

# TESTE DE SUSCETIBILIDADE *IN VITRO* PARA LEVEDURAS ENVOLVIDAS EM INFECÇÕES NOSOCOMIAIS

FLORENTINO, Bárbara de Mello<sup>1</sup>; PASSOS, Xisto Sena<sup>2</sup>; SILVA, Maria do Rosário Rodrigues<sup>3</sup>

Palavras-chave: Teste de suscetibilidade – Leveduras – Infecções nosocomiais

## 1. INTRODUÇÃO (justificativa e objetivos)

Infecções nosocomiais são consideradas importantes causa de morbidade e mortalidade em hospitais. Espécies de fungos pertencentes aos gêneros *Candida* e *Aspergillus* e a classe dos *Zygomycetos* são os principais responsáveis pela maioria das infecções em hospitais. As espécies de *Candida* são indiscutivelmente as principais causas de infecções fúngicas nosocomiais. O grande número de agentes antifúngicos atualmente disponíveis, o relato de resistência verificado em isolados de *Candida*, principalmente em pacientes imunocomprometidos e a necessidade de um tratamento rápido, adequado e eficaz, fizeram com que houvesse um grande interesse em se estudar os testes de suscetibilidade *in vitro*. O objetivo deste trabalho é determinar a concentração inibitória mínima de leveduras, isoladas do sangue de pacientes da unidade de terapia intensiva do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás frente ao fluconazol, voriconazol, anfotericina B e itraconazol usando o teste de suscetibilidade *in vitro* de microdiluição em caldo.

## 2. METODOLOGIA

**2.1- Antifúngicos:** itraconazol foi diluído em água destilada, variando sua concentração de 0,031 a 16 µg/ml. Fluconazol foi diluído em polietileno glicol, para as concentrações de 0,125 a 64 µg/ml. Voriconazol e anfotericina B foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO), e suas concentrações variaram de 0,031 a 16 µg/ml.

**2.2- Meio de cultura:** foi utilizado o meio de RPMI 1640 com L-glutamina sem bicarbonato de sódio, suplementado com 2% de glicose, tamponado com 0,165 mol/l de tampão MOPS (ácido morfolinopropanosulfônico) para pH 7,0, esterilizado por filtração, e armazenado a 4°C até a utilização.

**2.3-Preparo do inóculo:** o inóculo foi preparado a partir de colônias de leveduras cultivadas em ágar Sabouraud dextrose por 24 horas a 35°C e subcultivadas por duas vezes para assim assegurar sua pureza e viabilidade. Preparou-se uma suspensão em salina a 0,85% esterilizada, e a densidade celular foi medida em espectrofotometria (transmitância de 85% em comprimento de onda de 530 nm). Posteriormente, esta suspensão foi diluída a 1: 100 em água deionizada esterilizada e, a seguir, 1: 20 em RPMI de modo que a concentração final do inóculo contivesse de 0,5 a 2,5 x 10<sup>3</sup> células/ml.

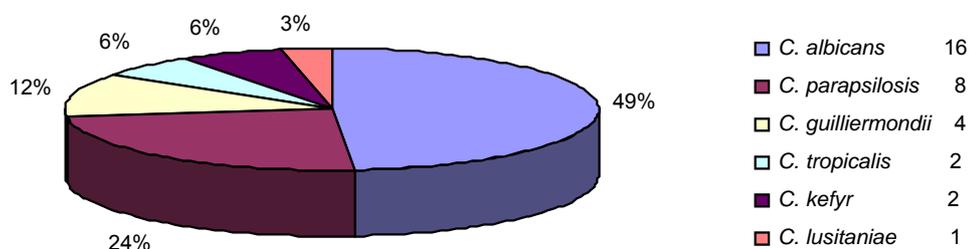
**2.4-Preparo das diluições dos antifúngicos e realização do testes:** todos os isolados foram submetidos a concentrações das drogas que variaram de 0,031 a 16 µg/ml para anfotericina B, itraconazol e voriconazol, e de 0,125 a 64 µg/ml para fluconazol. Soluções estoques foram preparadas para cada droga, de maneira que para o fluconazol, os primeiros orifícios de cada placa, de cada série, contiveram uma concentração de 128 µg/ml, e para os derivados azólicos e anfotericina B, os primeiros orifícios das placas de cada série contiveram 32 µg/ml. Foram feitas diluições seriadas ao dobro a partir do primeiro orifício,

obtendo-se as concentrações citadas acima para cada antifúngico. Adicionou-se 100 µl do inóculo em cada orifício contendo o antifúngico diluído na placa. As placas foram incubadas a 35°C por 48 horas. Todos os testes foram realizados em duplicata e foram feitos controles para o meio de cultura, para o agente antifúngico e para o inóculo. *Candida parapsilosis* ATCC 22019 foi utilizada como controle padrão.

2.5- Leitura e interpretação dos resultados: as placas foram colocadas sobre um espelho no momento da leitura para facilitá-la. Comparou-se o crescimento, visualizado através de turvação, em cada orifício com o controle de crescimento, livre da droga. Para os azólicos a concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração capaz de inibir ao menos 80% do crescimento do microorganismo estudado, comparado ao controle. Para anfotericina B, a CIM foi definida como a menor concentração da droga capaz de inibir o crescimento total do organismo. A determinação da resistência dos isolados frente ao fluconazol (CIM ≥ 64 µg/ml) e ao itraconazol (CIM ≥ 1 µg/ml) foi baseada nos valores do documento M27-A2 do NCCLS. Critério interpretativo ainda não foi definido para anfotericina B e para voriconazol, portanto foram selecionados os valores de CIM > 1 µg/ml para anfotericina B e ≥ 1 µg/ml para voriconazol como resistentes, como sugerido nos estudos de Nguyen et al e Pfaller et al.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os testes de suscetibilidade *in vitro* foram realizados para as espécies de *Candida* isoladas do sangue dos pacientes da unidade terapia intensiva do Hospital das Clínicas, conforme figura anexa (figura 1).



**Figura 1- Identificação das espécies de *Candida* isoladas do sangue de pacientes da unidade de terapia intensiva do Hospital das Clínicas**

A análise da resistência dos isolados, baseados nos valores de breakpoints estabelecidos pelo NCCLS mostrou que espécies não-*albicans* foram mais resistentes aos antifúngicos estudados que *C. albicans*. Somente um isolado de *C. albicans* foi resistente ao itraconazol, enquanto que três diferentes isolados de *C. parapsilosis* foram resistentes aos antifúngicos testados. Valores de CIM de 4 µg/ml para anfotericina B, de 64 µg/ml para fluconazol e de 4 µg/ml para itraconazol foram verificados para cada isolado da espécie referida. Todos isolados foram susceptíveis a voriconazol (tabela 2).

**Tabela 2: Atividade *in vitro* dos quatro antifúngicos frente a 33 isolados de sangue**

Isolados (nº)	Agentes Antifúngicos	CIM (µg/ mL)		
		Varição	CIM <sub>90</sub>	Resistentes (n)
C. <i>albicans</i> n=16	Anfotericina B	0,032 – 0,5	0,5	-
	Fluconazol	0,125 – 2,0	2,0	-
	Itraconazol	0,016 – 4,0	0,5	1
	Voriconazol	0,016 – 0,5	0,5	-
C. não <i>albicans</i> n=17	Anfotericina B	0,016 – 4,0	0,5	1
	Fluconazol	0,125 – 64,0	1,0	1
	Itraconazol	0,016 – 4,0	0,25	1
	Voriconazol	0,016 – 0,5	0,5	-

#### 4. CONCLUSÃO

O encontro de isolados de *Candida* resistentes aos derivados azólicos e a anfotericina B mostra que os testes de suscetibilidade para fungos devem ser utilizados em rotinas de laboratório para que seja realizado o tratamento ideal para as candidemias. Concluimos também que a atividade *in vitro* de voriconazol foi maior que aquelas apresentadas pela anfotericina B, itraconazol e fluconazol. Esses resultados sugerem que voriconazol pode ser o azólico mais eficaz no tratamento de candidemias.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

NCCLS- National Commetee for Clinical Laboratory Standards 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Aprovado standard. Document M27-A, NCCLS, Pennsylvania, 19087, vol.17, p.1-29.

NGUYEN MH, CLANCY CJ, YU VL, YU YC, MORRIS AJ, SNYDMAN DR, SUTTON DA, RINALDI MG. Do in vitro susceptibility data predict the microbiological response to Anphotericin B? Results of a prospective study of pacientes with *Candida* fungemia. J Infect Dis 1998; 177:425-430.

PFALLER MA, DIEKEMA DJ, JONES RN, SADER HS, FLUIT AC, HOLLIS RJ. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species, frequency of occurrence and in vitro susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY antimicrobial surveillance program. J Clin Microbiol 2001; 39:3254-3259.

#### FONTE DE FINANCIAMENTO: CNPq/PIBIC

<sup>1</sup> Bolsista de iniciação científica. Faculdade de Medicina/UFG - IPTSP - Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, [bauflorentino@yahoo.com.br](mailto:bauflorentino@yahoo.com.br)

<sup>2</sup> Doutorando/IPTSP/UFG, [xisto.s@brturbo.com.br](mailto:xisto.s@brturbo.com.br)

<sup>3</sup> Orientadora/IPTSP/UFG, [rosario@iptsp.ufg.br](mailto:rosario@iptsp.ufg.br)