação de leveduras não apresentam 100% de sensibilidade e especificidade, embora os métodos tradicionais são recomendados em qualquer laboratório que pretenda identificar espécies de leveduras. Contudo, novos métodos de diagnóstico têm sido testados nos últimos anos para a detecção precoce das infecções fúngicas (MANNARELLI e KURTZMAN, 1998; PINJON et al., 1998; CHEN et al., 2002).

Nos testes moleculares deste trabalho, utilizou-se “primers” espécie-específicos de *C. albicans* e *C. dubliniensis* para evitar erros nas identificações destas duas espécies pelo método clássico. A espécie *C. dubliniensis*, primeiramente descrita por Sullivan et al. (1995) é identificada como *C. albicans* pelos métodos clássicos de rotina. Contudo, outros testes adicionais discriminatórios foram usados a fim de resolver esse problema, como por exemplo, os testes físicos (temperatura de crescimento) e químicos (atividade da  $\beta$ -glicosidase) (PINJON, et al., 1998; SULLIVAN e COLEMAN, 1998). A análise dos resultados mostrou que, apesar desses não terem sido realizados, a identificação pelo método clássico de 22 amostras como *C. albicans* foi correta, pois na análise molecular, utilizando primers espécie-específico, nenhuma espécie de *C. dubliniensis* foi identificada.

A identificação pelo método molecular foi feita em tempo menor (2 dias) do que através do método clássico (15 dias). O uso de técnicas moleculares, em geral, é mais rápido do que todos os testes comerciais disponíveis para identificação de espécies, tais como o sistema API 20C e os métodos clássicos, os quais requerem sub-culturas das amostras clínicas



para obter culturas puras antes das inoculações. Além disso, mesmo se uma cultura de 24 horas for necessário para realização da PCR, o tempo para identificação da espécie, depois de obter uma colônia pura é bem menor, aproximadamente 7 horas, comparado ao tempo necessário para os métodos convencionais de identificação fenotípica, que são em média 84 horas. Entretanto, os métodos moleculares são mais úteis em laboratórios clínicos de maior complexidade e de alta demanda (DIXON e FROMTLING, 1995).

Na análise da região ITS2, verificou-se proximidade no tamanho das bandas produzidas pelas amostras de *C. tropicalis* (04-Unif/06, 09-Unif/06 e 12-Unif/06) e *C. parapsilosis* (16-Unif/06, 17-Unif/06 e 26-Unif/06) com o da cepa padrão de *C. albicans*. Entretanto, descarta-se a possibilidade destas amostras serem classificadas como *C. albicans*, pois elas não amplificaram com os primers NL4CAL e CAL5 espécie-específico para esta espécie.

Neste trabalho, os dois métodos de identificação contribuíram para a implantação do método molecular no laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos desta instituição (UNIFAL-MG). Este método pode ser realizado por pessoas que não possuam ampla experiência na área de micologia, requisito importante na realização da identificação clássica de leveduras.

## 7.2 SENSIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS

O elevado número de casos de candidose resistente ao tratamento clássico, principalmente em indivíduos imunocomprometidos, tem incentivado o uso de testes de sensibilidade a diferentes agentes antifúngicos. Uma adequada avaliação da atividade *in vitro* destas substâncias frente aos fungos patogênicos deveria permitir prever a resposta clínica a um tratamento com agente antifúngico.

A padronização dos testes de sensibilidade foi proposta pelo CLSI, o qual padronizou o método de macrodiluição e microdiluição em caldo como sendo de grande reprodutibilidade, trazendo maior credibilidade aos resultados obtidos. Este método é extremamente trabalhoso e, por isso, outros métodos alternativos têm sido avaliados. Além dos métodos de microdiluição CLSI e EUCAST, o método Etest foi utilizado neste trabalho por ser considerado de fácil execução, não requerer equipamentos caros e, por já ter demonstrado, anteriormente, boa reprodutibilidade intralaboratorial e interlaboratorial (CUENCA-ESTRELLA et al, 2005; MATAR et al, 2003). Além disso, parece ser melhor do

os métodos de referência na detecção de resistência à anfotericina B (PFALLER, 1990; ARENDRUP et al., 2001; PEYRON et al., 2001).

No presente estudo analisou-se a concordância entre os métodos de microdiluição em caldo, CLSI e EUCAST, com a técnica comercial Etest. Apesar de ser um método seguro, o CLSI M27-A2 ainda tem algumas limitações. Estas incluem fenômeno de crescimento residual (“trailing”) encontrado em testes com agentes antifúngicos azólicos, detecção insegura de resistência à anfotericina B, determinação visual subjetiva do “endpoint” e demora na obtenção das CIMs (PFALLER, 1990).

Nas comparações foram adotados os “breakpoints” únicos para todos os métodos de acordo com as sugestões de valores publicados por Cuenca-Estrella et al. (2005). Os valores obtidos pelo Etest foram menores do que os encontrados pela metodologia CLSI e EUCAST, estando em concordância com estudos prévios (VAN ELDERE et al., 1996; SEWELL et al., 1994). Entretanto, Pfaller et al. (1998) encontraram CIM para Etest e microdiluição dentro do mesmo intervalo. Isto ilustra a necessidade de inclusão de amostras controle e confirmação dos testes de difusão com testes de referência, pois variações interlaboratoriais ocorrem mesmo com aplicação restrita das instruções do fabricante.

Os resultados mostraram alta concordância entre os três métodos empregados frente a anfotericina B e ao fluconazol (TABELAS 3 e 4). Além disso, o coeficiente de correlação de Pearson foi significativo ( $P < 0.05$ ), indicando uma boa reprodutibilidade e correlação entre as CIMs obtidas pelos métodos padrões CLSI e EUCAST e o método comercial Etest.

Nesta avaliação, as CIMs obtidas pelo Etest foram, em alguns casos, mais altas do que as obtidas pelos métodos de microdiluição em caldo. Os valores de CIMs obtidos pelo Etest foram, geralmente, uma diluição maior em 24 h do que em 48 h. Este fenômeno é explicado pelo fato de que, para a maioria das espécies de *Candida*, houve pouca ou nenhuma definição da zona de inibição em 24h. Com 48h a distinção entre ausência e redução de crescimento foi melhor. Além disso, as diferenças podem estar relacionadas ao uso de agar Mueller-Hinton suplementado com glicose para o método Etest (PFALLER et al., 1998). Este meio foi utilizado como recomendado pelo protocolo CLSI M44-A para uso em rotina de testes de sensibilidade a antifúngicos que utilizam disco difusão em agar. Entretanto, este fato não interferiu nos resultados das amostras resistentes a fluconazol, pois resultados similares foram alcançados com Etest e com microdiluição, confirmando que os métodos baseados em agar são seguros na identificação de isolados resistentes a fluconazol (PFALLER et al., 2003). Neste contexto, o presente estudo confirmou que o uso de agar Mueller-Hinton para o método

Etest é útil na determinação de sensibilidade aos antifúngicos anfotericina B e fluconazol de espécies de *Candida*.

A variação das CIMs encontradas frente ao fluconazol para todas as amostras foi 0.12–64.0µg/mL, entretanto, o valor da CIM de 1.0µg/mL ou menor foi encontrado em 93,33% dos casos. Os maiores valores de CIM foram encontradas em *C. tropicalis* (64µg/mL) e *C. glabrata* (48µg/mL). Estes resultados foram similares aos encontrados por Fleck et al. (2007) que compararam as metodologias Etest e CLSI para sensibilidade a fluconazol e encontraram 90,4% de espécies de *Candida* suscetível.

A correlação de Pearson entre Etest e os métodos de microdiluição foi mais alta para as CIMs obtidas frente ao fluconazol do que para anfotericina B (TABELA 2). A concordância na categoria foi alta em todos os métodos para os dois antifúngicos. Entretanto, houve menor concordância do método Etest para fluconazol (CLSI-66,66% e EUCAST-86,66%) do que para anfotericina B (CLSI-93,33% e EUCAST-90,0%). Estas discrepâncias nas CIMs entre os métodos foram provavelmente devido a dificuldade da leitura consistente dos “endpoints” das CIMs para isolados dos quais produzem crescimento residual (“trailing”) na presença de agentes antifúngicos azóis. St-Germain (2001) enfatizou que o crescimento residual ocorre, principalmente, em *C. albicans* e *C. tropicalis*. Posteraro et al. (2000) relataram que o método Etest é falho na determinação de dados conclusivos de sensibilidade a fluconazol para *C. parapsilosis*. Contudo, no presente trabalho, verificou-se que apesar de ter sido observado o fenômeno de “trailing” em alguns isolados, os resultados obtidos pelo Etest foram altamente concordantes com os obtidos pelos métodos de microdiluição em caldo CLSI e EUCAST. Portanto, analisando a correlação de Pearson e as concordâncias entre CLSI, EUCAST e Etest, qualquer uma das três metodologias seria adequada para determinação do perfil de sensibilidade dos isolados.

### 7.3 AVALIAÇÃO DO FENÔMENO DE HETERORESISTÊNCIA

Um assunto bastante discutido desde a década de 80 e de suma relevância é o impacto do uso de fluconazol e sua relação com a emergência de espécies resistentes de *Candida* spp. Os resultados encontrados nesta avaliação demonstram diferenças individuais entre as espécies de *Candida*. Estas diferenças podem ser importantes na escolha da terapia antifúngica. Entretanto, muito mais importante que a variação entre espécies, são os níveis de proteção encontrados em *C. albicans* pela pré-exposição a fluconazol.

As diferenças (0,125 a 64,0µg/mL) na sensibilidade ao fluconazol entre o isolado 12Unif/06 e as demais amostras selvagens podem estar relacionadas à pré-exposição daquela a este antifúngico antes do isolamento. Foi comprovado, anteriormente, que o uso profilático de fluconazol em infecções fúngicas invasivas pode levar ao aumento na colonização por leveduras, pois amostras resistentes a azóis podem ser selecionadas com a pré-exposição ao fluconazol (LAVERDIÈRE et al., 2000; PETRIKKOS e SKIADA, 2007). Segundo estudos de Vazques et al. (1998), de pacientes sob terapia com fluconazol, pode-se isolar amostras menos suscetíveis a este antifúngico.

Os primeiros relatos sobre o fenômeno de heteroresistência em *Candida* ocorreram em 1997 com os estudos de Schoofs et al. (1997). Eles observaram que quando o crescimento era realizado na presença de azóis, as cepas originalmente isoladas de cavidade oral de pacientes com AIDS em meios contendo antifúngicos apresentaram cinética de crescimento mais rápida que aquelas obtidas em meio sem droga. Este fato sugere que o isolamento inicial de colônias em meio contendo droga tenha selecionado sub-populações com maior resistência a azóis, visto que estas colônias exibiram crescimento dentro dos padrões esperados, mesmo na presença deste antifúngico. O mesmo fato não foi observado em colônias isoladas em meio sem droga.

De acordo com relatos da literatura o fenômeno de heteroresistência em *Candida* é freqüente, podendo estar relacionado a dois mecanismos básicos: a) reversível – com aumento da expressão de bombas de efluxo, em que há relação direta entre a exposição à droga e a persistência do fenômeno (BOUCHARA et al, 2000); b) irreversível - heteroresistência relacionada à modificação na composição dos esteróis e alteração nos alvos celulares dos antifúngicos (DEFONTAINE et al, 1999; SANGLARD et al., 2002).

Os resultados deste trabalho mostraram a ocorrência de heteroresistência em duas amostras de *C. tropicalis* (9-SFA e 9-IAF) e uma de *C. glabrata* (18-IFA). Estas cepas foram obtidas por metodologias diferentes a partir das amostras selvagens 09-Unif/06 e 18-Unif/06, respectivamente. As demais amostras apresentaram variações pequenas nos valores de CIMs, permanecendo sensíveis a droga. Estudos mostram que várias espécies de leveduras parecem desenvolver resistência com o uso de drogas com muito mais freqüência do que *C. albicans* (WALSH e PIZZO, 1988 e BODEY, 1992). A análise de isolados clínicos indica que a resistência não é devida a isolados de *C. albicans* resistentes, mas principalmente pelo aumento do número de isolados *Candida* não-*albicans* (MORAN et al., 1997).

Os procedimentos relacionados à seleção de clones resistentes aos antifúngicos são particularmente úteis na avaliação do potencial das cepas de *Candida* em desenvolver um ou mais mecanismos de escape à ação da droga, pois, os níveis destes fármacos presentes no sangue podem suprimir o crescimento de leveduras sensíveis, mas permitem o crescimento de cepas resistentes. Alguns microrganismos podem desenvolver resistência rapidamente ou necessitar de doses mais elevadas da droga e podem ser responsáveis por infecções em certas populações suscetíveis.

Apesar do uso de fluconazol ser um fator importante na seleção de espécies *Candida* não-*albicans* há outros fatores envolvidos neste fenômeno. Na verdade, este aspecto já foi apontado por outros autores que lembram a importância da doença de base associada à imunossupressão e exposição a procedimentos médicos invasivos como fatores relevantes para a ocorrência de infecções por espécies *Candida* não-*albicans*, incluindo *C. glabrata* (KRCMERY e BARNEST, 2002). Tem sido descrito que infecções por esta espécie pode ocorrer em pacientes previamente expostos a anfotericina B (NUCCI e COLOMBO, 2002; SILVA et al., 2002).

Com a metodologia para seleção de cepas heteroresistentes empregada no presente estudo obteve-se apenas uma amostra (3,33%) com fenótipo de resistência estável após repiques sucessivos em meios livres da droga. Essa amostra de *C. tropicalis* (9-SFA) foi à única com resultado de CIM elevada após os testes de seleção. É possível que ela já existisse entre as colônias sensíveis iniciais, provavelmente, tenha havido seleção de uma subpopulação que apresentava algum tipo de mutação irreversível, a qual levou a resistência a fluconazol. Existem diferentes tipos de mecanismos bioquímicos que contribuem para o fenótipo de resistência a drogas em leveduras que poderiam explicar esse resultado. Dentre eles a alteração na composição dos esteróis e mudanças nos alvos celulares dos antifúngicos que foram verificados em fenótipos de resistência que permaneceram estáveis após repiques sucessivos em meios livres da droga (MARICHAL et al, 1999 e SANGLARD, 2002). Do ponto de vista molecular, as alterações bioquímicas podem resultar de amplificação, transferência e deleção gênica, mutações pontuais, ativação transcricional e hipo-metilação ou hiper-metilação. Todos esses efeitos podem ser em genes envolvidos na regulação ou processamento da via bioquímica (DEFONTAINE et al., 1999).

Nenhuma espécie analisada neste trabalho apresentou elevação nos valores de CIM para anfotericina B, mesmo após cultivo em meios contendo concentrações crescentes de anfotericina B (0,5 a 3,0µg/mL). Células que têm adaptações a este antifúngico, entretanto,

não são classificadas como resistentes pelos métodos padrões *in vitro* depois de sub-cultivos em meios sem a droga. Estes resultados são concordantes com o estudo de Vazques et al. (1998), o qual mostra que *C. albicans*, a espécie mais sensível à anfotericina B, é capaz de crescer em altas concentrações deste polieno após pré-exposição a antifúngicos azólicos. Eles sugerem que o tratamento seqüencial com fluconazol e em seguida anfotericina B pode representar um risco de falha terapêutica, pois espécies de *Candida* foram capazes de crescer, *in vitro*, na presença de anfotericina B após pré-exposição a fluconazol. Além disso, mesmo em terapias simultâneas pode-se observar os efeitos *in vitro*, pois, no paciente, existem as diferenças farmacocinéticas das duas drogas. Em contrapartida, dados obtidos por Pfaller et al. (2002) com cepas de *C. glabrata*, espécie com resistência adquirida ao fluconazol, mostrou que este patógeno apresenta, com maior frequência, elevadas CIMs para anfotericina B.

A amostra 9-IAF (*C. tropicalis*) heteroresistente a fluconazol, obtida a partir da indução experimental com anfotericina B e fluconazol, apresentou altos valores de CIM (CIM=64µg/mL) nos três métodos de determinação de sensibilidade a antifúngicos empregados, entretanto, após repiques sucessivos em meios livres da droga apresentou reversão do fenótipo resistente. Barchiesi et al. (2000), trabalhando também com *C. tropicalis*, utilizaram uma metodologia semelhante a deste estudo para obtenção de cepas heteroresistentes a fluconazol, itraconazol e anfotericina B. Eles verificaram que, assim como a amostra 9-IAF, todas as cepas heteroresistentes induzidas apresentaram reversão do fenótipo. Vários estudos mostram que a instabilidade destes fenótipos está relacionada com a expressão das bombas de efluxo (MARICHAL et al, 1999; Cowen et al., 2000; Karl et al., 2000; SANGLARD, 2002). Estes mecanismos poderiam explicar a instabilidade do fenótipo de resistência adquirido tanto na amostra 09-IAF quanto na amostra 18-IFA. Todavia, Goldman et al. (2004) mostraram, que não há nenhuma relação linear entre os valores de CIM e o aumento da expressão dos genes transportadores que codificam bombas de efluxo. Estudos moleculares de expressão gênica nos isolados mutantes e seus respectivos isolados selvagens são necessários para elucidar esta questão.

No presente estudo, apesar de alguns clones dos isolados iniciais terem crescido no meio com os antifúngicos na fase de triagem, seus valores de CIM foram relativamente baixos, mantendo-os com seus fenótipos de sensibilidade a droga. Xu et al. (2001), trabalhando com *Cryptococcus neoformans*, também encontraram 2 isolados, após a fase de seleção, para os quais os valores de CIM de fluconazol foram baixos (0,5 e 1,0 µg/mL). Estes

achados poderiam ser explicados pela capacidade de algumas cepas em produzir adaptações fisiológicas temporárias ou tolerância transiente ao fluconazol.

O fato das cepas mutantes e suas respectivas cepas selvagens terem apresentado o mesmo perfil de bandas na PCR da região ITS2 indica que, não houve contaminação.

Turenne et al. (1999) mostraram que *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, além de outras espécies de fungos, apresentam, de modo individual, tamanhos de fragmentos da região ITS2 distintos. Outros autores verificaram que a região ITS1 também expressa variabilidade interespecies com base no tamanho de seus fragmentos (LOTT et al., 1993 e WILLIAMS et al., 1995).

O uso difundido e inadequado das drogas antifúngicas pode explicar o “déficit” no resultado dos tratamentos contra candidemias. Um dos principais fatores para o fracasso destas terapias pode ser o aumento da resistência de *Candida* spp aos antifúngicos. A resistência ocorre por um processo de indução ou seleção natural. As infecções por *Candida*, mais susceptíveis as drogas, estão gradativamente sendo substituídas por infecções causadas por espécies mais resistentes. Dentre as mais susceptíveis está *C. albicans* e entre as menos susceptíveis, está *C. glabrata* e *C. krusei*. Os fracassos nos tratamentos estão levando os cientistas a pesquisarem drogas com outros alvos de ação.

A identificação das espécies de *Candida*, causadoras de patogenia, deveria ser um pré-requisito para a determinação da CIM e da concentração fungicida mínima (CFM). Assim, a escolha da droga a ser utilizada no tratamento seria mais adequada e eficaz, já que existem espécies de *Candida* que possuem resistência intrínseca a alguns antifúngicos, como por exemplo, a resistência ao fluconazol de *C. krusei*.

Os resultados deste estudo mostram que cepas heteroresistentes podem ser obtidas por exposição prévia ou não ao fluconazol. Mondon et al. (1999) investigaram a ocorrência de resistência a fluconazol e voriconazol em pacientes com e sem pré-exposição às drogas e sugeriram que este parece ser um fenômeno inato. Em um estudo com amostras de *C. albicans* isoladas de pacientes pré-expostos a fluconazol, Goldman et al. (2004) verificaram que os mecanismos de resistência, incluindo mutações pontuais no gene ERG11 e superexpressão deste gene e de vários outros que codificam bombas de efluxo, podem ser encontrados mesmo em isolados sensíveis e, portanto, o fenótipo de resistência não está relacionado a estes mecanismos isolados.

A resistência ao fluconazol documentada no presente estudo sugere que a exposição a este antifúngico leva à ocorrência de colonização ou infecção por populações resistentes, selecionadas ou induzidas ao longo do tratamento.

Os mecanismos envolvidos na resistência ao fluconazol nas amostras 9-SFA e 9-IAF deverão ser elucidados futuramente por análises moleculares e comparados, pois, estas amostras foram obtidas a partir de um mesmo isolado selvagem sensível a droga. Estes estudos poderão contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na resistência de espécies de *Candida* ao fluconazol.



## 8 CONCLUSÕES

- As metodologias de identificação de leveduras, clássica e molecular, apresentaram correlação perfeita na caracterização de 22 *Candida albicans*, 3 *Candida tropicalis*, 3 *Candida parapsilosis* e 2 *Candida glabrata*.
- Os isolados apresentaram perfis de sensibilidades semelhantes nos três métodos empregados (Etest, EUCAST e CLSI).
- As correlações dos métodos Etest/EUCAST e Etest/CLSI foram maiores para fluconazol do que para anfotericina B;
- A maioria das amostras (96,67%) apresentou concordância segundo categoria de sensibilidade S, SDD e R para as três metodologias (Etest, EUCAST e CLSI);
- Nenhuma amostra heteroresistente à anfotericina B foi obtida pelas metodologias de seleção e indução empregadas neste estudo;
- O isolado 09Unif/06 (*C. tropicalis*) originou uma cepa heteroresistente ao fluconazol por indução (9-IAF), com fenótipo instável, e outra por seleção (9-SFA), com fenótipo estável.
- Cepas heteroresistentes ao fluconazol podem ser obtidas com ou sem exposição prévia a este antifúngico.
- A identidade molecular das cepas mutantes e suas respectivas cepas selvagens foi confirmada.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARENDRUP, M., B. et al. Comparison of Etest and a tablet diffusion test with the NCCLS broth microdilution method for fluconazole and amphotericin B susceptibility testing of *Candida* isolates. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 47, p.521-526, 2001.
- BAKER, K. S. et al. Genome-wide expression profiling reveals genes associated with amphotericin B and fluconazole resistance in experimentally induced antifungal resistant isolates of *Candida albicans*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 54, p. 376-385, 2004.
- BARODKA, V. M.; et al. Antimicrobial effects of liquid anesthetic isoflurane on *Candida albicans*. **J Transl Med.** v. 4, p. 46, 2006.
- BAUER, A. W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 45, p. 453-456, 1966.
- BARCHIESI, F. et al. Experimental Induction of fluconazole resistance in *Candida tropicalis* ATCC 750. **Antimicrobiol Agents Chemother.**, v. 44, n. 8, p. 1578-1584, 2000.
- BODEY, G. P. Azole antifungal agents. **Clin. Infect. Dis.**, v. 14, p. 5161-5169, 1992.
- BOLANO, A. et al. Rapid methods to extract DNA and RNA from *Cryptococcus neoformans*. **FEMS Yeast Research**, v. 1, p. 221-224, 2001.
- BOUCHARA, J.,P. et al. In-vivo selection of an azole-resistant petite mutant of *Candida glabrata*. **J. Med. Microbiol.**, v. 49, p. 977-984, 2000.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças infecciosas e parasitárias**: guia de bolso. 4. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2004. p. 72-73.
- BRAWNER, D. I.; CUTLER, J. E. Oral *Candida albicans* isolates from non-hospitalized normal carriers, immunocompetent hospitalized patients and immunocompromised patients with or without acquired immunodeficiency syndrome. **Journal of Clinical Microbiology.**, v. 27, p. 1335-1341, 1989.
- CASALI, A. K. et al. *Cryptococcus neoformans*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento.** n. 20, p. 34-37, 2003a.
- CASALI, A. K. et al. Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. **FEMS Yeast Research**, v. 3, n. 4, p. 405-15, Jun. 2003b.
- CHEN, Y. C. et al. Identification of medically important yeasts using PCR-based detection of DNA sequence polymorphisms in the internal transcribed spacer 2 region of the rRNA genes. **J Clin Microbiol**, v. 38, n. 6, p. 2302-2310, Jun. 2000.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Wayne, PA, USA.: Approved Standard-Second Edition. Document M 27-A2, v. 22. n. 15, 2002.

COWEN, L. E. et al. Evolution of drug resistance en experimental populations of *Candida albicans*. **Jornal of Bacteriology**, p. 1515-1522, Mar. 2000.

CUENCA-ESTRELLA, M. A. et al. Correlation between the procedure for antifungal susceptibility testing for *Candida* spp. of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing (EUCAST) and four commercial techniques. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 11, n. 6, p. 486–492, 2005.

DEFONTAINE A. et al. In-vitro resistance to azoles associated with mitochondrial DNA deficiency in *Candida glabrata*. **J Med Microbiol**. v. 48, n. 7, 663-70, Jul. 1999.

DIXON, D. M.; FROMTLING, R. A. Morphology, taxonomy, and classification of the fungi, In: MURRAY P. R. et al. (Ed.). **Manual of clinical microbiology**, 6. ed. Washington: ASM Press, 1995, p. 699-708.

ELLIS, D. Amphotericin B: spectrum and resistance. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 49, p. 7-10, Feb. 2002. Suppl. 1.

ESPINEL-INGROF, A. et al. Collaborative comparison of both macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests. **J. Clin. Microbiol.**, v. 30, p. 3138-3145, 1992.

EUCAST-SUBCOMMITTEE OF ANTIFUNGAL SUSCEPTIBILITY TESTING OF THE EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY TESTING. METHOD FOR DETERMINATION OF MINIMAL INHIBITORY CONCENTRATION (MIC) BY BROTH DILUTION OF FERMENTATIVE YEASTS. Taufkirchen, Germany: ECSMID, 2002. Discussion document E.Dis.7.1.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas**. 3.ed. Brasília: EMBRAPA, 1998. p. 220.

FLECK, R.; DIETZ, A.; HOF, H. *In vitro* susceptibility of *Candida* species to five antifungal agents in a German university hospital assessed by the reference broth microdilution method and Etest. **The journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Fev, 2007.

GHANNOUM, M. A.; ABU-ELTEEN, K, H. Pathogenicity determinants of *Candida*. **Mycoses**, v. 33, p. 265-82, 1990.

GOLDMAN, G. H. et al. Evaluation of fluconazole resistance mechanisms in *Candida albicans* clinical isolates from HIV-infected patients in Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 50, p. 25–32, 2004

HAZEN, K. C. New and emerging yeast pathogens. **Clinical Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 462-478, 1995.

JENSEN-PERGAKES, K. L. et al. Sequencing, disruption and characterization of the *Candida albicans* sterol methyltransferase (ERG6) gene: drug susceptibility studies in ERG6 mutants. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 5, p. 1160-1167, 1998.

KARL, W. H.; JOSEPH, T. N.; THOMAS, D. E. Upregulation of ERG genes in *Candida* species by azoles and other sterol biosynthesis inhibitors. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 10, p. 2693-2700, 2000.

KAUFMAN, D. A. Fungal infections in neonates: update on prevention and treatment. **Minerva Ginecol.** v. 59, n. 3 p. 311-329, 2007.

KELLY, S. L. et al. Resistance to fluconazole and cross-resistance to amphotericin B in *Candida albicans* from AIDS patients caused by defective sterol delta 5,6-desaturation. **FEBS Lett.**, v. 400, n. 1, p. 80-82, 1997.

KARLOWSKY, J. A. et al. In vitro interactions of anidulafungin with azole antifungals, amphotericin B and 5-fluorocytosine against *Candida* species. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 27, n. 2, p. 174-177, 2006.

KRCMERY, V.; BARNETT, A. J.; Non-*albicans Candida* spp. Causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. **Journal of Hospital Infection**, v. 50, p. 243-260, 2002.

KREGER-VAN RIJ, N.J.W. General classification of the yeasts. In: KREGER-VAN RIJ, N.J.W. **The yeasts: a taxonomy study**. Amsterdam: Elsevier Science, 1984. p. 1-44.

KURTZMAN, C. P. Identifications and taxonomy. In: KIRSOP, B.E.; KURTZMAN, C. P. (Ed.). **Living resources for biotechnology: yeasts**. New York: Cambridge, 1988. p.99-140.

LACAZ, C. S., PORTO, M. J. E. C. In: **Micologia médica**. 8. ed. São Paulo: Sarvier, 1991. 695 p.

LAVERDIÈRE, M. et al. Impact of fluconazole prophylaxis on fungal colonization and infection rates in neutropenic patients **J Antim Chemoth.**, v. 46, p. 1001-1008, 2000.

LEWIS, R. E.; KONTOYIANNIS D. P. Rationale for combination antifungal therapy. **Pharmacotherapy**, v. 21, p. 149-164, 2001.

LOTT, T. J.; KUYKENDALL, R. J.; REISS, E. Nucleotide sequence analysis of the 5.8S rDNA and adjacent ITS2 region of *Candida albicans* and related species. **Yeast**, v. 9, p. 1199-1206, 1993.

LOZANO-CHIU M. et al. Detection of resistance to amphotericin B among *Cryptococcus neoformans* clinical isolates: performances of three different media assessed by using E-test and National Committee for Clinical Laboratory Standards M27-A methodologies. **J Clin Microbiol**, v. 36, n. 10, p. 2817-2822, Oct. 1998.

LUPETTI, A. et al. Molecular basis of resistance to azole antifungals. **Trends in Molecular Medicine**, v. 2, p. 550–63, 2002.

MANNARELLI, B. M.; KURTZMAN, C. P. Rapid identification of *Candida albicans* and other human pathogenic yeasts by using short oligonucleotides in a PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 1634-1641, 1998.

MARICHAL, P. et al. Contribution of mutations in the cytochrome P450 14  $\alpha$ -demethylase (ERG11p, Cyp51p) to azole resistance in *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 145, p. 2701-2713, 1999.

MARR, K. A.; LYONS, C. N.; HA, K.; RUSTAD, T. R.; WHITE, T. C. Inducible azole resistance associated with a heterogeneous phenotype in *Candida albicans*. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 45 p. 52-59, 2001.

MATAR, M. et al. Correlation between E-test, disk diffusion, and microdilution methods for antifungal susceptibility testing of fluconazole and voriconazole. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 47, p. 1647-1651, 2003.

MESSER, S. A. et al. Activities of micafungin against 315 invasive clinical isolates of fluconazole-resistant *Candida* spp. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 44, n. 2, p. 326-326, 2006.

MEYER, R. D. Treatment of fungal infections in patients with HIV-infection or AIDS. **Zentralbl Bakteriologie**, v. 281, n. 1, p. 1-7, 1994.

MONDON, P. et al. Heteroresistance to fluconazole and voriconazole in *Cryptococcus neoformans*. **J Clin Microbiol.**, v. 43, n. 8, p. 1856-1861, 1999.

MORAN, G. P. D. J. et al. Antifungal drug susceptibilities of oral *Candida dubliniensis* isolates from human immunodeficiency virus (HIV)-infected and nonHIV-infected subjects and generation of stable fluconazole-resistant derivatives in vitro. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 41, p. 617-623, 1997.

MUKHOPADHYAY, K., T. et al. Membrane sphingolipid-ergosterol interactions are important determinants of multidrug resistance in *Candida albicans*. **Antimicrob. Agents Chemother.** V. 48, p. 1778-1787, 2004.

NEVES, R. A. et al. Endoftalmite micótica endógena: aspectos clínicos e histopatológicos de 3 casos. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 53, p. 20-21, 1990.

NUCCI, M.; COLOMBO, A. L. Emergence of resistant *Candida* in neutropenic patients. **Braz J Infect Dis.**, Salvador, v. 6, n.3, jun. 2002.

OLSON, J. A. et al. Treatment of *Candida glabrata* infection in immunosuppressed mice by using a combination of liposomal amphotericin B with caspofungin or micafungin.

**Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 12, p. 4895-4902, Dez. 2005.

PASRIJA, R., S. et al.. Squalene epoxidase encoded by *ERG1* affects morphogenesis and drug susceptibilities of *Candida albicans*. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 55, p. 905-913, 2005.

PETRIKKOS, G.; SKIADA, A. Recent advances in antifungal chemotherapy. **Int J Antimicrob Agents**. v. 30, n. 2, p. 108-117, 2007.

PEYRON, F. A. et al. Improved detection of amphotericin B-resistant isolates of *Candida lusitanae* by Etest. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 339-342, 2001.

PFALLER, M. A. et al. Collaborative investigation of variables in susceptibility testing of yeasts. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 34, p. 1648-1654, 1990.

PFALLER, M. A. et al. Evaluation of the Etest Method for Determining Fluconazole Susceptibilities of 402 Clinical Yeast Isolates by Using Three Different Agar Media. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 9, p. 2586-2589, 1998.

PFALLER, M. A. et al. In vitro activities of ravuconazole and voriconazole compared with those of four approved systemic antifungal agents against 6970 clinical isolates of *Candida spp.* **Antimicrobiol Agents Chem.**, v. 46, n. 6, p. 1723-1727, 2002.

PFALLER, M. A. et al. Evaluation of the Etest and disk diffusion methods for determining susceptibilities of 235 bloodstream isolates of *Candida glabrata* to fluconazole and voriconazole. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 1875-1880, 2003.

PINJON, E., D. et al. Simple, inexpensive, reliable method for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 2093-2095, 1998.

PINJON, E. et al. Molecular mechanisms of itraconazole resistance in *Candida dubliniensis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 8, p. 2424-2437, 2003.

POSTERARO, B. et al. Commercial system for fluconazole susceptibility testing of yeasts: comparison with the broth microdilution method. **Diagn. Microbiol. infect. Dis.**, v. 38, p. 29-36, 2000.

PRASAD, T., P. et al.. Functional analysis of *CaIPT1*, a sphingolipid biosynthetic gene involved in multidrug resistance and morphogenesis of *Candida albicans*. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 49 p. 3442-3452, 2005.

REVANCAR, S. G. et al. Cloning and characterization of the lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase (*ERG11*) gene in *Cryptococcus neoformans*. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 324, n. 2, p. 719-728, Nov. 2004.

REX, J. H.; RINALDI, M. G.; PFALLER, M. A. Resistance of *Candida* species to fluconazole. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 39, p.1-8, 1995.

RICHARD, A. et al. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 7, p. 327-335, 2001.

RODERO, L. et al. G484S amino acid substitution in 14- $\alpha$  lanosterol demethylase (ERG11) is related to fluconazol resistance in a recurrent *Cryptococcus neoformans* clinical isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 11 p. 3653-3656, 2003.

SANGLARD, D. Clinical relevance of mechanisms of antifungal drug resistance in yeasts. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología clínica**, v. 20, n. 9, p. 462-470, 2002.

SANGLARD D. et al.. *Candida albicans* mutations in the ergosterol biosynthetic pathway and resistance to several antifungal agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 8, p. 2404-2412, 2003.

SCHMIDT, H. J. Moderne Mikrobiologie in Erfrischungsgetränkebetrieben und Brauereien. **Brauwelt**, v. 4, p. 116-119, 1994.

SCHOOFS, A. et al. Isolation of *Candida* species on media with and without added fluconazole reveals high variability in relative growth susceptibility phenotypes. **Antim. Agents Chemoth.**, v. 41, p. 1625-1635, 1997.

SEWELL, D. L.; PFALLER, M. A.; BARRY, A. L. Comparison of broth macrodilution, broth microdilution, and Etest antifungal susceptibility tests for fluconazole. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, p. 2099-102, 1994.

SHADOMY, S.; PFALLER, M. A. Laboratory studies with antifungal agents: susceptibility tests quantitation in body fluids and bioassays. **Manual of clinical microbiology**. 5. ed. Washington: American Society for Microbiology, 1991. p. 1173-1183.

SILVA, V. M.; CRISTINA DÍAZ, J.; NALDY FEBRÉ, Y. Red De diagnóstico en micología médica. Vigilancia de la resistencia de levaduras a antifúngicos. **Rev. Chil. Infectol.**, Santiago, v. 19, 2002. Supl. 2.

SIMS, C. R., et al. Correlation between microdilution, E-test, and disk diffusion methods for antifungal susceptibility testing of posaconazole against *Candida* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 2105-2108, Jun. 2006.

ST-GERMAIN, G. Impact of endpoint definition on the outcome of antifungal susceptibility tests with *Candida* species: 24-versus 48-h incubation and 50 versus 80% reduction in growth. **Mycoses**, v. 44, p. 37-45, 2001.

SULLIVAN, D. J. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. **Microbiology**, v. 141, p. 1507-1521. 1995.

SULLIVAN, D. J; COLEMAN, D. *Candida dubliniensis*: characteristics and identification. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 329-334, 1998.

- SULLIVAN, D. J. et al. Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms, and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. **FEMS Yeast Res.**, v. 4, p. 369-76, Jan. 2004.
- TURENNE, C. Y. et al. Rapid identification of fungi by using the ITS2 genetic region and an automated fluorescent capillary electrophoresis system. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 1846-1851, 1999.
- VAN ELDERE, J. et al. Fluconazole and amphotericin B antifungal susceptibility testing by National Committee for Clinical Laboratory Standards broth macrodilution method compared with E-test and semiautomated broth microdilution test. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p. 842-847, 1996.
- VAZQUES, J. A. et al. Stable phenotypic resistance of *Candida* species to amphotericin B conferred by preexposure to subinhibitory levels of azoles. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 9, p. 2690-2695, 1998.
- VIUDES, A. et al. The activity of systemic antimycotic drug combinations. Review. **Rev. Esp. Quimioter.**, v. 14, n. 1, p. 30-39, 2001.
- VRIONI, G. et al. Molecular typing of *Candida* isolates from patients hospitalized in an intensive care unit. **Journal of Infection**, v. 42, n. 1, p. 50-56, Jan. 2001.
- WALT, J. P. V. D.; YARROW, D. Methods for isolation maintenance classification and identification of yeasts. In: KREGGER-VAN RIJ, N. J.W. (Ed.) **The yeasts: a taxonomy study**. Amsterdam: Elsevier Science, 1984. p. 45-104.
- WALSH, T. J.; A. PIZZO. Treatment of systemic fungal infections: recent progress and current problems. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 7, p. 460-475, 1988.
- WHITE, T. C.; BOWDEN, R. A.; MARR, K. A. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, p. 382-402, 1998.
- WILLIAMS, D. W. et al. Identification of *Candida* species by PCR and restriction fragment length polymorphism analysis of intergenic spacer regions of ribosomal DNA. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, p. 2476-2479, 1995.
- WISPLINGHOFF, H. et al. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Clin Infect Dis.** v. 39 p.309-317, 2004.
- XU, J. et al. Dynamic and heterogeneous mutations to fluconazole resistance in *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 2, p. 420-427, Feb. 2001.
- YAMAZUMI, T. et al. Characterization of heteroresistance to fluconazole among clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. **Journal Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 267-272, 2003.



YANG, Y. L. et al. Distribution and susceptibility to amphotericin B and fluconazole of *Candida spp.* isolated from Taiwan. **Epidemiology and infection**, v. 133, n. 2, p. 325-330, 2005.

YOUNG L, Y. et al. Disruption of ergosterol biosynthesis confers resistance to amphotericin B in *Candida lusitaniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 9, p. 2717-2724, 2003.

ZAITZ, C. et al. **Compêndio de micologia médica**: cryptococose e outras leveduras. Rio de Janeiro: Médica e Científica, 1998. p. 297-303.

ZER, Y.; BALCI, I.; MECIC, G. Identification and antifungal susceptibility of *Candida* isolated from intensive care unit patients. **New Microbiol.** v. 25, n. 4, p. 489-494, Oct. 2002.

## ANEXO A – Meios de cultura

Microcultivo em Lâmina - Meio de cultura (Agar fubá acrescido de tween 80) (LACAS; PORTO; MARTIN, 1984)

|                               |        |
|-------------------------------|--------|
| Agar <i>Corn meal</i> (Difco) | 17,0g  |
| Tween 80 (BBL)                | 2,8g   |
| Água destilada                | 1000ml |

Meio básico para teste de fermentação de carboidratos

|                             |        |
|-----------------------------|--------|
| Extrato de levedura (Difco) | 5,0g   |
| Peptona (Difco)             | 7,5g   |
| Água destilada              | 1000ml |

Meio para a prova de assimilação de carbono e de nitrogênio (Meio C)

|  |        |
|--|--------|
| Sulfato de amônio (Merck)                      | 5,0g   |
| Fosfato de potássio monobásico (Merck)         | 1,0g   |
| Sulfato de Magnésio 7 H <sub>2</sub> O (Merck) | 0,5g   |
| Agar (Difco)                                   | 20,0g  |
| Água destilada                                 | 1000ml |

Meio para a prova de assimilação de Nitrogênio (Meio N)

|  |        |
|--|--------|
| Dextrose (Synth)                               | 20,0g  |
| Fosfato de potássio monobásico (Merck)         | 1,0g   |
| Sulfato de Magnésio 7 H <sub>2</sub> O (Merck) | 0,5g   |
| Agar (Difco)                                   | 20,0g  |
| Água destilada                                 | 1000ml |

## ANEXO B – Meios utilizados nos testes de sensibilidade aos antifúngicos

### RPMI 1640 tamponado com 0,165 mol/L de MOPS

|   |        |
|---|--------|
| RPMI 1640 com L-glutamina e sem bicarbonato | 10,4g  |
| Tampão MOPS                                 | 34,53g |

- Dissolver o meio em 900 mL de água destilada esterelizada
- Adicionar o MOPS para uma concentração final do mesmo de 0,165 mol/mL
- Agitar e dissolver completamente
- Ajustar o pH a 7,0 com NaOH 1 mol/L a temperatura ambiente (25° C)
- Adicionar água o suficiente para completar o volume de 1 litro
- Esterilizar por filtração

### Agar Mueller-Hinton suplementado com 2% de glicose e azul de metileno 0,5µg/mL

|                     |        |
|---------------------|--------|
| Agar Mueller-Hinton |        |
| Glicose             | 2g     |
| Azul de metileno    | 0,5µg  |
| Água                | 1000mL |

- Dissolver o Agar Mueller-Hinton e a glicose, adicionar o azul de metileno e completar o volume
- ajustar o pH a 7,0 com NaOH 1mol/L a temperatura ambiente (25° C)
- Distribuir 33 mL em frascos de vidro. Vedar e autoclavar
- Distribuir em placas de Petri descartável (90mm de diâmetro)
- A altura do meio deve ser de 4mm.

## ANEXO C – Definições

### Sensibilidade:

- Um microrganismo é tido como sensível de acordo com um nível de atividade antifúngica associada a uma elevada probabilidade de sucesso terapêutico.
- Um microrganismo é classificado como sensível de acordo com os valores de corte estabelecidos para cada antifúngico em testes fenotípicos padronizados.
- Os valores do ponto de corte podem sofrer alterações conforme as circunstâncias.

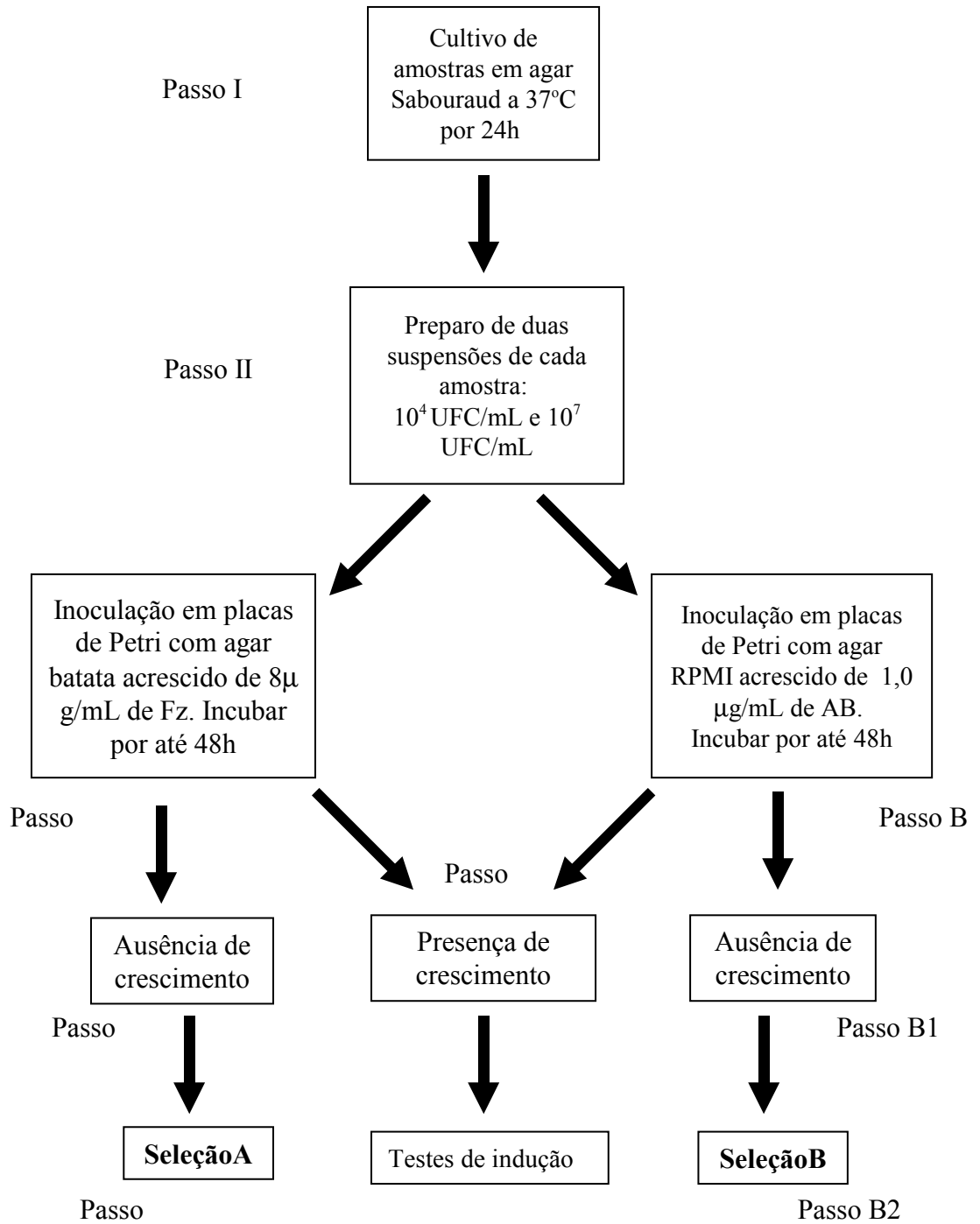
### Sensibilidade dependente da dose:

- Nova categoria de classificação recentemente descrita pelo subcomitê em testes de sensibilidade a agentes antifúngicos do CLSI.
- O microrganismo é definido como sensível apenas se o antifúngico atingir, no sangue, as máximas concentrações possíveis.

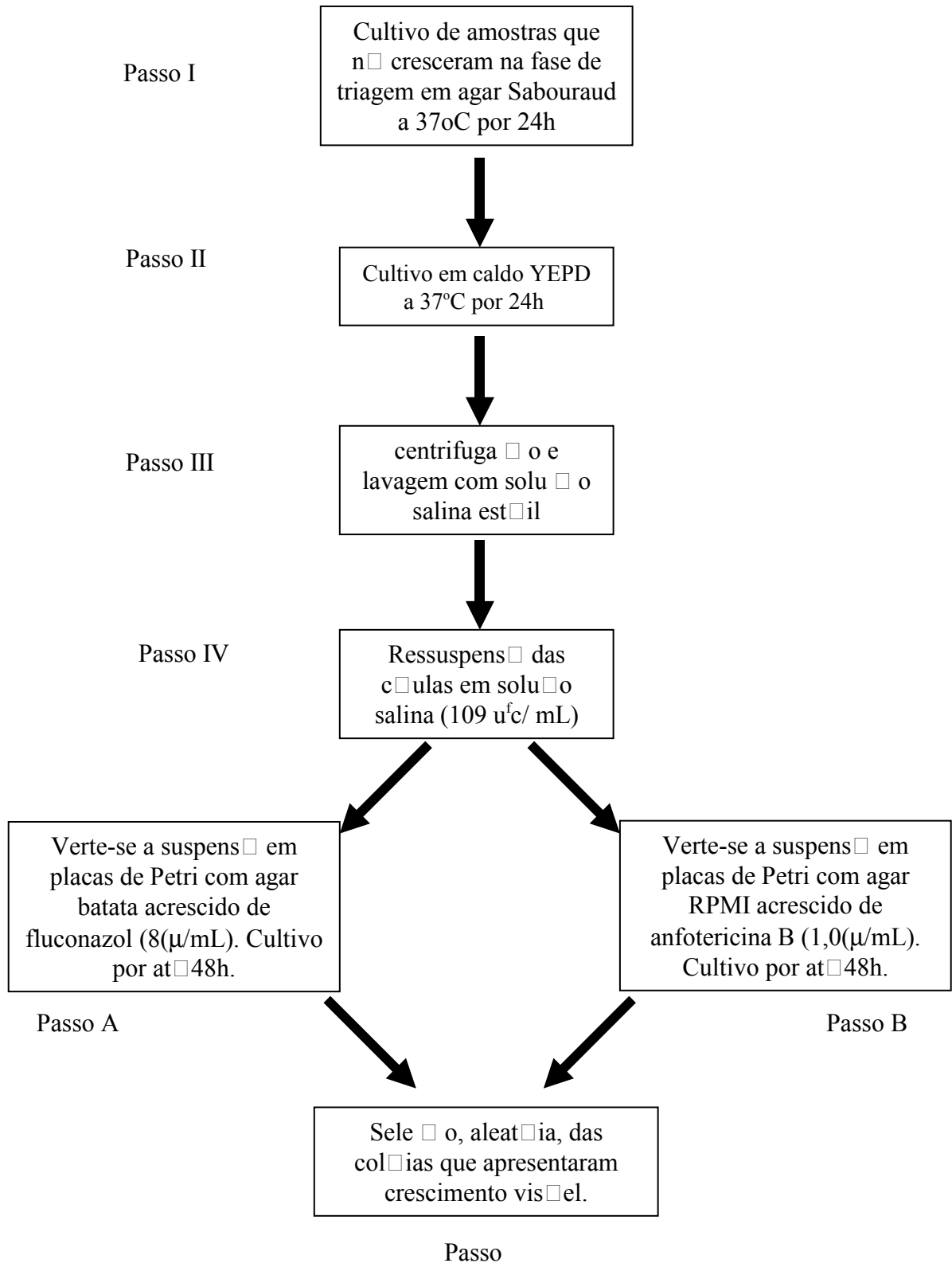
### Resistência:

- Um microrganismo é tido como resistente de acordo com um nível de atividade antifúngica associada a uma elevada probabilidade de falência terapêutica.

ANEXO D - Fluxograma representativo da fase de triagem para seleção de amostras com resistência cruzada a fluconazol e a anfotericina B. Seleção A: para os testes de seleção iniciando com fluconazol (passo I, II, A, A1); Seleção B: para os testes de seleção iniciando com anfotericina B (passo I, II, A, A1). Passo C: amostras utilizadas nos testes de indução.



ANEXO E - Fluxograma representativo da fase de seleção de amostras com resistência cruzada a fluconazol e anfotericina B. Para seleção iniciando com fluconazol segue-se os passos I, II, III, IV, A, C, I, II, III, IV, B e C. Para seleção iniciando com anfotericina B segue-se os passos I, II, III, IV, B, C, I, II, III, IV, A e C.



ANEXO F - Identificação das 30 amostras pelos métodos clássico e molecular.

| NºUnifal-MG* | Nº IAL**   | Método clássico        | Método molecular    |                        |
|--------------|------------|------------------------|---------------------|------------------------|
|              |            |                        | 26S rDNA            | ITS2                   |
| 01-Unif/06   | 417-SP3/06 | <i>C. albicans</i>     | <i>C. albicans</i>  | -                      |
| 02-Unif/06   | 418-SP3/06 | <i>C. albicans</i>     | <i>C. albicans</i>  | -                      |
| 03-Unif/06   | 419-SP3/06 | <i>C. albicans</i>     | <i>C. albicans</i>  | -                      |
| 04-Unif/06   | 420-SP3/06 | <i>C. tropicalis</i>   | <i>Não albicans</i> | <i>C. tropicalis</i>   |
| 05-Unif/06   | 421-SP3/06 | <i>C. albicans</i>     | <i>C. albicans</i>  | -                      |
| 06-Unif/06   | 422-SP3/06 | <i>C. albicans</i>     | <i>C. albicans</i>  | -                      |
| 07-Unif/06   | 423-SP3/06 | <i>C. albicans</i>     | <i>C. albicans</i>  | -                      |
| 08-Unif/06   | 424-SP3/06 | <i>C. albicans</i>     | <i>C. albicans</i>  | -                      |
| 09-Unif/06   | 425-SP3/06 | <i>C. tropicalis</i>   | <i>Não albicans</i> | <i>C. tropicalis</i>   |
| 10-Unif/06   | 426-SP3/06 | <i>C. albicans</i>     | <i>C. albicans</i>  | -                      |
| 11-Unif/06   | 427-SP3/06 | <i>C. albicans</i>     | <i>C. albicans</i>  | -                      |
| 12 -Unif/06  | 428-SP3/06 | <i>C. tropicalis</i>   | <i>Não albicans</i> | <i>C. tropicalis</i>   |
| 13-Unif/06   | 429-SP3/06 | <i>C. albicans</i>     | <i>C. albicans</i>  | -                      |
| 14-Unif/06   | 430-SP3/06 | <i>C. albicans</i>     | <i>C. albicans</i>  | -                      |
| 15-Unif/06   | 431-SP3/06 | <i>C. albicans</i>     | <i>C. albicans</i>  | -                      |
| 16-Unif/06   | 432-SP3/06 | <i>C. parapsilosis</i> | <i>Não albicans</i> | <i>C. parapsilosis</i> |
| 17-Unif/06   | 433-SP3/06 | <i>C. parapsilosis</i> | <i>Não albicans</i> | <i>C. parapsilosis</i> |
| 18-Unif/06   | 434-SP3/06 | <i>C. glabrata</i>     | <i>Não albicans</i> | <i>C. glabrata</i>     |
| 19-Unif/06   | 435-SP3/06 | <i>C. albicans</i>     | <i>C. albicans</i>  | -                      |
| 20-Unif/06   | 436-SP3/06 | <i>C. albicans</i>     | <i>C. albicans</i>  | -                      |
| 21-Unif/06   | 437-SP3/06 | <i>C. albicans</i>     | <i>C. albicans</i>  | -                      |
| 22-Unif/06   | 438-SP3/06 | <i>C. albicans</i>     | <i>C. albicans</i>  | -                      |
| 23-Unif/06   | 439-SP3/06 | <i>C. albicans</i>     | <i>C. albicans</i>  | -                      |
| 24-Unif/06   | 440-SP3/06 | <i>C. albicans</i>     | <i>C. albicans</i>  | -                      |
| 25-Unif/06   | 441-SP3/06 | <i>C. glabrata</i>     | <i>Não albicans</i> | <i>C. glabrata</i>     |
| 26-Unif/06   | 442-SP3/06 | <i>C. parapsilosis</i> | <i>Não albicans</i> | <i>C. parapsilosis</i> |
| 27-Unif/06   | 443-SP3/06 | <i>C. albicans</i>     | <i>C. albicans</i>  | -                      |
| 28-Unif/06   | 444-SP3/06 | <i>C. albicans</i>     | <i>C. albicans</i>  | -                      |
| 29-Unif/06   | 445-SP3/06 | <i>C. albicans</i>     | <i>C. albicans</i>  | -                      |
| 30-Unif/06   | 446-SP3/06 | <i>C. albicans</i>     | <i>C. albicans</i>  | -                      |

\*Nº Unifal-MG – Número na micoteca da Universidade Federal de Alfenas

\*\*Nº IAL – Número na micoteca do Instituto Adolfo Lutz

ANEXO G – Valores de CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) de fluconazol e anfotericina B para 30 isolados selvagens de *Candida* spp.

| Amostra <sup>1</sup> | Fluconazol ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sup>2</sup> |      |        | Anfotericina B ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sup>2</sup> |       |        |
|----------------------|--|------|--------|--|-------|--------|
|                      | Etest  | CLSI | EUCAST | E-test   | CLSI  | EUCAST |
| 01-Unif/06           | 0,75   | 0,12 | 0,12   | 0,094  | 0,015 | 0,060  |
| 02-Unif/06           | 0,50   | 0,12 | 0,12   | 0,047  | 0,015 | 0,060  |
| 03-Unif/06           | 0,38   | 0,12 | 0,12   | 0,023  | 0,015 | 0,060  |
| 04-Unif/06           | 0,50   | 0,12 | 0,12   | 0,125  | 0,015 | 0,060  |
| 05-Unif/06           | 1,00   | 0,50 | 0,50   | 0,064  | 0,060 | 0,120  |
| 06-Unif/06           | 0,75   | 0,12 | 0,50   | 0,016  | 0,120 | 0,120  |
| 07-Unif/06           | 1,00   | 0,12 | 1,00   | 0,012  | 0,030 | 0,060  |
| 08-Unif/06           | 0,75   | 0,12 | 0,12   | 0,006  | 0,015 | 0,015  |
| 09-Unif/06           | 0,75   | 0,12 | 1,00   | 0,190  | 0,250 | 0,250  |
| 10-Unif/06           | 0,75   | 0,12 | 0,12   | 0,047  | 0,120 | 0,060  |
| 11-Unif/06           | 1,00   | 0,12 | 0,25   | 0,047  | 0,060 | 0,060  |
| 12 -Unif/06          | 48,0   | 64,0 | 64,0   | 0,500  | 0,030 | 0,250  |
| 13-Unif/06           | 0,75   | 0,25 | 0,25   | 0,047  | 0,015 | 0,060  |
| 14-Unif/06           | 0,75   | 0,12 | 0,12   | 0,032  | 0,015 | 0,060  |
| 15-Unif/06           | 0,50   | 0,12 | 0,12   | 0,064  | 0,015 | 0,060  |
| 16-Unif/06           | 0,38   | 0,12 | 0,12   | 0,064  | 0,120 | 0,060  |
| 17-Unif/06           | 0,50   | 0,12 | 0,12   | 0,125  | 0,120 | 0,120  |
| 18-Unif/06           | 4,00   | 4,00 | 16,0   | 0,047  | 0,015 | 0,120  |
| 19-Unif/06           | 0,50   | 0,12 | 0,25   | 0,094  | 0,015 | 0,120  |
| 20-Unif/06           | 1,00   | 0,25 | 1,00   | 0,047  | 0,015 | 0,060  |
| 21-Unif/06           | 0,50   | 0,12 | 0,25   | 0,032  | 0,015 | 0,030  |
| 22-Unif/06           | 0,75   | 0,12 | 0,25   | 0,047  | 0,015 | 0,060  |
| 23-Unif/06           | 0,38   | 0,12 | 0,25   | 0,047  | 0,015 | 0,060  |
| 24-Unif/06           | 0,75   | 0,12 | 0,50   | 0,064  | 0,015 | 0,060  |
| 25-Unif/06           | 1,00   | 1,00 | 0,50   | 0,023  | 0,015 | 0,030  |
| 26-Unif/06           | 0,50   | 0,12 | 0,12   | 0,190  | 0,250 | 0,120  |
| 27-Unif/06           | 0,50   | 0,12 | 0,12   | 0,064  | 0,030 | 0,060  |
| 28-Unif/06           | 0,75   | 0,25 | 0,25   | 0,032  | 0,015 | 0,060  |
| 29-Unif/06           | 0,38   | 0,12 | 0,12   | 0,008  | 0,015 | 0,015  |
| 30-Unif/06           | 0,25   | 0,25 | 0,12   | 0,047  | 0,015 | 0,120  |

<sup>1</sup>Nº Unifal-MG – Número na micoteca da Universidade Federal de Alfenas

<sup>2</sup>CIM-Concentração Inibitória mínima do antifúngico em  $\mu\text{g/mL}$