



PROGRAMA DE APRIMORAMENTO
PROFISSIONAL
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE RECURSOS HUMANOS



CAROLINA BRANQUINHO BERNARDES
JACQUELINE NIKAIDO

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SENSIBILIDADE DE *C. albicans* E *C. glabrata*
FRENTE AO FLUCONAZOL E À MICALFUNGINA PELOS MÉTODOS DE DISCO-
DIFUSÃO E “DROP-OUT”**

Ribeirão Preto
2018



PROGRAMA DE APRIMORAMENTO
PROFISSIONAL
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE RECURSOS HUMANOS



**BERNARDES, CAROLINA BRANQUINHO
NIKAIDO, JACQUELINE**

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SENSIBILIDADE DE *C. albicans* E *C. glabrata*
FRENTE AO FLUCONAZOL E À MICAFUNGINA PELOS MÉTODOS DE DISCO-
DIFUSÃO E “DROP-OUT”**

Monografia apresentada ao Programa de Aprimoramento Profissional/CRH/SES-SP , elaborada no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – USP/ Departamento DAM 3.2.2 – Laboratório de Microbiologia.

Área: Microbiologia em Infecção Hospitalar

Orientador(a): Prof. Dr. Roberto Martinez

Supervisor(a) Titular: Renata Helena Candido Pocente

Ribeirão Preto
2018

AGRADECIMENTOS

Agradecemos, primeiramente, às nossas famílias pelo apoio e pelos votos de confiança durante esse percurso.

Agradecemos aos nossos parceiros de trabalho Vinicius Rabello, Lucas Chaves, Aline Fiolato e Maria Paula pelo companheirismo e auxílio durante os experimentos.

Agradecemos ao Tiago Alexandre Cocio pelo apoio e pela “co-orientação”, uma vez que este sempre esteve disposto a nos ajudar, sendo, assim, o braço direito deste estudo.

Agradecemos, também, à Renata Candido Pocente, pela compreensão, pela paciência e pelos materiais fornecidos.

Agradecemos à Daniela Ferracini e à Cristiane Sette por nos terem fornecidos os isolados utilizados no estudo.

Agradecemos, por fim, ao nosso orientador Prof. Dr. Roberto Martinez pelos ensinamentos, pela orientação e pelo apoio.

RESUMO

A evolução da medicina tem sido um dos motivos que facilitaram as infecções por microrganismos menos virulentos. Como consequência disto, houve um aumento da prevalência de infecções causadas por agentes oportunistas como, por exemplo, candidíases causadas pelo gênero *Candida*. As principais espécies de *Candida* spp. que levam à candidíase em humanos são *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida parapsilosis*. Devido ao surgimento de cepas de *Candida* spp. resistentes a determinadas drogas, faz-se necessário a aplicação de testes de sensibilidade a antifúngicos para que médicos possam utilizar os medicamentos corretos no tratamento de doenças fúngicas. O objetivo do estudo foi avaliar os perfis de sensibilidade, através da estimativa dos MICs, das cepas de *Candida albicans* e *Candida glabrata* frente aos antifúngicos fluconazol e micafungina pelas técnicas de “drop-out” e disco-difusão. Foram utilizados 60 isolados clínicos de *Candida* spp., sendo 30 de *Candida albicans* e 30 de *Candida glabrata*. Os isolados foram obtidos de amostras diversas de pacientes hospitalizados no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, no ano de 2017. Os resultados obtidos através dos testes de disco-difusão e “drop-out” mostraram que a micafungina tem alta atividade antifúngica contra *Candida albicans* e *Candida glabrata*. Já frente ao fluconazol, os isolados clínicos de *Candida albicans* apresentaram características sensíveis em ambas as técnicas utilizadas, uma vez que o crescimento ficou restrito entre as concentrações 0,25µg/mL e 8µg/mL na técnica de “drop-out”. Os isolados clínicos de *Candida glabrata*, por outro lado, apresentaram 96,6% de sensibilidade frente ao antifúngico na técnica de disco-difusão e 100% de sensibilidade na técnica de “drop-out”, havendo crescimento apenas nas concentrações entre 0,125µg/mL e 8µg/mL. Foi possível concluir que os isolados clínicos de *Candida albicans* apresentaram características sensíveis frente ao fluconazol e à micafungina, da mesma forma que os isolados de *Candida glabrata* exibiram características sensíveis à micafungina. Esses últimos, frente ao fluconazol, obtiveram características menos sensíveis quando comparados aos isolados de *Candida albicans*.

Palavras-chave: *Candida*; disco-difusão; “drop-out”; micafungina; fluconazol.

ABSTRACT

The evolution of medicine has been one of the reasons that have allowed the survival of microorganisms susceptible to certain drugs. Consequently, there has been an increase of infections, such as candidiasis, caused by opportunists agents like *Candida* spp. The main species of *Candida* spp. that lead to candidiasis in humans are *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Candida parapsilosis*. Due to the emergence of *Candida* spp. strains resistant to certain drugs, antifungal susceptibility tests have been used so that doctors can apply the correct drugs on treatment for fungal diseases. The aim of this study was to evaluate the susceptibility profiles, based on the MICs values, of *Candida albicans* and *Candida glabrata* strains against fluconazole and micafungin drugs, using drop-out and disk-diffusion assays. Sixty isolates were tested in this study, in which 30 isolates were from *Candida albicans* and 30 from *Candida glabrata*. The isolates were obtained from diverse samples of patients admitted to the Hospital das Clínicas of Ribeirão Preto during the period of 2017. The results obtained from the drop-out and disk-diffusion assays showed that micafungin has elevated antifungal activity against *Candida albicans* and *Candida glabrata*, whereas against fluconazole, clinical isolates of *Candida albicans* showed susceptible characteristics in both assays with a growth observed in concentrations that vary from 0,25µg/mL and 8 µg/mL on the drop-out assay. The clinical isolates of *Candida glabrata*, on the other hand, expressed 96,6% of sensibility against fluconazole on disk-diffusion assay and 100% sensibility on drop-out assay, with a growth restricted to the concentrations of 0,125 µg/mL - 8 µg/mL. It was concluded that the clinical isolates of *Candida albicans* were susceptible against fluconazole and micafungin. On the other hand, *Candida glabrata* expressed susceptible characteristics to micafungin, but less susceptible ones against fluconazole.

Keywords: *Candida*, disk-diffusion, drop-out, micafungin, fluconazole.

SUMÁRIO

RESUMO.....	4
ABSTRACT	5
1. Introdução.....	7
1.1. Agentes infecciosos	7
1.2. Antifúngicos e Testes de Sensibilidade.....	8
1. Materiais e métodos	9
2.1. Isolados utilizados no experimento	9
2.2. Agentes antifúngicos	10
2.3. Preparo dos meios de cultura	10
2.4. Meio para Antifungigrama (ATF) por disco-difusão	10
2.5. Meio Sabouraud	11
2.6. Meio Müeller Hinton com o antifúngico utilizado na técnica de “drop-out”	11
2.7. Preparo dos inóculos para a técnica “drop-out” e disco-difusão	12
3. Resultados	15
4. Discussão	28
5. Conclusão.....	30
6. Referências Bibliográficas	31

1. INTRODUÇÃO

1.1. Agentes infecciosos

A evolução da medicina tem sido um dos motivos que facilitaram as infecções por microrganismos menos virulentos. Como consequência disto, houve um aumento da prevalência de infecções causadas por agentes oportunistas como, por exemplo, candidíases causadas pelo gênero *Candida* (CARRETÉ *et al.*, 2017, BROWN *et al.*, 2012). As principais espécies de *Candida* spp. que levam à candidíase em humanos são *Candida albicans* (*C. albicans*), *Candida glabrata* (*C. glabrata*) e *Candida parapsilosis* (*C. parapsilosis*) e a prevalência da infecção, geralmente, é nessa ordem (CARRETÉ *et al.*, 2017, DIEKEMA *et al.*, 2012).

Candidíase invasiva e candidemia (presença de *Candida* spp. na corrente sanguínea) são complicações frequentes em pacientes internados em Centros de Terapia Intensiva (CTI), principalmente aqueles que apresentam quadro de sepse. Os principais fatores que levam a um cenário de infecção fúngica são hospitalização (sobretudo pacientes que estão no CTI por períodos maiores do que 21 dias), a condição do paciente (especialmente a neutropenia), terapias (hormonais ou com antibióticos) e fatores que sejam prejudiciais à integridade do tecido, facilitando, assim, a entrada do microrganismo no indivíduo hospedeiro (MODRZEWSKA *et al.*, 2017, BADIEE & HASHEMIZADE, 2014).

Segundo estudos analíticos realizados por Schmidt *et al.* (2017) em uma população francesa durante os anos de 2001 e 2010, foi possível observar que a ocorrência de infecções fúngicas invasivas causadas por *Candida* spp. obteve um aumento de 7,8% ao ano, o qual foi relativamente alto. Em pacientes hospitalizados e imunossuprimidos, as infecções invasivas ocasionadas por *Candida* spp. são causas de grande relevância de morbidade e mortalidade (SÜTÇÜ *et al.*, 2017, TRAGIANNIDIS *et al.*, 2013).

Espécies de *Candida* spp. ocupam o 4º lugar entre as principais causas de infecções da corrente sanguínea (SÜTÇÜ *et al.*, 2017, EDMOND *et al.*, 1999, COELLO *et al.*, 2003). Em recém-nascidos e lactentes, as taxas de mortalidade devido à infecção pelo fungo podem atingir níveis de 40-50%, independentemente

da administração de antifúngicos de maneira profilática ou como forma de tratamento empírico (SÜTÇÜ *et al.*, 2017, SAIMAN *et al.*, 2000).

Atualmente, o microrganismo mais comumente isolado em candidíases invasivas é a *Candida albicans*. Porém, a doença causada por outras espécies de *Candida* spp. tem aumentado significativamente, com taxas de até 73% segundo estudos realizados na Turquia (SÜTÇÜ *et al.*, 2017, GÜLTEKIN *et al.*, 2011).

No Brasil, as três espécies de *Candida* spp. que se destacam entre as demais devido à predominância entre os casos de candidemias são *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis* (HINRICHSEN *et al.*, 2008, COLOMBO, 2000, COLOMBO *et al.*, 2006).

Devido ao uso de drogas antifúngicas de maneira profilática (ex: fluconazol) em pacientes de grupo de risco, foi possível observar um aumento de espécies de *Candida* spp. resistentes ao medicamento, principalmente *Candida glabrata* e *Candida krusei* (SÜTÇÜ *et al.*, 2017).

1.2. Antifúngicos e Testes de Sensibilidade

Nos Estados Unidos da América (EUA), o uso do antifúngico fluconazol age como seletor sobre as espécies não-*albicans*, fazendo com que essas se sobressaíam em relação à *Candida albicans*. Já no cenário brasileiro, as espécies de *Candida* não-*albicans* mais predominantes ainda apresentam sensibilidade à droga (HINRICHSEN *et al.*, 2008, REX & SOBEL, 2001).

Várias drogas antifúngicas têm sido desenvolvidas e comercializadas, e tais são pertencentes a 4 classes: os poliênicos, os azólicos, alilaminas e as equinocandinas. Cada classe de antifúngico é responsável por ter um mecanismo de ação sobre as estruturas fúngicas. Os poliênicos têm atividade sobre a membrana, mais especificamente o ergosterol, causando extravasamento do material intracelular do microrganismo, levando-o à morte. Os azólicos e as alilaminas têm a capacidade de interferir na síntese de ergosterol em diferentes etapas e as equinocandinas interferem na síntese da parede celular fúngica, através da inibição da enzima β -1,3-glucana sintase (CHEN *et al.*, 2017, ROEMER & KRYSAN, 2014).

Um dos principais agentes antifúngicos do grupo dos azólicos é o fluconazol. Atualmente, populações de cepas resistentes às drogas pertencentes aos grupos dos azólicos têm emergido devido a mutações ou resistências intrínsecas/naturais

em algumas espécies (CHEN *et al.*, 2017, XIE *et al.*, 2014). Sabe-se que *Candida glabrata* é conhecida por ter adquirido resistência ao fluconazol e outros azólicos. A *Candida krusei*, por outro lado, demonstra resistência intrínseca aos azólicos antigos, e foi comprovada, também, resistência primária à anfotericina B por *Candida lusitanae* e *Candida haemulonii* (MELHEM *et al.*, 2013, RODRIGUEZ-TUDELA *et al.*, 2008).

As equinocandinas têm como principais drogas a micafungina, caspofungina e anidulafungina. Esse grupo de antifúngicos é utilizado como tratamento alternativo ao fluconazol em adultos com suspeita de candidemia ou candidíases invasivas (CHEN *et al.*, 2017, PAPPAS *et al.*, 2009).

Devido ao surgimento de cepas de *Candida* spp. resistentes a determinadas drogas, faz-se necessário a aplicação de testes de sensibilidade a antifúngicos para que médicos possam utilizar os medicamentos corretos no tratamento de doenças fúngicas (VALLABHANENI *et al.*, 2017, PAPPAS *et al.*, 2016).

A técnica de disco-difusão, também conhecida como método de Bauer-Kirby, é um dos testes de sensibilidade a antifúngicos mais utilizados nos laboratórios de rotina devido a sua simplicidade e baixo custo (LOZANO *et al.*, 1999). Esse método tem como princípio a difusão no ágar de substâncias, como drogas antifúngicas, impregnadas em discos de papel (WOODS & WASHINGTON, 1995). Tais discos possuem concentrações únicas e fixas de agentes antifúngicos e o diâmetro da zona de inibição está relacionado às concentrações inibitórias mínimas (MIC) (BAUER *et al.*, 1966).

Ensaio de diluição seriada pelo método de “drop-out” ou mais conhecido como “spot assay dilution”, em geral, são executados em laboratórios de microbiologia para avaliar o padrão de sensibilidade de diversas leveduras em placas de ágar sólido. Tal ensaio é utilizado quando o MIC de uma droga é conhecido frente a determinado microrganismo (VARMA & SHARMA, 2017).

O objetivo do estudo foi avaliar os perfis de sensibilidade através da estimativa dos MICs, das cepas de *Candida albicans* e *Candida glabrata* frente aos antifúngicos fluconazol e micafungina pelas técnicas de “drop-out” e disco-difusão.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Isolados utilizados no experimento

No total, foram utilizados 60 isolados clínicos de pacientes do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto no ano 2017, os quais são armazenados na Micoteca do Laboratório de Pesquisa da Microbiologia. Desses 60, 30 são isolados de *Candida albicans* e 30 de *Candida glabrata*. Os isolados utilizados no presente estudo são derivados de diversos materiais como sangue, sangue de cateter, urina, urina provinda de sonda, ferida cirúrgica, escarro, aspirado traqueal, ponta de cateter e líquidos nobres (estéreis). Além dos 60 isolados, foi utilizada uma cepa conhecida de *Candida albicans*, a American Type Culture Collection (ATCC) 64548, a qual serviu de controle neste estudo. Segundo estudos realizados por Cantón *et al.*, foi possível determinar o MIC da cepa, sendo este de 0,25µg/mL mostrando-se sensível ao fluconazol.

2.2. Agentes antifúngicos

As drogas utilizadas no experimento foram fluconazol e micafungina. O armazenamento destas foi em tubos para microcentrifuga, cujo volume é de 1,5mL e mantidas em freezers a -70°C. A concentração do estoque (concentração total) da primeira droga foi de 5120µg/mL e a da segunda, 1000µg/mL.

Os antifúngicos foram utilizados em forma de solução para o método “drop-out” e impregnados em discos na técnica de disco-difusão. Os discos comprados foram armazenados em geladeira com temperatura abaixo de 8°C. As drogas foram obtidas de seus respectivos fabricantes – fluconazol e micafungina produzidas pela empresa SIGMA™, EUA e discos de fluconazol produzidos pela empresa CECON®, Brasil. Os discos de micafungina foram produzidos *in house* e o preparo destes foi realizado através da adição de 25µL de micafungina em discos de papel virgem.

2.3. Preparo dos meios de cultura

Os meios de cultura utilizados foram Sabouraud (OXOID™ Ltd, Reino Unido) e Müller Hinton (MH) (BD™, EUA). O primeiro foi empregado na manutenção da micoteca e preservação dos isolados (repicados um dia antes ao experimento em placas de Petri 90x15mm), enquanto o segundo foi empregado nos testes de sensibilidade.

2.4. Meio para Antifungigrama (ATF) por disco-difusão

O meio para ATF foi preparado a partir de 34g de MH (ágar), 20g de glicose à 2% e 100µL de azul de metileno diluídos em 1000µL de água destilada. Após esterilização por autoclave a 121°C por 60 min, o meio foi distribuído em placas de Petri 90x15mm.

2.5. Meio Sabouraud

O preparo desse meio foi feito a partir da pesagem de 65g de Sabouraud (ágar) e posterior diluição em água (1000µL). Foi adicionado, também, 0,16g de cloranfenicol (NOVAFARMA®, Brasil) para inibição de crescimento bacteriano indesejado. A solução foi submetida à autoclave a 121°C por 60 min. Em seguida, o meio foi distribuído em tubos de ensaio de vidro e em placas de Petri 90x15mm.

2.6. Meio Müeller Hinton com o antifúngico utilizado na técnica de “drop-out”

O meio MH foi preparado a partir de 38g de MH (ágar) e dissolvido em 1000µL de água. Ao meio MH foram adicionadas diversas concentrações dos antifúngicos. As concentrações adotadas, segundo as normas da Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) de 2008, para o fluconazol foram: 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32 e 64µg/mL. De tal forma, para se obter tais concentrações, foram realizadas diluições seriadas, partindo de uma concentração inicial de 1250µg/mL para 50mL (volume total da placa de Petri 150x15mm). As concentrações adotadas para a micafungina, também de acordo com as normas da CLSI de 2008, foram: 0,015; 0,03; 0,06; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4 e 8 µg/mL. Partindo da concentração inicial de 1000µg/mL, foi realizada a diluição seriada.

Partindo de um tubo de ensaio contendo 2mL de água destilada, foi adicionado 1250µL de fluconazol, a fim de se obter uma concentração inicial de 64µg/mL da droga. Com o auxílio de uma pipeta, foi realizada a transferência de 1mL da solução para o próximo tubo, o qual continha 1mL de água destilada. A transferência foi realizada em 10 tubos no total, até a concentração mínima de 0,125µg/mL ter sido atingida, conforme mostrado na figura 1.

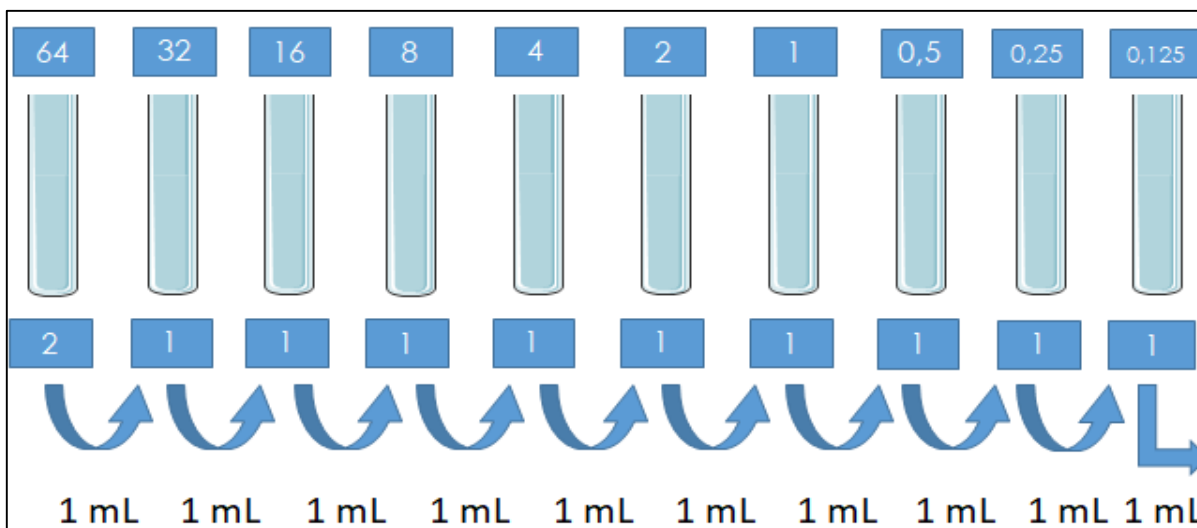


Figura 1 – Diluição seriada dos antifúngicos para a técnica de “drop-out”.

Fonte: Adaptado de www.servier.com.br

Após realizadas todas as diluições, foram adicionados 49mL de meio MH em um tubo Falcon (50mL), juntamente à diluição de fluconazol (1mL) de cada tubo, totalizando, assim, 50mL. Em seguida, foram preparadas 11 placas (sendo uma delas o controle sem a adição de drogas antifúngicas, contendo 50mL de meio somente) para cada concentração da droga, distribuindo a solução de 49mL de meio mais 1mL de droga à placa de Petri 150x15mm.

2.7. Preparo dos inóculos para a técnica “drop-out” e disco-difusão

Previamente, foram realizados os repiques em placas de Petri 90x15mm contendo meio de cultura Sabouraud e, a partir destes, foram preparados os inóculos. Os repiques foram realizados 24h anteriores aos testes e a finalidade dos mesmos foi de preservar a viabilidade das cepas.

Tubos de ensaio contendo 3mL de NaCl (L.S. CHEMICALS™, Índia) e turvação de 0,5 na escala de McFarland foram utilizados. A partir dos mesmos, os quais continham concentração de 10^6 células, houve a transferência de 100µL para tubos de microcentrífuga de 1,5mL, de maneira subsequente, a fim de realizar a diluição dos inóculos. Cada tubo possuía 900µL de NaCl. A cada transferência de 100µL do inóculo de um tubo para outro, a concentração caía 10 vezes, chegando a uma concentração final de 10^2 células.

Para cada isolado foram utilizados 4 tubos de microcentrífuga de 1,5mL e 1 tubo de ensaio, como mostrado na figura 2.

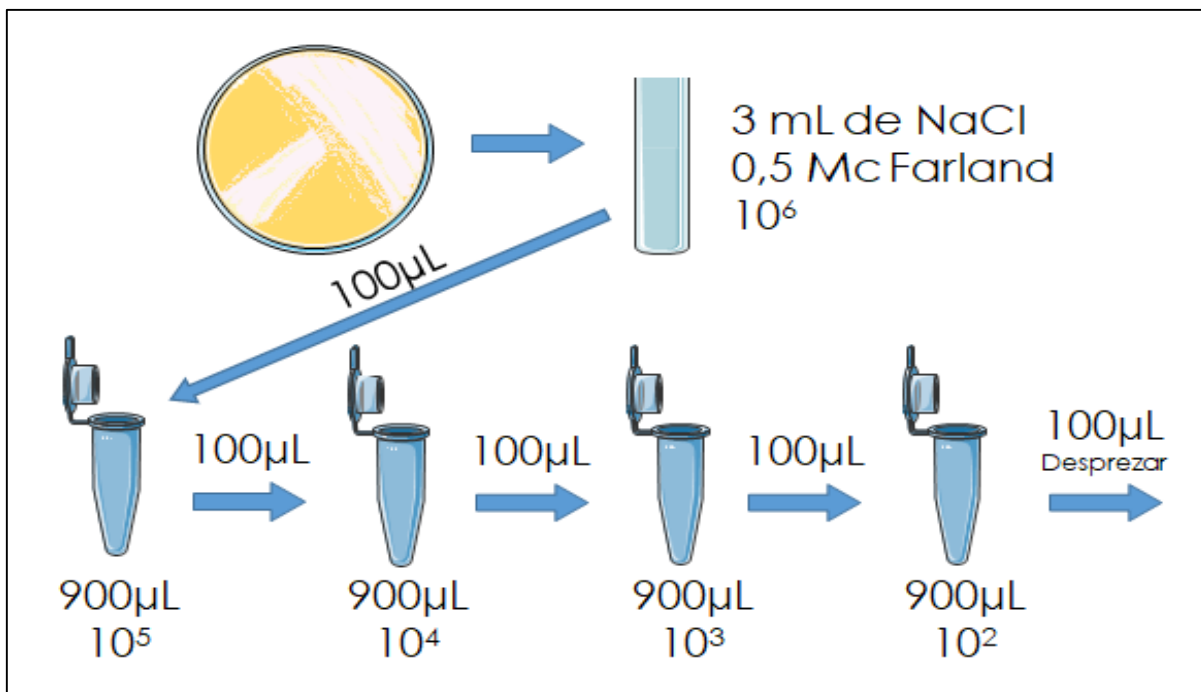


Figura 2 – Diluição dos inóculos de *Candida albicans* e *Candida glabrata*.

Fonte: Adaptado de www.servier.com.br

Foram pipetados 10 µL de cada diluição em seus respectivos sítios na placa previamente identificados e marcados (Figura 3).

Ao final do procedimento, após totalmente seca, a placa foi incubada por 24h em estufa de aerobiose à 35°C para as cepas de *Candida albicans* e 48h para as cepas de *Candida glabrata*.

A leitura foi realizada a olho nu após 24h de incubação para as cepas de *Candida albicans* e 48h para as cepas de *Candida glabrata*. Baseando-se na menor concentração do antifúngico que inibiu 50% do crescimento das leveduras, foi interpretado o MIC de cada amostra. Foram tiradas fotos dos resultados e painéis dos perfis de sensibilidade foram montados a partir das imagens obtidas.

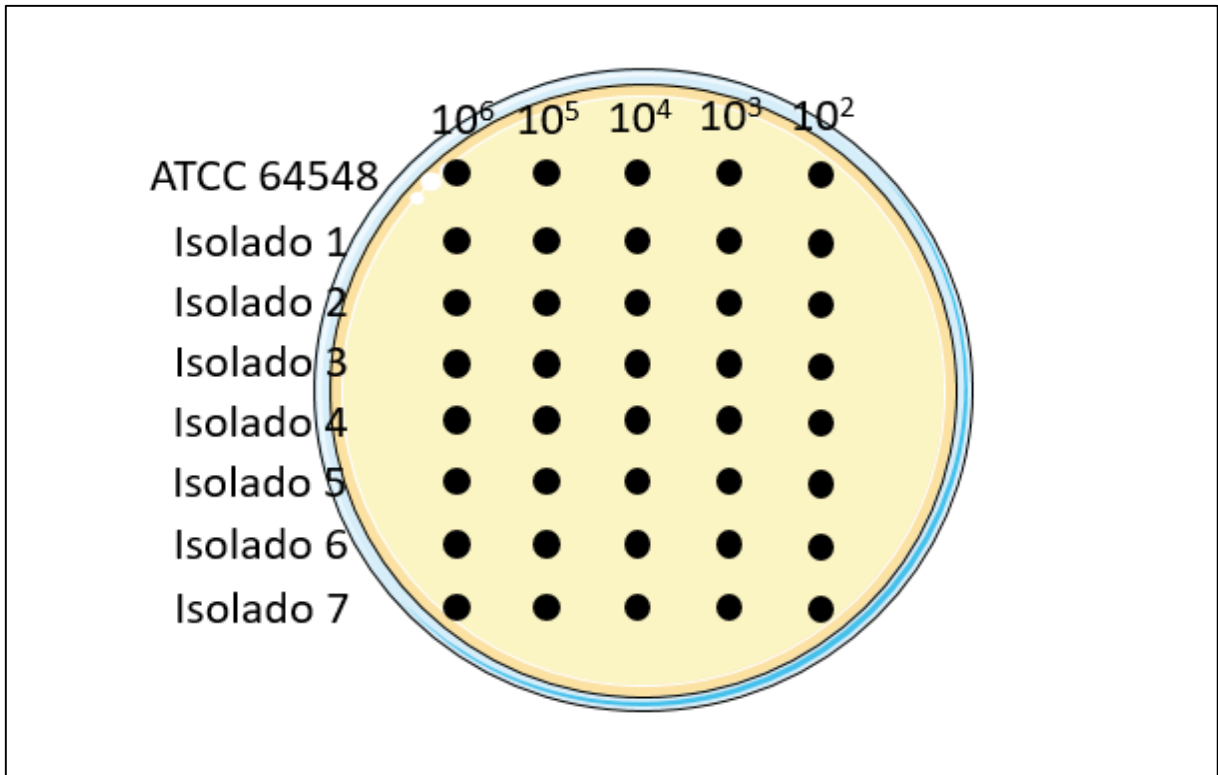


Figura 3 – Placa de Petri-molde utilizada na técnica de “drop-out” contendo os isolados a serem testados e as concentrações de células dos mesmos.

Fonte: Adaptado de www.servier.com.br

A técnica da disco-difusão foi outra metodologia adotada no presente estudo. A partir dela, foi possível observar os padrões de sensibilidade através dos halos formados pelas zonas de inibição expressadas pelos discos de antifúngicos.

Os testes de disco-difusão para fluconazol e micafungina foram realizados segundo o documento M44-A do CLSI, 2004. A suspensão de leveduras (*C. albicans* e *C. glabrata*) foi preparada a partir da dissolução de colônias fúngicas em um tubo contendo 3mL de solução salina (NaCl 0,9%) com o auxílio de um *swab* estéril. A turvação obtida seguiu os padrões da escala 0,5 de McFarland, cuja concentração celular é de 10^6 células/mL, e, novamente, com o auxílio de um *swab* estéril, a suspensão foi espalhada na placa com ágar MH em 4 campos sobrepostos. Finalmente, foram adicionados os discos com as drogas a serem testadas, conforme mostrado na figura 4. Os discos de micafungina foram produzidos através da adição de 25 μ L da droga sobre os discos de papel. Já os discos de fluconazol utilizados foram obtidos do fabricante CECON, como já mencionado anteriormente. A placa foi incubada por 24h a 35°C na estufa de aerobiose.

A determinação dos perfis de sensibilidade, sensível (S), $\geq 19\text{mm}$, resistente (R), $\leq 14\text{mm}$, e intermediário (I), ou sensível dose-dependente (SDD), $15\text{-}18\text{mm}$, ocorre através da medição do tamanho dos halos e a comparação dos valores obtidos com os valores fornecidos pelo fabricante (CECON®, Brasil) dos discos, os quais se baseiam nas normas da CLSI de 2004 sobre disco-difusão.

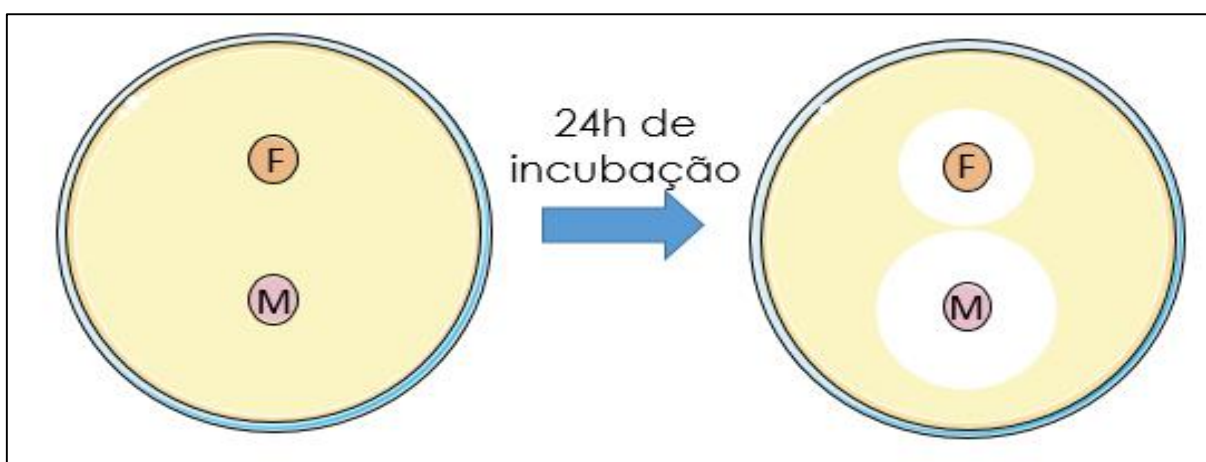


Figura 4 – Esquema da técnica de disco-difusão contendo discos de fluconazol e micafungina.

Fonte: Adaptado de www.servier.com.br

3. RESULTADOS

Os resultados obtidos através dos testes de disco-difusão e “drop-out” mostraram que a micafungina tem alta atividade antifúngica contra *Candida albicans* e *Candida glabrata*, conforme mostrado na tabela 1, uma vez que não houve crescimento. Já na concentração de $0,015\mu\text{g/mL}$ (menor concentração testada), houve crescimento apenas na placa controle. Já frente ao fluconazol, os isolados clínicos de *Candida albicans* apresentaram ampla sensibilidade (100% das cepas) em ambas as técnicas utilizadas, com crescimento restrito entre as concentrações $0,25\mu\text{g/mL}$ e $8\mu\text{g/mL}$ na técnica de “drop-out”. Os isolados clínicos de *Candida glabrata*, por outro lado, apresentaram 96,6% de sensibilidade frente ao antifúngico na técnica de disco-difusão e 100% de sensibilidade na técnica de “drop-out”, havendo crescimento apenas nas concentrações entre $0,125\mu\text{g/mL}$ e $8\mu\text{g/mL}$, como pode ser observado nas figuras 1-10. Todos os resultados foram comparados conforme os documentos M44-A e M27-A3 do CLSI para disco-difusão e microdiluição em caldo, respectivamente. A interpretação dos resultados foi baseada

em 50% de inibição do crescimento em relação ao controle e não por inibição total. A leitura foi realizada entre 24 a 48 horas de incubação.

Foi estabelecida a concentração 10^3 de células fúngicas para leitura do MIC, uma vez que na maior concentração celular (10^6) houve crescimento demasiado, enquanto na menor concentração celular (10^2) o crescimento foi muito escasso para ambas as espécies avaliadas. A concentração adotada para este estudo (10^3), então, apresentou as melhores condições de crescimento para avaliação do MIC.

Figura 1. Crescimento dos isolados clínicos de *C. albicans* frente ao antifúngico fluconazol, submetido ao teste de susceptibilidade em ágar, utilizando a técnica “drop-out”. Foi utilizada como controle positivo a cepa ATCC 64548 em relação aos isolados clínicos.

	Fluconazol																																							
	ATCC 64548					<i>C. albicans</i> 1					<i>C. albicans</i> 2					<i>C. albicans</i> 3					<i>C. albicans</i> 4					<i>C. albicans</i> 5					<i>C. albicans</i> 6					<i>C. albicans</i> 7				
	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²
Controle																																								
0,125µg/mL																																								
0,25µg/mL																																								
0,5µg/mL																																								
1,0µg/mL																																								
2,0µg/mL																																								
4,0µg/mL																																								
8,0µg/mL																																								
16,0µg/mL																																								
32,0µg/mL																																								
64,0µg/mL																																								

Figura 2. Crescimento dos isolados clínicos de *C. albicans* frente ao antifúngico fluconazol, submetido ao teste de susceptibilidade em ágar, utilizando a técnica “drop-out”. Foi utilizada como controle positivo a cepa ATCC 64548 em relação aos isolados clínicos.

	Fluconazol																																							
	ATCC 64548					<i>C. albicans</i> 8					<i>C. albicans</i> 9					<i>C. albicans</i> 10					<i>C. albicans</i> 11					<i>C. albicans</i> 12					<i>C. albicans</i> 13					<i>C. albicans</i> 14				
	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²
Controle																																								
0,125µg/m																																								
0,25µg/mL																																								
0,5µg/mL																																								
1,0µg/mL																																								
2,0µg/mL																																								
4,0µg/mL																																								
8,0µg/mL																																								
16,0µg/mL																																								
32,0µg/mL																																								
64,0µg/mL																																								

Figura 3. Crescimento dos isolados clínicos de *C. albicans* frente ao antifúngico fluconazol, submetido ao teste de susceptibilidade em ágar, utilizando a técnica “drop-out”. Foi utilizada como controle positivo a cepa ATCC 64548 em relação aos isolados clínicos.

	Fluconazol																																							
	ATCC 64548					<i>C. albicans</i> 15					<i>C. albicans</i> 16					<i>C. albicans</i> 17					<i>C. albicans</i> 18					<i>C. albicans</i> 19					<i>C. albicans</i> 20					<i>C. albicans</i> 21				
	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²
Controle																																								
0,125µg/m																																								
0,25µg/mL																																								
0,5µg/mL																																								
1,0µg/mL																																								
2,0µg/mL																																								
4,0µg/mL																																								
8,0µg/mL																																								
16,0µg/mL																																								
32,0µg/mL																																								
64,0µg/mL																																								

Figura 4. Crescimento dos isolados clínicos de *C. albicans* frente ao antifúngico fluconazol, submetido ao teste de susceptibilidade em ágar, utilizando a técnica “drop-out”. Foi utilizada como controle positivo a cepa ATCC 64548 em relação aos isolados clínicos.

	Fluconazol																																							
	ATCC 64548					<i>C.albicans</i> 22					<i>C.albicans</i> 23					<i>C.albicans</i> 24					<i>C.albicans</i> 25					<i>C.albicans</i> 26					<i>C.albicans</i> 27					<i>C.albicans</i> 28				
	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²
Controle																																								
0,125µg/m																																								
0,25µg/mL																																								
0,5µg/mL																																								
1,0µg/mL																																								
2,0µg/mL																																								
4,0µg/mL																																								
8,0µg/mL																																								
16,0µg/mL																																								
32,0µg/mL																																								
64,0µg/mL																																								

Figura 5. Crescimento dos isolados clínicos de *C. albicans* frente ao antifúngico fluconazol, submetido ao teste de susceptibilidade em ágar, utilizando a técnica “drop-out”. Foi utilizada como controle positivo a cepa ATCC 64548 em relação aos isolados clínicos.

	Fluconazol														
	ATCC 64548					<i>C.albicans</i> 29					<i>c.albicans</i> 30				
	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²
Controle	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,125µg/ml	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,25µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,5µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1,0µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2,0µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4,0µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8,0µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16,0µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
32,0µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
64,0µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Figura 6. Crescimento dos isolados clínicos de *C. glabrata* frente ao antifúngico fluconazol, submetido ao teste de susceptibilidade em ágar, utilizando a técnica “drop-out”. Foi utilizada como controle positivo a cepa ATCC 64548 em relação aos isolados clínicos.

	Fluconazol																																							
	ATCC 64548					C. glabrata 1					C. glabrata 2					C. glabrata 3					C. glabrata 4					C. glabrata 5					C. glabrata 6					C. glabrata 7				
	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²
Controle																																								
0,125µg/ml																																								
0,25µg/mL																																								
0,5µg/mL																																								
1,0µg/mL																																								
2,0µg/mL																																								
4,0µg/mL																																								
8,0µg/mL																																								
16,0µg/mL																																								
32,0µg/mL																																								
64,0µg/mL																																								

Figura 7. Crescimento dos isolados clínicos de *C. glabrata* frente ao antifúngico fluconazol, submetido ao teste de susceptibilidade em ágar, utilizando a técnica “drop-out”. Foi utilizada como controle positivo a cepa ATCC 64548 em relação aos isolados clínicos.

	Fluconazol																																							
	ATCC 64548					C.glabrata 8					C.glabrata 9					C.glabrata 10					C.glabrata 11					C.glabrata 12					C.glabrata 13					C.glabrata 14				
	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²
Controle																																								
0,125µg/m																																								
0,25µg/mL																																								
0,5µg/mL																																								
1,0µg/mL																																								
2,0µg/mL																																								
4,0µg/mL																																								
8,0µg/mL																																								
16,0µg/mL																																								
32,0µg/mL																																								
64,0µg/mL																																								

Figura 8. Crescimento dos isolados clínicos de *C. glabrata* frente ao antifúngico fluconazol, submetido ao teste de susceptibilidade em ágar, utilizando a técnica “drop-out”. Foi utilizada como controle positivo a cepa ATCC 64548 em relação aos isolados clínicos.

	Fluconazol																																							
	ATCC 64548					C.glabrata 15					C.glabrata 16					C.glabrata 17					C.glabrata 18					C.glabrata 19					C.glabrata 20					C.glabrata 21				
	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²
Controle																																								
0,125µg/ml																																								
0,25µg/ml																																								
0,5µg/ml																																								
1,0µg/ml																																								
2,0µg/ml																																								
4,0µg/ml																																								
8,0µg/ml																																								
16,0µg/ml																																								
32,0µg/ml																																								
64,0µg/ml																																								

Figura 9. Crescimento dos isolados clínicos de *C. glabrata* frente ao antifúngico fluconazol, submetido ao teste de susceptibilidade em ágar, utilizando a técnica “drop-out”. Foi utilizada como controle positivo a cepa ATCC 64548 em relação aos isolados clínicos.

	Fluconazol																																							
	ATCC 64548					C.glabrata 22					C.glabrata 23					C.glabrata 24					C.glabrata 25					C.glabrata 26					C.glabrata 27					C.glabrata 28				
	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²
Controle	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,125µg/m	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,25µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,5µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1,0µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2,0µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4,0µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8,0µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16,0µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
32,0µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
64,0µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Figura 10. Crescimento dos isolados clínicos de *C. glabrata* frente ao antifúngico fluconazol, submetido ao teste de susceptibilidade em ágar, utilizando a técnica “drop-out”. Foi utilizada como controle positivo a cepa ATCC 64548 em relação aos isolados clínicos.

	Fluconazol														
	ATCC 64548					C.glabrata 29					C.glabrata 30				
	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²
Controle															
0,125µg/m															
0,25µg/mL															
0,5µg/mL															
1,0µg/mL															
2,0µg/mL															
4,0µg/mL															
8,0µg/mL															
16,0µg/mL															
32,0µg/mL															
64,0µg/mL															

Tabela 11. Valores dos halos (mm) e do MIC ($\mu\text{g/mL}$) obtidos nas técnicas de disco-difusão e “drop-out”, respectivamente, frente ao fluconazol e micafungina, e frequência de resistência (R^1 e R^2) dos isolados de *Candida* spp. e da ATCC 64548 de acordo com as metodologias utilizadas.

Espécies (n)	Drogas	Disco-difusão (mm)	R^1 *	MIC – “drop-out” ($\mu\text{g/mL}$)	R^2 **
<i>C. albicans</i> (30)	Fluconazol	20-30	0	0,25-8	0
	Micafungina	26-33	0	<0,015	0
<i>C. glabrata</i> (30)	Fluconazol	10-34	1	0,125-8	0
	Micafungina	28-33	0	<0,015	0
ATCC 64548	Fluconazol	26	0	0,5-1	0
	Micafungina	28	0	<0,015	0

* R^1 : número de isolados resistentes na técnica de disco-difusão.

** R^2 : número de isolados resistentes na técnica de “drop-out”.

As classificações dos testes de sensibilidade às drogas padronizadas pela CLSI, 2004 remetem a características expressas pelos microrganismos frente aos antifúngicos. Quando comparamos os resultados da técnica de disco-difusão à técnica “drop-out”, conforme mostrado nas tabelas 12 e 13, foi possível observar que os isolados clínicos de *Candida albicans* apresentaram sensibilidade às drogas utilizadas em ambas as metodologias. Dentre os isolados clínicos de *Candida glabrata*, por outro lado, um deles apresentou resistência a uma das drogas utilizadas (fluconazol) na técnica de disco-difusão, enquanto apresentou-se sensível à mesma droga na técnica de “drop-out”.

Tabela 12. Correlação entre as classificações de susceptibilidade: Sensível, Sensível Dose-Dependente (DD) e Resistente dos métodos de “drop-out” e disco-difusão para os isolados clínicos de *Candida albicans* de pacientes e a ATCC 64548 frente ao fluconazol e micafungina.

		MIC para “drop-out” - Classificação			
		Sensível	Sensível DD	Resistente	Totais
Disco-difusão Classificação	Sensível	31	0	0	31
	Sensível DD	0	0	0	0
	Resistente	0	0	0	0
	Totais	31	0	0	31

Tabela 13. Correlação entre as classificações de susceptibilidade: Sensível, Sensível Dose-Dependente (DD) e Resistente dos métodos de “drop-out” e disco-difusão para os isolados de *Candida glabrata* de pacientes frente ao fluconazol e micafungina.

		MIC para “drop-out” - Classificação			
		Sensível	Sensível DD	Resistente	Totais
Disco-difusão Classificação	Sensível	29	0	0	29
	Sensível DD	0	0	0	0
	Resistente	1	0	0	1
	Totais	30	0	0	30

4. DISCUSSÃO

Pacientes imunocomprometidos, bem como os portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV), são comumente colonizados e/ou infectados por microrganismos como os fungos, principalmente *Candida* spp. O tratamento utilizado no combate da infecção por esses agentes consiste, principalmente, na administração de fluconazol por um longo período. Exposições prolongadas aos azólicos, bem como o fluconazol, podem selecionar cepas que possuem sensibilidade diminuída, fazendo com que seja necessário aumentar a dose, ou até mesmo alterar a droga utilizada (BARRY *et al.*, 2002, FAN-HARVARD *et al.*, 1991, KORTING *et al.*, 1998). Deste modo, deve haver um monitoramento dessas cepas, observando o perfil de sensibilidade às drogas apresentado pelas mesmas. Os testes de sensibilidade aos antifúngicos são procedimentos que avaliam as características dos agentes infecciosos frente às drogas de interesse.

Os resultados de sensibilidade ao fluconazol e à micafungina apresentados pelas duas espécies de leveduras avaliadas no presente estudo mostraram susceptibilidade de 98,3% dentre todos os isolados clínicos testados, incluindo as amostras de *C.glabrata* com sensibilidade dose-dependente. Um isolado de *Candida glabrata*, somente, apresentou características de resistência em uma das técnicas testadas, reiterando as afirmações de Melhem *et al.* (2013) que sugerem resistência adquirida ao fluconazol e outros azólicos por *Candida glabrata*.

Segundo o estudo realizado por Pedroso *et al.* (2014), foram analisados 63 isolados clínicos de leveduras obtidos de sangue, líquido abdominal e ponta de cateter venoso central, que incluíram as espécies de *Candida albicans*, *Candida glabrata*, entre outras. A determinação da sensibilidade aos antifúngicos foi feita pelas técnicas de disco-difusão em ágar e microdiluição em caldo, frente ao fluconazol, itraconazol e anfotericina B. Para a técnica de disco-difusão, os autores utilizaram o documento M44-A2 de 2009 do CLSI e, para a técnica de microdiluição em caldo, foi utilizado o documento M27-A3 de 2008, também do CLSI. Os resultados obtidos pelos autores mostraram 100% de sensibilidade ao fluconazol tanto em *Candida albicans* quanto em *Candida glabrata*, em ambas as técnicas.

Ramírez *et al.* (2006) conduziram experimentos para comparar os métodos de disco-difusão e microdiluição de *Candida* spp. frente à micafungina. Foram utilizados 355 isolados clínicos, sendo 270 *Candida albicans*, 45 *Candida glabrata*, 24 *Candida krusei*, 11 *Candida tropicalis* e 5 *Candida parapsilosis*. Tais isolados foram obtidos de cavidades orais de pacientes infectados pelo vírus HIV e que frequentam o Hospital Universitário de Valme, em Sevilha, Espanha. Para a técnica de microdiluição, foi utilizado o documento M27-A2 do CLSI de 2002. A técnica de disco-difusão utilizada no estudo foi realizada referente ao documento M44-A do CLSI de 2004. Ambos os resultados foram de sensibilidade frente à micafungina por *Candida albicans* e *Candida glabrata* através das técnicas de microdiluição em caldo e disco-difusão.

Segundo Neufeld (2009), os 113 isolados clínicos de pacientes hospitalizados no estado do Rio de Janeiro foram testados segundo a metodologia de microdiluição em caldo do CLSI e EUCAST. Dentre eles, 47 isolados são de *C. albicans* e 2 de *C. glabrata*. Baseado no antifúngico de interesse testado, o fluconazol, 110 isolados apresentaram sensibilidade, 2 se mostraram sensíveis dose-dependente e um resistente. Levando em consideração o resultado dos isolados de interesse (*C. albicans* e *C. glabrata*), ambos obtiveram 100% de sensibilidade ao fluconazol de acordo com a metodologia do CLSI.

Demitto *et al.* (2012) avaliaram o perfil de suscetibilidade aos antifúngicos de espécies de *Candida* spp. de pacientes internados no Hospital Universitário Regional de Maringá-PR (HURM). Foram analisados 91 isolados, sendo 38 de *C. albicans* e

16 de *C. glabrata*, utilizando a técnica de microdiluição em caldo (M27-A3) e disco difusão (M44-A2), ambas frente ao fluconazol. Os resultados obtidos pelos autores foram: *C. glabrata* sensível pela técnica de microdiluição em caldo, 97,4% sensível e 2,6% resistente através da técnica de disco difusão. Para *C. albicans* foi observada 100% de sensibilidade em ambas as técnicas.

Pfaller *et al.* (2008) realizaram MIC com espécies de *Candida* spp. utilizando a classe das equinocandinas como antifúngicos, dentre elas a micafungina. O resultado foi interpretado de acordo com o CLSI M23-A2. Foram utilizadas em seu experimento 2.869 *C. albicans* e 747 *C. glabrata*, com os valores do MIC de 0,03 µg/mL e 0,015 µg/mL, respectivamente, as quais foram consideradas todas sensíveis à micafungina.

Referente à técnica de “drop-out”, não encontramos estudos publicados sobre sua utilização na estimativa do MIC.

5. CONCLUSÃO

Devido às comparações realizadas entre o presente estudo e trabalhos publicados referentes às técnicas de microdiluição em caldo e disco-difusão, foi possível concluir que os isolados de *Candida albicans*, em geral, são sensíveis ao fluconazol e à micafungina, da mesma forma que os isolados de *Candida glabrata* foram sensíveis à micafungina. Esses últimos, frente ao fluconazol, já apresentaram alguma resistência quando comparados aos isolados de *Candida albicans*. Houve semelhança de sensibilidade entre os resultados desse estudo e o de outros autores. A técnica “drop-out” é útil tanto para estimar o MIC, bem como para avaliar a densidade de leveduras mais apropriada para tal estimativa.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BADIEE P, HASHEMIZADEH Z. 2014. Opportunistic invasive fungal infections: diagnosis & clinical management. **Indian Journal of Medical Research**. 139: 195-204.

BARRY AL, PFALLER MA, RENNIE RP, FUCHS PC, BROWN SD. Precision and accuracy of fluconazole susceptibility testing by broth microdilution, Etest, and disk diffusion methods. **Antimicrob. Agents and Chemother**. 2002.

BAUER AW, KIRBY WMM, SHERRIS JC, TURCK M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am. J. Clin. Pathol**. 45:493-496.

BROWN, G.D., DENNING, D.W., GOW, N.A.R., LEVITZ, S.M., NETEA, M.G., WHITE, T.C. (2012). Hidden killers: human fungal infections. **Sci. Transl. Med**. 4, 165rv13.

CARRETÉ L, KSIEZOPOLSKA E, PEGUEROLES C, MOLERO EG, SAUS E, GUZMÁN SI, LOSKA D, BADER O, FAIRHEAD C, GABALDÓN T. 2017. Patterns of genomic variation in the opportunistic pathogen *Candida glabrata* suggest the existence of mating and a secondary association with humans. **Current Biology**. 2017.

CHEN Y, MALLICK J, MAQNAS A, SUN Y, CHOUDHURY BI, COTE P, YAN L, NI TJH, LI Y, ZHANG D, ORTIZ RR, LV QZ, JIANG YY, WHITEWAY M. Chemogenomic profiling of the fungal pathogen *Candida albicans*. **Antimicrob. Agents Chemother**. doi:10.1128/AAC.02365-17. 2017.

CLINICAL and Laboratory Standards Institute (CLSI). Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Guideline. NCCLS document M44-A [ISBN 1-56238-532-1]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2004.

COELLO R, CHARLETT A, WARD V, *et al*. Device-related sources of bacteraemia in English hospitals-opportunities for the prevention of hospital acquired bacteraemia. **J Hosp Infect** 2003; 53: 46-57.

COLOMBO AL, NUCCI M, PARK BJ, NOUER AS, ARTHINGTON-SKAGGS B, MATTA DA, WARNOCK D, MORGAN J, Brazilian Network Candidemia Study. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **Journal of Clinical Microbiology** 44: 2816-2823, 2006.

COLOMBO AL. Epidemiology and treatment of hematogenous candidiasis: a Brazilian prospective. **Brazilian Journal Infectious Diseases** 4: 113-118, 2000.

DEMITTO, Fernanda de Oliveira et al. Susceptibilidade a antifúngicos in vitro de *Candida* spp. em pacientes do hospital universitário regional de Maringá-PR. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 48, n. 5, p.315-321, out. 2012.

DIEKEMA, D., ARBEFEVILLE, S., BOYKEN, L., KROEGER, J., AND PFALLER, M. (2012). The changing epidemiology of healthcare-associated candidemia over three decades. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 73, 45–48.

EDMOND MB, WALLACE SE, MCCLISH DK, PFALLER MA, JONES RN, WENZEL RP. Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three year analysis. *Clin Infect Dis* 1999; 29: 239-44.

FAN-HARVARD P, CAPANO D, SMITH SM, MANGIA A, ENG RHK. 1991. Development of resistance in *Candida* isolates from patients receiving prolonged antifungal therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35:2302–2305.

GÜLTEKIN B, EYIGÖR M, TIRYAKI Y, KIRDAR S, AYDIN N. Kan kültürlerinden izole edilen *Candida* suşlarında antifungal duyarlılığın ve bazı virülans faktörlerinin araştırılması ve RAPD-PCR ile genotiplendirilmesi. *Mikrobiyol Bul* 2011; 45: 306-17.

HINRICHSEN SL, FALCÃO E, VILELLA TAS, COLOMBO AL, NUCCI M, MOURA L, RÊGO L, LIRA C, ALMEIDA L. Candidemia em hospital terciário do nordeste do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 41(4):394-398, 2008.

KORTING HC, OLLERT M, GEORGII A, FROSCHL M. 1988. In vitro susceptibility and biotypes of *Candida albicans* isolates from the oral cavities of patients infected with human immunodeficiency virus. **J. Clin. Microbiol.** 26:2626–2631.

LOZANO CM, NELSON PW, PAETZNICK VL, REX JH. Disk diffusion method for determining susceptibilities of *Candida* spp. to MK-0991. **J Clin Microbiol.** May;37(5):1625-7. 1999.

MELHEM MSC, BERTOLETTI A, LUCCA HRL, SILVA RBO, MENEGHIN FA, SZESZS MW. Use of the VITEK 2 system to identify and test the antifungal susceptibility of clinically relevant yeast species. **Brazilian Journal of Microbiology** 44, 4, 1257-1266. 2013.

MODRZEWSKA BD, KURNATOWSKA AJ, KHALID K. Drug susceptibility of fungi isolated from ICU patients. **Annals of Parasitology** 2017, 63(3), 189–198.

NEUFELD, Paulo Murillo. **Caracterização taxonômica e Susceptibilidade a Antifúngicos de Leveduras Isoladas de Infecção Hospitalar.** 2009. 256 f. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2009.

PAPPAS PG, KAUFFMAN CA, ANDES D, BENJAMIN JR DK, CALANDRA TF, EDWARDS JR JE, FILLER SG, FISHER JF, KULLBERG BJ, OSTROSKY ZL, REBOLI AC, REX JH, WALSH TJ, SOBEL JD. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.*, 48: 503-535, 2009.

PAPPAS PG, KAUFFMAN CA, ANDES DR, CLANCY CJ, MARR KA, ZEICHNER LO, REBOLI AC, SCHUSTER MG, VAZQUEZ JA, WALSH TJ, ZAOUTIS TE, SOBEL JD. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. Clin. Infect. Dis. 2016;62:el-50.

PFALLER, M. A. et al. Correlation of MIC with Outcome for Candida Species Tested against Caspofungin, Anidulafungin, and Micafungin: Analysis and Proposal for Interpretive MIC Breakpoints. **Journal Of Clinical Microbiology**, [s.l.], v. 46, n. 8, p.2620-2629, 25 jun. 2008. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.00566-08>.

REX JH, SOBEL JD. Prophylactic antifungal therapy in the intensive care unit. Clinical Infectious Diseases 32: 1191-1200, 2001.

RODRIGUEZ-TUDELA JL, DONNELLY JP, ARENDRUP MC, ARIKAN S, BARCHIESI F, BILLE J, CHRYSSANTHOU E, CUENCA-ESTRELLA M, DANNAOUI E, DENNING D, FEGELER W, GAUSTAD P, LASS-FLORL C, MOORE C, RICHARDSON M, SCHMALRECK A, VELEGRAKI A, VERWEIJ P. 2008 EUCAST technical note on the method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia-forming moulds. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Clin Microbiol Infect 14:982-984.

ROEMER T, KRYSAN DJ. 2014. Antifungal drug development: challenges, unmet clinical needs, and new approaches. Cold Spring Harb Perspect Med 4.

SAIMAN L, LUDINGTON E, PFALLER M, et al. Risk factors for candidemia in Neonatal Intensive Care Unit patients. The National Epidemiology of Mycosis Survey study group. Pediatr Infect Dis J 2000; 19: 319-24.

SCHMIDT S, TRAMSEN L, LEHRNBECHER T. (2017). Natural killer cells in antifungal immunity. Front. Immunol. 8:1623. doi: 10.3389/fimmu.2017.01623.

SÜTÇÜ M, ACAR M, ERKÖSE GENÇ G, KÖKÇÜ İ, AKTÜRK H, ATAY G, HANÇERLİ TÖRUN S, SALMAN N, ERTURAN Z, SOMER A. (2017). Evaluation of *Candida* species and antifungal susceptibilities among children with invasive candidiasis. Turk Pediatri Ars 2017; 52: 145-53.

TRAGIANNIDIS A, TSOULAS C, KERL K, GROLL AH. Invasive candidiasis: update on current pharmacotherapy options and future perspectives. Expert Opin Pharmacother 2013; 14: 1515-28.

VALLABHANENI S, SAPIANO M, WEINER LM, LOCKHART SR, MAGILL S. Antifungal susceptibility testing practices at acute care hospitals enrolled in the national healthcare safety network, United States, 2011-2015. Infectious Diseases Society of America. 2017.

VARMA A, SHARMA A. 2017. Modern Tools and Techniques to Understand Microbes. Cham: Springer International Publishing.

XIE JL, POLVI EJ, SHEKHAR-GUTURJA T, COWEN LE. 2014. Elucidating drug resistance in human fungal pathogens. *Future Microbiol* 9:523-42.