



## SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA DE CEPAS DE *Candida albicans* ISOLADAS DE PACIENTES HOSPITALIZADOS.

João Henrique de Souza (PIBIC/UNIOESTE/PRPPG), Ariana Bleich, Daniela Cristina Tartari, Eduardo Alexandre Loth, Emilia Ângela Sippert, Rita de Cássia Garcia Simão, Rinaldo Ferreira Gandra (Orientador), e-mail: [rfgandra@unioeste.br](mailto:rfgandra@unioeste.br).

Universidade Estadual do Oeste do Paraná/Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas/Cascavel, PR.

### Área da Saúde.

**Palavras-chaves:** *Candida albicans*, antifúngicos, infecção hospitalar

### Resumo:

*Candida albicans* é uma levedura que faz parte da microbiota do homem. A Colonização ou infecção por *Candida* em sítios como o trato intestinal, trato urogenital e trato respiratório são muito comuns em pacientes hospitalizados, podendo resultar em septicemia. Foram estudadas 18 cepas de *Candida albicans* provenientes de diferentes materiais biológicos (05 cepas de sangue, 03 de urina, 05 de secreção traqueal, 04 de secreção vaginal e 01 cepa de ponta de cateter), as amostras foram isoladas de pacientes internados em diversos setores do Hospital Univesitário do Oeste do Paraná. As cepas foram avaliadas quanto a susceptibilidade aos antifúngicos Fluconazol, Itraconazol, Anfotericina B, Cetoconazol, Miconazol, Nistatina, Clotrimazol e 5-Fluorocitosina através do método de difusão em disco. Considerando a classificação das cepas como sensíveis, intermediárias e resistentes todas as leveduras em estudo apresentaram sensibilidade frente aos antifúngicos Anfotericina B, Fluconazol, Cetoconazol, Itraconazol e Nistatina. O teste com o Miconazol mostrou que 16 cepas foram sensíveis a droga, o restante intermediário. Com o Clotrimazol, 17 cepas mostraram-se sensíveis e uma mostrou-se com sensibilidade intermediária. Com relação a 5-Fluorocitosina todas as amostras foram resistentes. Os testes de susceptibilidade aos antifúngicos possibilitou o uso da técnica de difusão em disco como rotina de triagem laboratorial apenas para o Fluconazol, permitindo assim caracterizar as amostras de *Candida albicans* em sensíveis, intermediária e resistentes.

### Introdução

Nos recentes anos a incidência de infecções invasivas causadas por *Candida* tem aumentado e tem emergido como um importante problema de saúde pública. Este patógeno é responsável por infecções principalmente em pacientes imunocomprometidos, incluindo aqueles que são submetidos à terapia imunossupressiva para o tratamento de câncer, órgão transplantado e o amplo uso de antibióticos e cateteres intravasculares<sup>1, 2, 3, 4</sup>.

prognóstico terapêutico. Na rotina do laboratório de micologia é importante adequar métodos que possibilitem avaliar a susceptibilidade antifúngica devido ao aumento da resistência dessas leveduras e, uma conseqüente diminuição do arsenal terapêutico disponível <sup>5,6</sup>.

O método de determinação precisa ser reprodutível, econômico, fácil, rápido, com boa correlação clínica, utilizando tecnologia que possa ser executada na rotina laboratorial. O objetivo deste trabalho foi padronizar a técnica de disco difusão para uso em laboratório de rotina, avaliando a susceptibilidade de *Candida albicans* isolados de diferentes materiais biológicos.

## Materiais e métodos

### Pacientes

Foram estudadas 18 cepas de *Candida albicans* provenientes de diferentes materiais biológicos (05 cepas de sangue, 03 cepas de urina, 05 cepas de secreção traqueal, 04 cepas de secreção vaginal e 01 cepa de ponta de cateter). As amostras foram isoladas no período compreendido entre 2007 a 2008 de pacientes internados no Hospital Universitário do Oeste do Paraná e estão estocadas no Laboratório de Micologia. As amostras foram identificadas fenotipicamente através do auxanograma, pesquisa da formação do tubo germinativo e produção de clamidoconídios, segundo as técnicas do Manual “The Yeasts” <sup>7</sup>. Para este estudo, foram selecionadas somente amostras identificadas como *Candida albicans*.

### Pesquisa da susceptibilidade

O teste de susceptibilidade utilizado no estudo foi o de difusão em disco, e as drogas testadas foram Anfotericina B, Cetoconazol, Itraconazol, Fluconazol, Miconazol, Nistatina, Clotrimazol e 5-Fluorocistina sendo todas da(CECON)®. Suspensões em salina, utilizando a escala 0,5 de McFarland, das respectivas cepas foram feitas a partir de cultura em Agar Sabouraud após 24h de incubação, em seguida foi semeado com swab estéril sobre a superfície da placa contendo Agar Muller Hinton suplementado com 2% de glicose 0,5 µg/mL de azul de metileno, pH= 7,2 e logo em seguida os discos de difusão foram depositados, sobre o Agar inoculado e os mesmos foram incubados a 37°C/ 24 h e utilizando régua para a leitura do halo, sendo esta feita após 24 horas de incubação. O teste foi realizado de acordo com o documento M44-A do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI 2004) e pelo fabricante do “kit” (CECON, Brasil). A leitura foi feita segundo recomendações do fabricante e o documento M44-A do CLSI (Quadro1).

**Quadro 1:** Interpretação do diâmetro para Fluconazol e CIM (Concentração Inibitória Mínima) correspondente. (M44-A da CLSI 2004).

Antifúngico	Conc./Disco	Diâmetro da zona (mm)			Equivalente MIC (mcg/mL)		
		Resistente	S-DD*	Sensível	Resistente	S-DD*	Sensível
Fluconazol	25 mcg	≤ 14	15 - 18	≥19	≤64	16 - 32	≥8

\*Susceptibilidade Dose Dependente

## Resultados e Discussão

Os resultados do perfil de susceptibilidade, das 18 cepas de *Candida albicans* frente aos antifúngicos testados, quando comparados com os valores de referência do fabricante, mostraram que todas as leveduras foram sensíveis aos antifúngicos Anfotericina B, Fluconazol, Cetoconazol, Itraconazol e Nistatina; Frente ao miconazol 16 cepas foram sensíveis a droga, o restante intermediário. Com o Clotrimazol 17 cepas mostraram-se sensíveis e uma mostrou-se com sensibilidade intermediária. Com relação a 5-Fluorocitosina todas as amostras foram resistentes (Tabela1). Os resultados obtidos com o fluconazol foram concordantes entre o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) e aos fornecidos pelo fabricante. A figura 1 demonstra a zona de inibição para Anfotericina B (B) e o efeito *trailing* é observado com o fluconazol(A). A figura 2 mostra a resistência da cepa frente ao antifúngico 5-Fluorocitosina (A).

**Tabela 1:** Perfil de sensibilidade de cepas de *Candida albicans* isolados de diferentes materiais biológicos (sangue, secreção vaginal, secreção traqueal, urina e ponta de cateter) pelo método de disco difusão.

Origem/cepa	Anf. B	Flu	Ceto	Itra	Nist	Mic	Clo	5Flu
<b>Sangue/</b>								
252	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(R)
219	(S)	(S)*	(S)*	(S)*	(S)	(S)	(S)	(R)
212	(S)	(S)*	(S)	(S)*	(S)	(S)	(S)	(R)
213	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(R)
154	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(I)	(S)	(R)
<b>Sec.Vaginal/</b>								
178	(S)	(S)*	(S)*	(S)*	(S)	(S)	(S)	(R)
538	(S)	(S)*	(S)*	(S)*	(S)	(S)	(S)*	(R)
515	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(R)
534	(S)	(S)*	(S)*	(S)*	(S)	(S)	(S)	(R)
<b>Sec.Traqueal/</b>								
241	(S)	(S)*	(S)*	(S)	(S)	(S)	(S)	(R)
9078	(S)	(S)*	(S)*	(S)*	(S)	(S)	(S)	(R)
143	(S)	(S)*	(S)*	(S)*	(S)	(S)	(S)	(R)
14913	(S)	(S)*	(S)*	(S)*	(S)	(S)	(S)	(R)
15210	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(R)
<b>Urina/</b>								
185	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(R)
05	(S)	(S)*	(S)*	(S)*	(S)	(I)	(I)	(R)
235	(S)	(S)*	(S)*	(S)*	(S)	(S)	(S)	(R)
<b>Ponta Cateter/</b>								
237	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(R)

(S) – Sensível; (I) – Intermediário; (R) – Resistente; \* Fenômeno *trailing*; Anf.B - Anfotericina B; Flu - Fluconazol; Ceto - Cetoconazol; Itra - Itraconazol; Nist - Nistatina; Mic - Miconazol; Clo - Clotrimazol; 5Flu – 5-Fluorocitosina

A grande maioria dos isolados de *C. albicans* apresentaram forte *trailing* (Figura1) nos ensaios com itraconazol, fluconazol e cetoconazol entre 24-48h de incubação. O fenômeno *trailing* representa um crescimento reduzido, mas persistente, acima da CIM (Concentração Inibitória Mínima) para alguns derivados azólicos. Em geral, tal crescimento surge entre 24-48 horas de incuba-

ção, o que faz crer equivocadamente que a levedura em princípio é susceptível, mas que posteriormente, se torna resistente. De acordo com alguns investigadores, a respeito deste fenômeno, na verdade, as cepas mantêm-se susceptíveis *in vivo*. As causas do *trailing* não estão bem definidas, todavia, o tamanho de inóculo, tempo de incubação, concentração de glicose, tampão e pH do meio de cultura e características inerentes ao fungo podem estar envolvidos<sup>8,9,10</sup>.

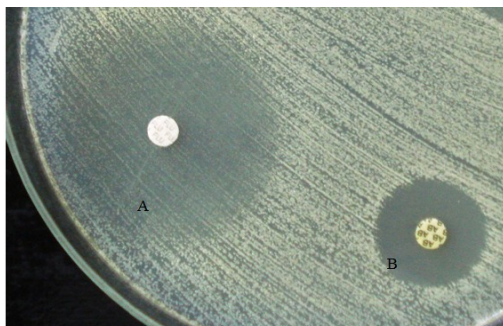


Figura 1



Figura 2

## Conclusões

Neste estudo todas as amostras de *Candida albicans* foram sensíveis ao fluconazol, e os testes de susceptibilidade antifúngica para difusão em disco mostram-se eficazes e reprodutíveis.

## Referências

1. Tortorano, A.M.; Biraghi, E.; Astolfi, A.; Ossi C.; Tejada, M.; Farina, C.; *et al* Candidaemia study Group. Confederation of Medical Mycology (ECMM) prospective survey of candidemia: report from one Italian region. **J. Hosp. Infect.** v.51, p. 297-304, 2002.
2. Hajjeh, R.A.; Sofair, A.N.; Harrison, L.H.; Lyon, G.M.; Arthington-Skaggs, B.A. Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and in vitro susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. **J. Clin. Microbiol.** v.42, p. 1519-1527, 2004.
3. Jarvis, W.R. Epidemiology of nosocomial fungal infections, with emphasis on *Candida* species. **Clin. Infect. Dis.** v.20, p. 1526-1530, 1995.
4. WINGARD, J.R. Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. **Clin. Infect. Dis.** v.20, p. 115-125, 1995.
5. Rex, J.H.; Pfaller, M.A.; Walsh, T.J.; Chaturvedi, V.; Espinel-Ingroff, A.; Ghannoum, M.A.; *et al.* Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. **Clin. Microbiol. Rev.** v.14, p. 643-658, 2001.
6. Lopes J *et al.* Decrease in *Candida albicans* strains with reduced susceptibility to fluconazole following changes in prescribing policies. **J Hosp Infect**, 48:122-2, 2001
7. Kurtzman CP, Fell JW. The yeasts: a taxonomic study. 40 ed. New York; 1998.
8. Revankar SG, Kirkpatrick WR, Mcatee RK, Fothergill AW, Redding SW, Rinaldi MG, Patterson TF 1998. Interpretation of trailing endpoints in antifungal susceptibility testing by the National Committee for Clinical Laboratory Standards method. **J Clin Microbiol** 36 (1): 153-6.
9. AGRAWAL D, Patterson TF, Rinaldi MG, Revankar SG 2007. Trailing end-point phenotype of *Candida* spp. in antifungal susceptibility testing to fluconazole is eliminated by altering incubation temperature. **J Med Microbiol (Pt 7)**: 1003-4.
10. COENYE T, DE VOS M, VANDENBOSCH D, NELIS H 2008. Factors influencing the trailing endpoint observed in *Candida albicans* susceptibility testing using the CLSI procedure. **Clin Microbiol Infect.** 14 (5): 495-7.