



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**INFLUÊNCIA DE MODIFICAÇÕES NA TÉCNICA DE
MICRODILUIÇÃO EM CALDO (CLSI, PROTOCOLO M27-A3) NA
DETERMINAÇÃO DE SENSIBILIDADE DE LEVEDURAS AO FLUCONAZOL**

EDINAIRA SULANY OLIVEIRA DE SOUSA

**MANAUS
2019**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

EDINAIRA SULANY OLIVEIRA DE SOUSA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr^o. João Vicente Braga de Souza

Co-orientadora: Prof^a. Dr.^a Ana Cláudia Alves Cortez

**MANAUS
2019**

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S725i Sousa, Edinaira Sulany Oliveira de
Influência de modificações na técnica de microdiluição em caldo (CLSI, protocolo M27-A3) na determinação da sensibilidade de leveduras ao fluconazol / Edinaira Sulany Oliveira de Sousa. 2019 69 f.: il.; 31 cm.

Orientador: João Vicente Braga de Souza
Coorientadora: Ana Cláudia Alves Cortez
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. suscetibilidade. 2. leveduras. 3. microdiluição. 4. protocolo. 5. fluconazol. I. Souza, João Vicente Braga de II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

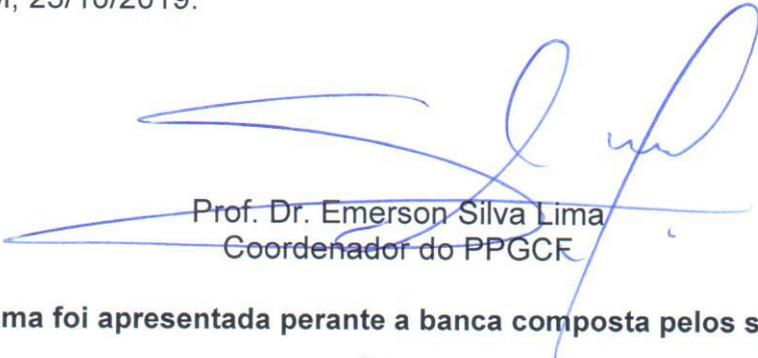
“Influência de modificações na técnica de microdiluição em caldo (CLSI, protocolo M27-A3) na determinação de sensibilidade de leveduras ao fluconazol”

DISCENTE: EDINAIRA SULANY OLIVEIRA DE SOUSA

PARECER:

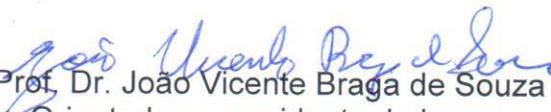
Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas em sua forma final e definitiva pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas.

Manaus, AM, 23/10/2019.



Prof. Dr. Emerson Silva Lima
Coordenador do PPGCF

A mesma foi apresentada perante a banca composta pelos seguintes professores:



Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza
Orientador e presidente da banca



Dra. Kátia Santana Cruz
Membro externo (FMT-HVD)



Profa. Dra. Ariane Mendonça Kluczkovisk
Membro interno (UFAM)

Dedico este trabalho com todo amor ao meu pai Edielson Mendes (*in memoriam*) e à minha “mãezoka”, Débora Gaia. Obrigada pela compreensão da minha ausência, mãe.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Espírito Santo de Deus, por ter me concedido inteligência e sabedoria para a realização desse trabalho.

Ao meu orientador professor Dr^o João Vicente Braga de Souza e à minha co-orientadora, Dr^a Ana Cláudia Alves Cortez pela oportunidade concedida e por todos os conselhos, orientações e paciência. Expresso meus sentimentos de alegria e gratidão pela confiança em mim depositada.

À Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) por proporcionarem minha formação.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), mais especificamente ao Laboratório de Micologia, pelo espaço físico concedido para o desenvolvimento do presente trabalho.

Às examinadoras deste trabalho: Dr^a Ariane Mendonça Kluczkovski e Dr^a Kátia Santana Cruz por toda colaboração e críticas.

A todos os “Micomaníacos” por me receberem tão bem.

Ao meu marido por ter tolerado meus humores e por ter sido tão paciente nessa caminhada. Obrigada!

RESUMO

Uma das principais críticas à metodologia de estudo da atividade antifúngica padronizada pela Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) – protocolo M27-A3 é o custo do meio de crescimento RPMI-1640 e do tampão MOPS (ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico). Devido à essas limitações, o presente trabalho teve como objetivo investigar a influência de modificações na técnica de microdiluição em caldo (CLSI, protocolo M27-A3) na determinação de sensibilidade de leveduras ao fluconazol. Para avaliar esse objetivo foram realizados ensaios univariados modificando o ensaio preconizado pela CLSI protocolo M27-A3. Leveduras utilizadas nos ensaios pertenceram aos gêneros *Candida* e *Cryptococcus*. As modificações feitas no protocolo M27-A3 foram: a) mudança de meio de cultura (cinco meios foram avaliados: o meio YNB e quatro diferentes variações da composição de Sabouraud); b) tipo de tampão (bicarbonato de sódio, tris-HCL e fosfato), concentração do inóculo (10^2 , 10^4 , 10^5 células/mL), tempo de incubação (24 e 48 h) e forma de leitura (visual, corante e espectrofotômetro) na concentração inibitória mínima das leveduras frente ao fluconazol. Os diferentes meios de cultivo avaliados (exceto o meio dextrose 2% e peptona de caseína 1%) resultaram em resultados similares de CIM aos ensaios realizados com o meio padrão RPMI. Os ensaios com tampão Tris-HCl resultaram em resultados similares de CIM aos ensaios realizados com o tampão padrão MOPS. A concentração de 1×10^3 células/mL foi a única concentração testada que resultou em resultados similares ao protocolo padrão. Somente o tempo incubação do ensaio 24hs demonstrou ser adequado para o gênero *Candida*. A leitura visual direta, visual com uso de corante biológico (resazurina) e por espectrofotometria apresentaram resultados semelhantes. A partir do conhecimento obtido nos experimentos univariados um novo protocolo foi proposto: a) meio de cultivo: dextrose 5 g/L e peptona de soja 10 g/L; b) tampão: Tris-HCL; c) inóculo de 0,5-2,5 $\times 10^3$, d) ensaio de 24 h para *Candida* spp e 48hs para *Cryptococcus neoformans* e e) leitura visual direta. A análise de variância demonstrou 95% de regressão comparando-se os resultados da CIM de 19 leveduras submetidas ao antifungigrama pelo protocolo da CLSI e o proposto no presente estudo. Esses resultados são importantes e robustos e apresentam uma opção mais acessível para a realização dos ensaios de antifungigrama. No entanto, se faz necessário um estudo multicêntrico, com um número maior de microorganismos, para avaliar o efeito do meio nas variações intra e interlaboratoriais nas CIM de fluconazol para as leveduras.

Palavras-chave: suscetibilidade, leveduras, microdiluição

ABSTRACT

One of the main criticisms of the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) standard protocol for studying antifungal activity - protocol M27-A3 is the cost of the RPMI-1640 growth medium and the MOPS (3- (N-morpholino) propanesulfonic acid) buffer. Due to these limitations, the present study aimed to investigate the influence of modifications in the broth microdilution technique (CLSI, protocol M27-A3) on the determination of fluconazole yeast sensitivity. To evaluate this objective univariate assays were performed modifying the test recommended by CLSI protocol M27-A3. Yeasts used in the trials belonged to *Candida* and *Cryptococcus* genera. The modifications made to the M27-A3 protocol were: a) culture media change (five media were evaluated: YNB medium and four different Sabouraud composition variations); b) buffer type (sodium bicarbonate, tris-HCL and phosphate), inoculum concentration (10^2 , 10^4 , 10^5 cells / mL), incubation time (24 and 48 h) and reading form (visual, dye and spectrophotometer) in the MIC of yeast in front of fluconazole. The different culture media evaluated (except 2% dextrose medium and 1% casein peptone) resulted in similar MIC results to assays performed with standard RPMI medium. Tris-HCl buffer assays resulted in similar MIC results to those performed with standard MOPS buffer. The concentration of 1×10^3 cells / mL was the only concentration tested that resulted in results similar to the standard protocol. Only the incubation time of the 24hs trial proved to be suitable for the *Candida* genus. Direct visual reading, visual dye use (resazurin) and spectrophotometry showed similar results. From the knowledge obtained in the univariate experiments a new protocol was proposed: a) culture medium: dextrose 5 g / L and soybean peptone 10 g / L; b) buffer: Tris-HCL; c) $0.5-2.5 \times 10^3$ inoculum, d) 24 hr assay for *Candida* spp and 48h for *Cryptococcus neoformans* and e) direct visual reading. The analysis of variance showed 95% regression comparing the MIC results of 19 yeasts submitted to antifungigram by CLSI protocol and the one proposed in the present study. These results are important and robust and present a more affordable option for antifungigram assays. However, a multicenter study with a larger number of microorganisms is needed to evaluate the effect of the medium on intra and interlaboratory variations in fluconazole MICs for yeast.

Keywords: susceptibility, yeast, microdilution

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Normas desenvolvidas pelo CLSI para determinação da suscetibilidade de leveduras a diversos antifúngicos.....	21
Figura 2 - Fluxograma das atividades realizadas no projeto.	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estudos que contribuíram para elaboração da norma M27-P.	20
Tabela 2 - Efeito do meio de crescimento na CIM de quatro isolados de <i>Candida</i> spp.	51
Tabela 3 - Efeito do sistema tampão na CIM de quatro isolados de <i>Candida</i> spp...52	
Tabela 4 - Efeito do tamanho do inóculo na CIM de quatro isolados de <i>Candida</i> spp.	53
Tabela 5 - Efeito do tempo de incubação na CIM de quatro isolados de <i>Candida</i> spp.	53
Tabela 6 - Comparação de três formas de leitura na determinação da CIM de fluconazol contra cepas de <i>Candida</i> spp.....	54
Tabela 7 - Metodologia CLSI versus metodologia para laboratórios com recursos limitados para testes de suscetibilidade antifúngica.	55
Tabela 8 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) in vitro de fluconazol, frente a 19 leveduras, utilizando meio RPMI-1640 tamponado com MOPS e meio Sabouraud dextrose tamponado com tris-HCL.....	56

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

% - Por Cento

°C - Grau(s) Celsius

® - Marca registrada

µg - microgramas

µL - microlitros

5-FC - 5-Fluorocitosina

ANF-L - Anfotericina B lipídica

ATCC - American Type Culture Collection

CIM – Concentração inibitória mínima

CLSI - Clinical Laboratory Standards Institute

DMSO - Dimetilsulfóxido

FCZ - Fluconazol

EUCAST - European for Committee Antimicrobial Susceptibility Testing

EUA - Estados Unidos

HEPES - ácido 4- (2-hidroxietil) 1-piperazino-etanossulfônico

MOPS - ácido 3-N-morfolinopropanossulfônico

NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards

RPMI – Meio Roswell Park Memorial Institute

Tris - tris (hidroximetil) aminometano

UFC - Unidades Formadoras de Colônia

YNB – Meio Yeast Nitrogen Base

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	11
2.REVISÃO DA LITERATURA	13
3.OBJETIVOS	39
3.1 Geral	39
3.2 Específicos	39
4.MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1 Delineamento experimental	40
4.2 Agente antifúngico	41
4.3 Micro-organismos.....	41
4.4 Teste de microdiluição em caldo	41
4.5 Procedimento experimental.....	42
4.5.1 Meio de crescimento.....	42
4.5.2 Solução Tampão	43
4.5.3 Concentração do inóculo.....	43
4.5.4 Tempo de incubação.....	43
4.5.5 Forma de leitura do ponto final	44
4.6 Análise dos resultados	44
5.RESULTADOS	45
6.CONCLUSÃO	61
7.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas invasivas frequentemente estão associadas a morbidade e mortalidade significativas, porque essas infecções são difíceis de diagnosticar e tratar (ALBATAINEH *et al.*, 2016). Devido ao aumento dessas infecções e à emergência de fungos resistentes a medicamentos, métodos de diagnósticos foram desenvolvidos a fim de investigar a suscetibilidade antifúngica e padronizar a metodologia a ser utilizada (PAREDES, 2009).

Atualmente, o Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), dos Estados Unidos, permite estimar a concentração inibitória mínima (CIM) das principais espécies de leveduras oportunistas através da norma M27-A3. A diretriz atual recomenda testar a suscetibilidade das leveduras, incluindo as espécies de *Candida* e *Cryptococcus neoformans*, usando um método de microdiluição em placa, na qual suspensões de colônias são inoculadas em caldo RPMI-1640, tamponado a pH 7,0 com MOPS (ácido 3-N-morfolinopropanossulfônico), contendo diluições crescentes dos agentes antifúngicos, incubando a 35 ° C durante 72 horas, para *Cryptococcus neoformans*, ou 24/48 horas para as espécies de *Candida* e visualmente determinar a CIM contra um poço controle de crescimento livre de antifúngicos (CLSI, 2008).

O teste de suscetibilidade antifúngica é, portanto, um meio de fornecer uma estimativa da potência *in vitro* de um agente contra um patógeno de interesse, e os resultados podem então ser correlacionados com a atividade *in vivo* observada em estudos clínicos ou modelos animais de infecção (ALBATAINEH *et al.*, 2016). Logo, a CIM determinará se o fungo é suscetível, dose-dependente ou resistente e pode então nortear a escolha do agente terapêutico mais adequado e/ou predizer a chance de sucesso do esquema terapêutico (HAZEN, 2013), tornando-se uma ferramenta essencial para orientar o tratamento de doenças fúngicas.

Apesar do teste de microdiluição, protocolo M27-A3 do CLSI, ser considerado a norma padrão amplamente aceita na determinação da suscetibilidade (JOHNSON, 2008), em laboratórios de pesquisas e de rotina a situação é diferente e, até mesmo questionada por alguns autores, visto que, devido ao alto custo para aquisição do meio de crescimento RPMI-1640 e do tampão MOPS utilizados no teste antifúngico, o método torna-se inviável financeiramente e frequentemente de difícil execução.

Além disso, com o intuito de melhorar a interpretação dos valores de CIM, algumas modificações do método de referência já foram propostas na literatura, tais como, tempo e temperatura de incubação, tamanho do inóculo, composição e pH do meio teste, suplementação do meio com glicose, agitação das placas, modificação do meio padrão e determinação do ponto final (GHANNOUM *et al.*, 1992; RODRIGUEZ; MARTINEZ, 1994; GADEA *et al.*, 1997; RODRÍGUEZ-TUDELA *et al.*, 2000; RAMBALI *et al.*, 2001; CÓRDOBA; AFELTRA; VITALE, 2011; VITALE; PASCUCCELLI; AFELTRA, 2012; CRUZ *et al.*, 2013; DIAS; BARBUGLI; VERGANI, 2016; HAZEN, 2013).

Sendo assim, o presente trabalho propõe comparar os resultados da concentração inibitória mínima (CIM) de fluconazol frente a leveduras patogênicas, obtidos pelo método referência (protocolo M27-A3), com os resultados obtidos por modificações alternativas deste protocolo no que diz respeito ao: meio de crescimento, solução tampão do meio de cultura, tamanho do inóculo, tempo de incubação e forma de leitura do ponto final da reação e encontrar modificações vantajosas que tornem o teste de suscetibilidade a antifúngicos economicamente viável, sem interferir sobretudo na leitura da concentração inibitória mínima (CIM).

1. REVISÃO DA LITERATURA

A revisão da literatura será apresentada no formato de artigo científico e será submetida à revista Brazilian Journal of Microbiology.

Influência de diferentes condições no teste de suscetibilidade a antifúngicos: uma revisão da norma M27-A3 do Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI)

Edinaira Sulany Oliveira de Sousa¹; Ana Cláudia Alves Cortez²; João Vicente Braga de Sousa²; Marcia de Souza Carvalho Melhem³

1. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal do Amazonas – UFAM. Amazonas, Brazil
2. Departamento de Microbiologia Médica, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia – INPA. Av. André Araújo, Amazonas, Brasil
3. Departamento de Micologia, Instituto Adolfo Lutz. Av. Dr. Arnaldo, São Paulo, Brazil

RESUMO

Devido ao aumento das infecções e à emergência de fungos resistentes a medicamentos, métodos de diagnósticos foram desenvolvidos a fim de investigar a suscetibilidade antifúngica e padronizar a metodologia a ser utilizada. Atualmente, o Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), dos Estados Unidos, permite estimar a concentração inibitória mínima das principais espécies de leveduras oportunistas através da norma M27-A3, utilizando o teste de microdiluição em caldo. Apesar de ser considerada a norma de referência de modo a ter resultados reprodutíveis e acurados, aumentar a capacidade de ensaio e limitar o viés humano, o método é frequentemente inacessível a laboratórios clínicos de rotina e pesquisas, sobretudo em países de baixa renda. Além disso, diversos trabalhos na literatura demonstram que ainda há um grande número de fatores que precisam ser considerados ao tentar avaliar a atividade *in vitro* dos agentes antifúngicos. Neste artigo de revisão são apresentadas informações a respeito das limitações da norma M27-A3 que, apesar dos avanços e melhorias obtidas com a padronização dos métodos de antifungograma pelo CLSI, ainda persistem.

Palavras-chave: CLSI, leveduras, microdiluição, suscetibilidade, antifúngicos

1. Introdução

As infecções fúngicas invasivas, frequentemente, estão associadas à morbidade e mortalidade significativas porque são difíceis de diagnosticar e tratar [1]. Apesar dos mais recentes desenvolvimentos de ferramentas de diagnóstico e opções terapêuticas, as infecções fúngicas têm sido uma das principais causas da alta taxa de morbidade e mortalidade humana, sendo os gêneros de *Candida*, *Cryptococcus* e *Aspergillus* os principais agentes etiológicos dessas infecções, afetando principalmente indivíduos imunocomprometidos [2,3]. Nestes pacientes, as micoses geralmente se comportam como infecções oportunistas, causando doença disseminada e fatal [4].

Devido ao aumento dessas infecções e à emergência de fungos resistentes a medicamentos, métodos de diagnósticos foram desenvolvidos a fim de investigar a suscetibilidade antifúngica e padronizar metodologias [5]. Atualmente, a norma M27-A3 do instituto norte americano Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) permite estimar a concentração inibitória mínima (CIM) dos principais antifúngicos frente às distintas espécies de *Candida* e *Cryptococcus neoformans*. O protocolo recomenda o método de microdiluição em placa, na qual suspensões de colônias, em caldo RPMI-1640, tamponado a pH 7,0 com MOPS (ácido 3- (N-morfolino) propanosulfônico), são adicionadas sobre 10 concentrações de cada antifúngico. Segue-se incubação a 35° C durante 72 h, para *Cryptococcus neoformans*, ou 24 a 48 h para as espécies de *Candida* para determinação a olho nú da CIM, tendo como controle o crescimento do inóculo isento de antifúngicos [6].

Apesar de ser considerada a norma de referência para determinação da suscetibilidade antifúngica, há propostas de modificações do ensaio, sobretudo no que diz respeito ao (i) meio de crescimento, (ii) solução tampão do meio de cultura, (iii) concentração do inóculo, (iv) tempo de incubação e (v) forma de leitura do ponto final de reação (eucast). Além disso, com o intuito de melhorar o método, há sugestões de alterações no protocolo [7–11] e propostas de um ensaio de microdiluição que possa ser implementado em ambientes com recursos limitados [12]. Nesta revisão, as limitações da norma M27-A3 são apresentadas e discutidas.

2. Resistência a antifúngicos

Comparados ao número e classes de medicamentos antibacterianos, os antifúngicos apresentam grande descompasso e a explicação para isso é o desenvolvimento lento de novos fármacos antifúngicos [3]. Um exemplo disso é o fato de que até a década de 70, apenas anfotericina B e 5-fluorocitosina encontravam-se disponíveis para a terapêutica de micoses sistêmicas [13–15].

A partir da década de 80, alguns fatores como aumento das fungemias por leveduras, uso de procedimentos cirúrgicos invasivos, incremento nos métodos diagnósticos, surgimento de aids e, também, pelo fato dos antifúngicos até então disponíveis no mercado não atenderem à necessidade médica, a busca por novos fármacos foi intensificada, resultando na descoberta de novos medicamentos para o tratamento das infecções fúngicas, incluindo azóis (1980) e equinocandinas (2000). Entretanto, desde então não houve nenhuma outra nova classe de agentes antifúngicos desenvolvida [13].

Outros fármacos azóis de nova geração para uso no tratamento de infecções fúngicas estão sendo avaliados, e a busca por novos fármacos, com novos mecanismos de ação, os quais podem evitar as toxicidades e interações medicamentosas associadas aos antifúngicos disponíveis, também estão em desenvolvimento, clínico ou pré-clínico, para o tratamento de infecções fúngicas invasivas [16].

É certo que a disponibilidade de novos antifúngicos nos últimos anos proporcionou aos clínicos mais opções, aumentando o uso desses compostos, não apenas para o tratamento da infecção diagnosticada, mas também como tratamento profilático, empírico ou preventivo [2]. Entretanto, com o uso frequente e profilático desses agentes antifúngicos, inúmeras cepas de fungos se tornaram resistentes aos únicos fármacos disponíveis atualmente, limitados a apenas três classes principais de drogas antifúngicas, azóis, polienos e equinocandinas [17].

A crescente resistência de algumas espécies aos agentes antifúngicos é considerada um dos mais graves problemas de saúde hoje em todo o mundo e o tratamento das infecções fúngicas pode ser desafiador devido ao número limitado de fármacos utilizáveis na prática clínica, além das interações medicamentosas e toxicidades associadas a certas classes de antifúngicos que podem limitar sua eficácia [18]. Embora a resistência antifúngica não tenha atingido o nível de resistência visto em algumas

espécies bacterianas, estudos recentes e publicações indicam que este pode ser um grande problema emergente com alguns patógenos fúngicos invasivos [1].

2.1 Resistência aos Azóis

Antes da introdução dos azóis, não havia necessidade real do teste de sensibilidade antifúngica, pois a anfotericina B era o único agente disponível para tratar a candidíase sistêmica [19], entretanto, a nefrotoxicidade do polieno levou ao questionamento de seu uso no tratamento de pacientes graves e debilitados. A introdução de fluconazol proporcionou terapia antifúngica alternativa e menos tóxica [19,20] e, por mais de duas décadas, os azóis foram a classe mais amplamente utilizada de drogas antifúngicas [21].

O fluconazol - resultado de um programa de pesquisa que visava o desenvolvimento de um agente antifúngico de amplo espectro ativo pelas vias oral e intravenosa -, é sem dúvida o fármaco antifúngico mais utilizado na terapia de manutenção no tratamento de infecções superficiais e sistêmicas, tendo sido desenvolvido com base em sua combinação ótima de eficácia antifúngica, características farmacocinéticas aceitáveis, solubilidade aquosa e perfil de segurança [20]. Atua inibindo a enzima fúngica 3A do citocromo P450, lanosterina 14 α - desmetilase, que é responsável pela conversão do lanosterol em ergosterol, o principal esteroide na membrana celular fúngica. A depleção resultante de ergosterol altera a fluidez da membrana, resultando em um acúmulo de intermediários esteróides tóxicos [22–24]. O efeito final é a inibição da replicação; portanto, os azóis clinicamente aprovados (fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol e isavuconazol) apresentam atividade fungistática contra as leveduras das espécies *Candida* e *Cryptococcus* [25,26].

Uma vez que os azóis representavam a única opção terapêutica menos tóxica e mais cômoda que a anfotericina B, e que frequentemente os pacientes faziam uso de cetoconazol ou fluconazol por tempo muito prolongado, surgiu, ainda na década de 80, por conta do uso excessivo dos azóis, inúmeros relatos de resistência de *C. albicans* a fluconazol, sobretudo em pacientes portadores de aids [27–29].

Leveduras como *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, são comumente isoladas do sangue de pacientes infectados e podem apresentar diferentes mecanismos de resistência a antifúngicos, incluindo mutações de genes que

codificam alvos moleculares de azóis e superexpressão de transportadores de fármacos [17]. Hoje, sabe-se que, os pontos de mutação no gene ERG11 que codifica a enzima-alvo, resultam em alteração na estrutura molecular da enzima e menor afinidade aos azóis; a superexpressão desse gene resulta na superprodução da enzima-alvo, criando a necessidade de maiores concentrações do fármaco dentro da célula, para inativar toda as moléculas dessa enzima [30].

Assim, dado que, essas infecções estão frequentemente associadas com alta mortalidade e que há constantes falhas terapêuticas relacionadas ao isolamento de cepas resistentes, é necessário, ter algum método para investigar a suscetibilidade antifúngica, uma vez que, a suscetibilidade *in vitro* de um organismo infectante ao agente selecionado é um dos fatores que podem influenciar a probabilidade de que a terapia seja bem-sucedida [31].

3. Determinação da suscetibilidade antifúngica

A determinação da suscetibilidade relativa dos fungos, bem como, o interesse em métodos laboratoriais para orientar a seleção da terapia antifúngica só foi possível graças ao desenvolvimento de métodos de referência padrão que vieram em resposta ao aumento do número de agentes antifúngicos disponíveis e, principalmente devido à alta incidência de infecções sistêmicas por fungos [6]. A partir do método considerado referência é possível determinar a concentração inibitória mínima (CIM) na qual o fungo é suscetível, dose-dependente ou resistente [32].

De modo geral, as técnicas disponíveis para avaliação *in vitro* da atividade antifúngica são conhecidas como diluição em ágar, difusão em ágar e diluição em caldo. O princípio desses métodos é expor um inóculo definido do micro-organismo a conhecidas concentrações da droga a ser testada, em condições ótimas de crescimento, e observar se o crescimento fúngico é minimizado ou não. A leitura final dos testes de diluição em meio líquido ou sólido permitirá identificar a menor concentração do fármaco que inibe o crescimento de determinado micro-organismo [33].

O Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) e o European for Committee Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) publicaram as duas diretrizes mais utilizadas, em todo o mundo, para testar a suscetibilidade de leveduras por microdiluição

em caldo, documentos M27-A3 e E. Dis. 7.3, respectivamente [6,34]. Ambas são equivalentes, embora apresentem diferenças metodológicas e interpretativas nos pontos de corte (*breakpoints*) [35]. Nesse contexto, um grande desafio é ter pontos de corte harmonizados. A Europa e outras regiões adotam as recomendações do EUCAST, uma vez que o acesso às diretrizes é livremente disponível no site do comitê e isso é certamente uma atração frente aos protocolos comercializados pelo CLSI [36].

Kassim e colaboradores [35] cita uma série de desvantagens dos protocolos com antibacterianos do CLSI, quando comparados ao EUCAST, a saber: i) o custo para se obter as diretrizes do CLSI que chega a \$ 500, para não membros do Instituto, ou \$ 350, para membros, para um pacote de três documentos; ii) a influência que a Food and Drug Administration (FDA) tem na determinação da CIM e isso também levanta grandes preocupações sobre a influência das indústrias farmacêuticas no estabelecimento das diretrizes; iii) o comitê de votação do CLSI que é composto por representantes, tanto da academia quanto do setor produtivo; iv) os antibióticos e/ou antifúngicos que não estiverem registrados nos EUA não são incluídos nas diretrizes do CLSI; v) muitos detalhes sobre o processo de tomada de decisão não são acessíveis ao público.

Independentemente das suas vantagens, os métodos de referência de microdiluição em caldo para testes de sensibilidade antifúngica são demorados e trabalhosos para os laboratórios clínicos de rotina e também de pesquisas. Por essa razão, estão disponíveis métodos comerciais que apresentam boa correlação com os métodos de referência, como E-test®, Sensititre® e Vitek2®, incluindo manuais, semi-automatizados e automatizados, que não requerem manipulação complexa e são métodos alternativos, com boa correlação clínica, para testar agentes antifúngicos *in vitro* [2]. Seja qual for o método, a interpretação dos resultados deve ser cuidadosa, uma vez que a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) é difícil, pois há também fatores do hospedeiro envolvidos e nem sempre há correlação entre a CIM e o desfecho clínico [5].

4. Microdiluição em Caldo: norma M27

O primeiro método corretamente otimizado e padronizado para testar a suscetibilidade de leveduras foi o método de macrodiluição em caldo desenvolvido pela entidade responsável pela normalização de técnicas de laboratório clínico nos Estados

Unidos (EUA), o CLSI, antigo NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), em 1992 (documento M27-P). Posteriormente, foi adaptado para permitir uma microdiluição em placas e testar grandes números de isolados. Entretanto, estudos de suscetibilidade a antifúngicos antes do desenvolvimento desse método, foram inconsistentes e não reproduzíveis, pois existiam muitos fatores que influenciavam esses testes. Sendo assim, como reflexo do maior interesse da comunidade médica e científica, em 1985, o NCCLS, estabeleceu um subcomitê que seria responsável pela análise das diferentes variáveis envolvidas no teste *in vitro* de sensibilidade de leveduras a agentes antifúngicos. No mesmo ano, após publicar seu primeiro relatório, o CLSI concluiu que seria proveitoso desenvolver metodologia mais reprodutível para testes de referência [6].

Embora houvesse, a partir desse relatório, acordo em relação a vários elementos da metodologia, esta era a diluição em caldo; devido a exemplos de antagonismos entre fármacos, por parte de alguns meios de cultura complexos em relação a certos agentes antifúngicos, o meio escolhido deveria ser completamente definido; a normalização do trabalho deveria envolver leveduras, visto que estas eram a causa predominante de infecções fúngicas, precisava-se, no entanto, de dados adicionais para resolver outras questões, tais como: preparação e tamanho do inóculo, meio de cultura, tempo de incubação, temperatura e determinação do ponto final da CIM.

Como parte da estratégia para obter um método com alta reprodutibilidade de resultados, vários estudos multicêntricos foram realizados para definir as condições ideais do ensaio e hoje são tidos como pioneiros para a norma M27. A Tabela 1 apresenta os principais trabalhos iniciadores da norma M27-P do CLSI, os quais forneceram dados para a padronização de testes de suscetibilidade de leveduras aos agentes antifúngicos.

Tabela 1 - Estudos que contribuíram para elaboração da norma M27-P.

Pesquisador/ano	Fator investigado	Resultado	Referência
Pfaller <i>et al.</i> , 1988	Preparação do inóculo de levedura	Definido Método espectrofotométrico	[37]
Pfaller <i>et al.</i> , 1990	Seleção do Meio de cultura: (YNB, SAAMF, RPMI-1640 ou High-resolution broth) e Temperatura ideal de incubação	Definido Meio: RPMI-1640 e Temperatura: 35°C	[38]
Fromtling <i>et al.</i> , 1993	Tempo de incubação, concentração do inóculo e definição dos critérios para determinação do ponto final da CIM	Definida Incubação: 48 h e Concentração de Inóculo: $2,5 \times 10^3$ UFC/mL Critério de leitura definido	[39]
Espinel-ingroff <i>et al.</i> , 1992 Barchiesi <i>et al.</i> , 1994	Comparação Macrodiluição <i>versus</i> Microdiluição	Aceita metodologia de microdiluição (Equivalência de resultados entre os métodos)	[40,41]
Pfaller <i>et al.</i> , 1995	Cepas ATCC para controle de qualidade	Estabelecido <i>Candida parapsilosis</i> e <i>Candida krusei</i> como cepas ATCC de controle	[42]
Barry <i>et al.</i> , 2000	CIM para cepas controle em leituras de 24 h e 48 h	Definidos os valores de CIMs em 24 h e 48 h para alguns antifúngicos	[43]

Como resultado desses estudos colaborativos do subcomitê, o CLSI publicou em 1992, um método de referência para a determinação da sensibilidade de *Candida* spp. em meio líquido, que resultou na norma proposta M27 (M27-P), denominada técnica de diluição em caldo ou macrodiluição. Nos quatro anos seguintes, de 1992 a 1996, o subcomitê focou em estabelecer as faixas de referência de CIM para duas cepas de controle de qualidade e, após, diversos trabalhos realizados avaliando a equivalência de resultados obtidos com a macrodiluição *versus* microdiluição, foi possível disponibilizar

uma metodologia para o teste de microdiluição em caldo correspondente à do teste de referência por macrodiluição, que foi incluída na norma revisada, publicada em 1995 (M27-T).

Em revisão posterior do documento, o CLSI desenvolveu “pontos de corte” relevantes para os agentes antifúngicos disponíveis na época (anfotericina B, 5-fluorocitosina e derivados azólicos) e incluiu na norma M27-A em 1997. Desde então, com o objetivo de facilitar a concordância entre laboratórios na determinação da sensibilidade de leveduras aos agentes antifúngicos, o subcomitê esforçou-se em desenvolver as faixas de referência das CIMs de 24 h e 48 h, frente aos antifúngicos anfotericina B, 5-fluorocitosina, fluconazol, cetoconazol, itraconazol, posaconazol, ravuconazol e voriconazol [43]. O resultado desse estudo foi incluído, em 2002, na segunda edição da norma, denominada M27-A2. Mais tarde, a norma foi revisada, resultando na atual M27-A3, publicada em 2008 (3ª edição). Nesta revisão, incluiu-se as leituras de CIM para os antifúngicos da classe das equinocandinas: caspofungina, micafungina e anidulafungina.

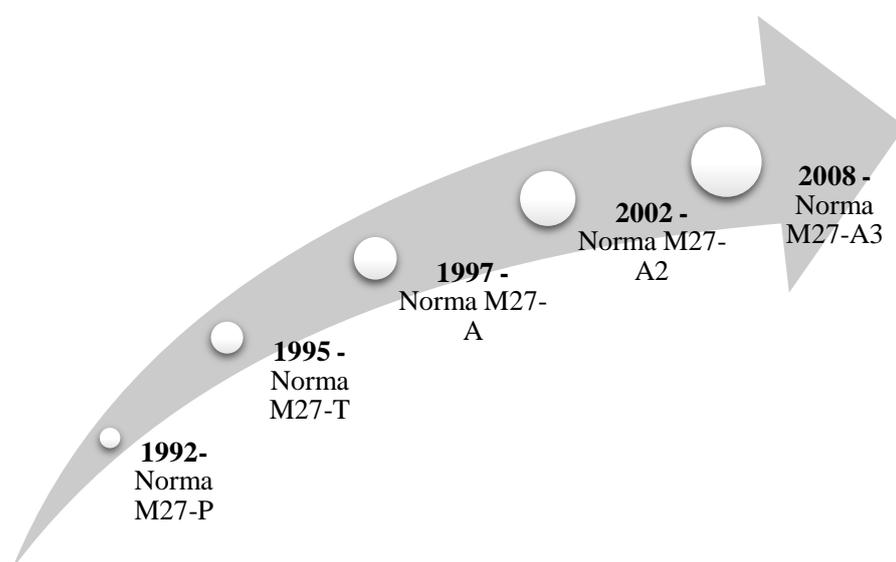


Figura 1 - Normas desenvolvidas pelo CLSI para determinação da suscetibilidade de leveduras a diversos antifúngicos. 1992 - Acordo sobre todos as questões; 1995 - Disponibilizou-se uma metodologia para o teste de microdiluição; 1997 - Revisão posterior do documento e desenvolvimento de pontos de corte; 2002 – Desenvolveu-se faixas de referência das CIMs de 24 e 48 horas; 2008 -Leituras de CIM para caspofungina, micafungina e anidulafungina.

Entretanto, apesar dos avanços e melhorias obtidos com a padronização dos métodos de antifungograma pelo CLSI, algumas limitações ainda persistiram, como: a não detecção confiável da resistência de *Candida* spp. frente à anfotericina B, o crescimento e a simplificação da leitura para *C. neoformans* que precisava ser melhorada e o ponto final da reação para fluconazol que precisava ser claramente definido [6]. E embora as muitas publicações que demonstravam a necessidade de revisão, para melhorar o teste de microdiluição, a última atualização do protocolo, no que diz respeito à fatores como: meios de cultura, tampão, pH, inóculo e leitura foi em 1992, quando o subcomitê apresentou os trabalhos pioneiros e estes forneceram dados para a padronização de testes de suscetibilidade de leveduras aos agentes antifúngicos. Depois, em 1994, optou-se pela facilidade do teste em microdiluição, no lugar do teste em macrodiluição.

O fato é que, a micologia clínica baseia-se neste método de suscetibilidade para selecionar o agente de escolha para uma infecção fúngica e para conhecer a epidemiologia local e global da resistência antifúngica [2]. O método de microdiluição em caldo, relatado no documento M27-A3 do CLSI, agora é uma referência amplamente aceita; contudo, a seleção do fármaco apropriado se amplia na medida em que há busca por melhorias no protocolo do teste [44].

4.1 Modificações propostas da Norma M27-A3 do CLSI

Na década de 90, muitas modificações da norma M27-P foram desenvolvidas, em resposta a problemas específicos e, algumas delas encontram-se descritas na atual norma em uma tabela de “modificações para circunstâncias especiais”, com respectivas referências bibliográficas. Estas incluem: o uso do Antibiotic Medium 3 para auxiliar na detecção da resistência de *Candidas* spp. frente à anfotericina B [45], o uso do meio yeast nitrogen base (YNB) para destacar o crescimento de *C. neoformans* e melhorar a relevância clínica das CIMs frente aos antifúngicos [46,47] e a suplementação do meio com glicose para que tenha a concentração final de 20g/L, para melhora do crescimento do inóculo [48]. Entretanto, embora estas referências tenham mais de 20 anos publicadas, a utilidade de cada modificação ainda não foi estabelecida pelo comitê e é fornecida

apenas como referência para os laboratórios interessados em estudar adaptações da norma M27-P, não fazendo parte da atual metodologia [6].

A inclusão de novas etapas no protocolo atual do CLSI também já foi sugerida por outros autores. Por exemplo, Vitale e colaboradores [7] avaliaram a influência do tamanho da cápsula polissacarídica produzida pelo *C. neoformans*, na atividade *in vitro* de cinco agentes antifúngicos (anfotericina B, fluconazol, voriconazol, itraconazol, fluorcitocina). O desenvolvimento da cápsula foi induzido adicionando NaHCO₃ ao meio e depois incubando-se as células em 5% de CO₂. O fluconazol apresentou maiores CIMs após a indução da cápsula e, como resultado, os autores mostraram que, a determinação da atividade antifúngica após a indução da cápsula é clinicamente mais relevante para avaliar a correlação entre os resultados *in vitro* e o desfecho clínico. Os autores sugerem acrescentar essa etapa de indução de cápsula no teste de microdiluição, norma M27-A3 do CLSI, uma vez que esta influencia a atividade *in vitro* dos agentes antifúngicos.

Da mesma forma, Córdoba e colaboradores [8] demonstraram que o tamanho da cápsula polissacarídica produzida pelo *C. neoformans*, que é maior infectando células *in vivo* do que naquelas cultivadas em condições normais de laboratório, influenciam a suscetibilidade *in vitro* dos agentes antifúngicos e, que no geral, isolados com cápsulas maiores foram mais resistentes à anfotericina B quando comparados com aqueles isolados com cápsulas menores.

Garcia-Effron e colaboradores [9] demonstraram que a adição de albumina de soro bovino (ASB) na metodologia do documento M27-A3 do CLSI, melhora a identificação de *Candida* spp. resistente às equinocandinas, uma vez que *in vivo*, esta classe de fármaco está altamente ligada às proteínas séricas. O teste foi realizado de acordo com o método do documento CLSI M27-A3 com 50% (p / v) de soro e diferentes concentrações de ASB (de 2,5 a 100 mg / mL). Os autores concluíram que RPMI-1640 com 50 mg / mL de albumina de soro bovino foi melhor do que o RPMI-1640 sozinho na detecção de isolados resistentes de *Candida* spp. e que a adição dessa proteína ao RPMI-1640 poderia ser considerada uma modificação do teste de suscetibilidade às equinocandinas do CLSI. No entanto, as condições ideais de teste devem ser ainda estabelecidas, e os estudos de reprodutibilidade com vários laboratórios são essenciais para propor tal modificação.

O impacto do pH na suscetibilidade antifúngica de *C. albicans* obtidos de pacientes com candidíase vulvovaginal, foi investigada por Liu e colaboradores [10] usando como referência o método de microdiluição em caldo (CLSI, documento M27-A2). O teste de sensibilidade antifúngica foi realizado em pH 7,0 e pH 4,0. As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) de miconazol, clotrimazol, fluconazol e nistatina contra *C. albicans* em pH 4,0 foram significativamente maiores do que aquelas em pH 7,0 (0,25 vs 0,03 µg / mL; 0,50 vs 0,03 µg / mL; 0,50 vs 0,25 µg / mL e 32 vs 2 µg / mL, respectivamente) e os autores recomendam que o meio de crescimento em diferentes valores de pH deve ser utilizado para testes de suscetibilidade de acordo com a origem de isolamento de *C. albicans*.

Zaragoza e colaboradores [49], demonstram que o crescimento de *C. neoformans* e outras leveduras não fermentadoras pode ser melhorado pela introdução de novos fatores nos protocolos sugeridos pelo CLSI e pelo EUCAST. Os autores concluíram que as condições do teste, incluindo YNB como meio de ensaio, agitação das placas, leitura após 48 h de incubação, um tamanho de inóculo de 10^5 UFC / mL e incubação a 30 ° C, facilitaram as determinações da CIM, sem uma superestimação dos valores.

Também, Rodríguez - Tudela e colaboradores [11] independentemente do meio utilizado (RPMI 1640, RPMI 1640 com 2% de glicose e Yeast Nitrogen Base –YNB), verificaram que a agitação favoreceu o crescimento de *C. neoformans*, demonstrando que seu crescimento em culturas estáticas é muito pobre. Os autores recomendam que, para um futuro desenvolvimento e/ou atualização do teste de suscetibilidade antifúngica, a inclusão de agitação durante a incubação, particularmente para *C. neoformans*, deve ser considerada, demonstrando a necessidade de atualização do teste de suscetibilidade antifúngica para *C. neoformans*. A agitação sugerida hoje no protocolo é opcional ao executor.

4.2 Fatores que influenciam a concentração inibitória mínima (CIM)

4.2.1 Meio de Crescimento

Os fungos são células eucarióticas e assim representam o micro-organismo mais complexo e evoluído, estudado até agora; portanto, nenhum meio de cultura isoladamente

é suficiente para isolar e cultivar todos os fungos clinicamente importantes [26,50]. A disponibilidade de nutrientes essenciais em um meio de cultura, como glicose e composto de nitrogênio, dita as taxas de crescimento das células de levedura e estas ajustam, finamente, seu crescimento e comportamento de acordo com os nutrientes disponíveis, podendo se adaptar ao esgotamento nutricional através do desenvolvimento de mecanismos alternativos [51].

Leveduras mostram exigência de minerais que se assemelham aos de outros organismos vivos e, em particular, é necessário fornecimento de potássio, ferro, magnésio, manganês, cálcio, cobre e zinco. Muitos outros nutrientes são conhecidos por estimular o crescimento de leveduras (ácido pantotênico, inositol, ácido nicotínico, tiamina, ácido p-aminobenzóico e piridoxina), embora não sejam absolutamente necessários para o crescimento celular. *Candida albicans*, por exemplo, é capaz de viver e se desenvolver em meios com sais de amônio como única fonte de nitrogênio, embora os aminoácidos, quando presentes, sejam a fonte preferida. Estes são tomados de maneira sequencial, o que reflete as propriedades e especificidades das permeases localizadas na membrana celular da levedura [52].

Esses micro-organismos fúngicos, são capazes de sintetizar todos os 20 aminoácidos proteínogênicos, incluindo nove que são essenciais para os seres humanos e que devem ser adquiridos da dieta (fenilalanina, valina, treonina, triptofano, isoleucina, metionina, leucina, lisina e histidina). Isso ocorre porque as enzimas que catalisam etapas particulares da biossíntese dos aminoácidos essenciais aos seres humanos são específicas dos fungos e, estes desenvolveram suas próprias vias de biossíntese [53]. O trabalho realizado por Lee e colaboradores [54] demonstrou que o meio sintético de aminoácidos, desenvolvido a partir do perfil de aminopeptidase de *C. albicans*, composto por apenas 6 (seis) aminoácidos, biotina, sais inorgânicos e glicose, suportou o crescimento ótimo desse micro-organismo.

Hoje, o teste de sensibilidade antifúngica é feito com o meio RPMI-1640 (com glutamina, sem bicarbonato e com indicador vermelho), nome devido ao Roswell Park Memorial Institute, tamponado com ácido 3- (N-morfolino) propanosulfônico (MOPS) 0,165 mol/L. Este meio é uma modificação do meio 5A descrito por McCoy e colaboradores que estabeleceram o “Novikoff hepatoma” como um tipo de tumor

hepático que requeria 12 aminoácidos e glutamina para seu crescimento *in vitro* [55]. Mais tarde, foi modificado para ser usado em crescimento de células humanas, como um meio quimicamente definido, sendo vantajoso em apoiar o crescimento celular rápido e, considerado também o melhor meio de uso geral para cultivar, *in vitro*, vários tipos de células de mamíferos [56].

Desde a norma M27-P, o meio RPMI-1640 foi considerado apropriado e escolhido, a partir do trabalho de Pfaller e colaboradores [38] por proporcionar o nível mais elevado de concordância interlaboratorial. Todavia, os autores afirmaram que isso não foi, significativamente, diferente do observado com meio Yeast Nitrogen Base (YNB) e, além disso, o uso de YNB (pH 7), suplementado com glicose (concentração final de 0,5 g/L), é um meio alternativo e descrito na atual norma para destacar o crescimento de *C. neoformans* e melhorar a relevância clínica das CIMs dos agentes antifúngicos [46].

Segundo Radetsky e colaboradores [57] as vantagens do meio RPMI-1640 é que ele é prontamente disponível, econômico, de qualidade controlada, quimicamente definido, simples de preparar, tamponado (carbonato e fosfato) e contém um indicador de pH (vermelho de fenol). Entretanto, no que diz respeito à economia e facilidade de preparo, percebe-se claramente que esta referência está desatualizada. Além do mais, mesmo utilizando RPMI-1640, uma das principais limitações da metodologia M27-A3, até os dias de hoje, é a detecção confiável da resistência à anfotericina B em isolados de *Candida* spp. As pesquisas citadas a seguir, buscaram alternativas para o uso do meio padrão, na tentativa de auxiliar na detecção dessa resistência. Todas sem sucesso de padronização pelo comitê.

Na década de 90, a fim de identificar meios alternativos e condições de pH que pudessem identificar de forma confiável isolados resistentes à anfotericina B, Rex e colaboradores [58] concluíram que o Antibiotic Medium 3 tamponado, em pH 5 ou pH 7, produziu resultados superiores entre os meios testados (caldo Sabouraud, Antibiotic Medium 3, caldo casitone e YNB) e, identificou, facilmente, uma série de isolados resistentes dentro das primeiras 24 h. Lozano-Chiu e colaboradores [45], também concluíram que o uso do caldo Antibiotic Medium 3 poderia auxiliar na detecção de

resistência, entretanto, por possuir variabilidade substancial entre lotes, este meio não foi padronizado até hoje para testes de suscetibilidade.

A fim de resolver o impasse no uso do Antibiotic Medium 3, Cuenca-Estrella e colaboradores [59] analisaram e compararam os resultados das CIMs obtidas com a utilização do caldo Iso-Sensitest, um meio semi-definido, com as CIMs obtidas com o caldo RPMI-1640 e Antibiotic Medium 3. Os autores verificaram que por Iso-Sensitest as CIMs foram altamente reprodutíveis e identificavam isolados de *Candida* spp. resistentes à anfotericina B. Os autores concluíram que a discriminação mais pronunciada foi conseguida através do teste utilizando Iso-sensitest como meio suplementado com glicose e leitura espectrofotométrica após 24 h de incubação.

Apesar destes estudos, nada foi anexado e a norma M27-A3 ainda usa o RPMI-1640 como meio de crescimento. Ademais, a falta de concordância quanto à suplementação do meio RPMI-1640 para que contenha uma concentração final de glicose de 20g/L e uso de YNB, para promover crescimento de *C. neoformans* e melhorar a relevância clínica das CIMs dos antifúngicos, continua sendo uma limitação importante da atual norma M27-A3.

Apesar do exposto, não se encontra na literatura recente, estudos que busquem o uso de outros meios de crescimento no teste de suscetibilidade a antifúngicos. Os trabalhos atuais são sempre voltados para o desenvolvimento de pontos de corte relevantes para os antifúngicos disponíveis e, também, para a tentativa de desenvolvimento de ensaios de referências para fungos que não estão incluídos na atual norma, como espécies de *Paracoccidioides*, *Histoplasma* e *Malassezia pachydermatis* [60–62]. Enquanto isso, definir um meio de crescimento ideal, que seja de fácil preparo, barato e que permita maior confiabilidade na detecção dos isolados resistentes, bem como, melhore a relevância clínica das CIMs dos antifúngicos testados, continua incerto.

4.2.2 Solução Tampão para Meio de Cultura

O uso de soluções tampão para manter o pH dentro de um intervalo desejado é uma prática muito comum em estudos químicos, bioquímicos e biológicos [63]. O ácido 3- (N-morfolino) propanosulfônico, de sigla MOPS, é um tampão desenvolvido para uso

geral em bioquímica. Com um pKa de 7,15 a 20° C é muito útil para tamponamento de sistemas biológicos e ensaios que utilizam um pH neutro [64].

Segundo o CLSI [6], a solução-tampão considerada satisfatória nos testes de sensibilidade a antifúngicos é obtida com MOPS, pois é compatível com os antifúngicos, não antagonizando ou produzindo interações com os mesmos. Entretanto, não há descrito na norma atual qualquer trabalho que seja a referência para esta escolha, pois o trabalho de Pfaller e colaboradores [38], que definiu o meio ideal para a atual metodologia, não usou outra solução-tampão nos meios de crescimento. Todos os meios foram tamponados somente com MOPS a pH 7,0. Portanto, não sendo possível escolher qual seria o melhor tampão para o teste.

Os dois estudos descritos a seguir, apesar de antigos, contém testes que compararam bicarbonato de sódio, MOPS-Tris e tampão fosfato como alternativa de sistemas tampões mais baratos nos testes de suscetibilidade antifúngica. O primeiro foi de Gadea e colaboradores [65] que compararam o efeito dos sistemas tampões utilizados na atividade *in vitro* da anfotericina B, fluorcitosina, fluconazol, itraconazol e cetoconazol contra 93 isolados clínicos de leveduras pela técnica de microdiluição em caldo. Os autores concluíram que, independentemente do sistema tampão usado, os três métodos eram de reprodutibilidade comparável e os resultados podiam ser lidos facilmente, tanto espectrofotometricamente quanto a olho nú, com exceção de *C. parapsilosis* e *C. neoformans*. Estas espécies não cresceram adequadamente em qualquer uma das condições testadas: RPMI 1640 com 2% de glicose e tamponado com 0,165 M de MOPS a pH 7,0; RPMI-1640 nas mesmas condições, porém tamponado a pH 7,4 e RPMI-1640 com 2% de glicose e tamponado a pH 7,4 com 0,15% de bicarbonato de sódio.

O segundo foi de McIntyre e Galgiani [66], que utilizaram meio de cultura SAAMF (*synthetic amino acid medium fungal*) na atividade antifúngica de cilofungina e observaram que não houve variações nos resultados de suscetibilidade entre os sistemas tampões utilizados: HEPES, MOPS, combinação de MOPS-Tris ou fosfato.

4.2.3 Concentração do Inóculo

Pfaller e colaboradores [37] definiram, a partir de um estudo comparativo entre quatro métodos de preparo de inóculo (espectrofotométrico, cartão de Wickerham,

hemocitômetro e sistema *Prompt* de inoculação), que o método espectrofotométrico seria o escolhido para a preparação de inóculos de leveduras, por apresentar maior reprodutibilidade e menor variabilidade. Fromtling e colaboradores [39] definiram que o tamanho do inóculo ideal para o teste de suscetibilidade era na ordem de $2,5 \times 10^3$ células/mL.

A partir disso, a preparação do inóculo para o teste, segundo o protocolo M27-A3, é a seguinte: (1) deve-se realizar a subcultura das leveduras, em tubos estéreis com ágar Sabouraud dextrose ou ágar batata-dextrose, executando passagens para assegurar sua pureza e viabilidade. A temperatura de incubação deve permanecer em 35°C. (2) O inóculo deve ser preparado escolhendo-se cinco colônias, com diâmetro de ~1mm de cultura de 24 h, para espécies de *Candida* ou cultura de 48 h para *C. neoformans*. As colônias devem ser suspensas em 5mL de solução salina estéril 0,145 mol/L (salina a 0,85%) (3). A suspensão resultante deve ser colocada em agitador *vórtex* durante 15 segundos e a densidade celular, ajustada com espectrofotômetro, acrescentando-se solução salina suficiente para obter transmitância equivalente à de uma solução-padrão 0,5 da escala de McFarland, sob comprimento de onda de 530nm. A suspensão padrão de levedura deve ser homogeneizada durante 15 segundos em *vórtex*, diluída 1:50 e depois 1:20 com o meio de cultura, para se obter o inóculo 2X concentrado usado no teste (de 1×10^3 a 5×10^3 CFU/mL). O inóculo (2X) será, então, diluído a 1:1 quando for inoculado na placa de microtitulação chegando à concentração final desejada ($0,5 \times 10^3$ a $2,5 \times 10^3$ CFU/mL) [6].

Ainda na década de 90, quando o subcomitê do CLSI estava investigando as variáveis que afetavam o teste de suscetibilidade de fungos aos antimicóticos, Ghannoum e colaboradores [46] após estudar uma série de condições ideais para determinar a suscetibilidade de *Cryptococcus neoformans* a agentes antifúngicos, propôs que a microdiluição, utilizando 10^4 células por mL, como inóculo final, YNB (pH=7) como meio de crescimento e 48 h como período de incubação, era um método simples, preciso e reprodutível para testar a suscetibilidade de *C. neoformans* ao fluconazol, anfotericina B e fluorcitosina.

Rodríguez-Tudella e colaboradores [11] após examinar os três meios recomendados pelo protocolo M27-A3 do CLSI (RPMI 1640, RPMI 1640–2% de glicose

e YNB), verificaram que inóculo de 10^5 UFC/mL produzia crescimento ótimo para *C. neoformans*, demonstrando a necessidade de revisão no teste de referência norte americano.

Também, Cuenca-Estrella e colaboradores [59] verificaram que o teste de suscetibilidade realizado com Antibiotic Medium 3 e empregando inóculo de 10^3 UFC / mL conseguiu distinguir entre isolados de *Candida* spp. resistentes e suscetíveis. Aferiram, também, que o método de leitura, o tempo de incubação e a adição de glicose não apresentou efeito significativo nas concentrações inibitórias mínimas. No entanto, inóculo maior (10^5 UFC / mL) interferiu nos valores de CIM.

4.2.4 Tempo de Incubação

O estudo que deu origem ao tempo de incubação de 24 h para *Candida* spp., usado no teste de microdiluição, foi de Fromtling e colaboradores [39] no qual os autores verificaram que, o crescimento em 24 h era uniformemente pobre em todos os meios e não tinha reprodutibilidade. Em contraste, a incubação por 48 h apresentou crescimento com baixos valores de desvio padrão. Como conclusão, os resultados da microdiluição com leitura de CIM realizada em 48 h (72 h para *C. neoformans*) tiveram maior concordância com o método de referência por macrodiluição em caldo.

Assim, a metodologia da norma M27-A3 para *Candida* recomenda ponto final de leitura após 48 h, com exceção para equinocandinas. Pois, segundo a norma, para a maioria dos isolados, a diferença entre leitura após 24 h e após 48 h é mínima e não altera a categoria de interpretação, ou seja, não muda a classificação do isolado como “sensível” ou “resistente” [6]. Entretanto, Arthington-Skaggs e colaboradores [67] sugeriram a inclusão de leituras após 24 h, porque: (a) é possível, com frequência, ler resultado de CIM e (b) as leituras podem ser mais relevantes, do ponto de vista clínico, no caso de alguns isolados. Segundo os autores os isolados cuja leitura precoce é importante são os que apresentam aumento dramático de CIM, das 24 h para 48 h, devido ao crescimento residual e significativo (inibição apenas parcial do crescimento em amplo intervalo de concentrações crescentes do antifúngico fungistático, fenômeno conhecido como *trailing*). Logo, com ocorrência estimada em, aproximadamente, 5% dos isolados, o *trailing* pode ser suficiente para fazer com que um isolado sensível às 24 h, se torne

resistente após 48 h. Dessa forma, a norma M27-A3 fornece intervalos de CIM, para ambas as leituras, de 24 h e 48 h, em testes de microdiluição, para duas cepas ATCC para controle de qualidade frente a oito antifúngicos sistêmicos. A norma não deixa claro, entretanto, se os resultados obtidos após 48 h de incubação são mais adequados do que aqueles obtidos após 24h, ou vice-versa. O crescimento do inóculo é que irá definir o tempo final de reação para a leitura da CIM.

4.2.5 *Leitura dos Resultados*

A metodologia da norma M27-A3 recomenda que as placas de microdiluição sejam incubadas a 35° C, observando presença ou ausência de crescimento visível à olho nu. Após isso, os poços da placa de microdiluição recebem uma pontuação (*score*) e o crescimento em cada poço é comparado com o do poço controle do crescimento (isento de antifúngico) com auxílio de um espelho de leitura (ou não). A seguir, cada poço da placa de microdiluição recebe um valor numérico, usando a seguinte escala:

- 0 = opticamente claro, correspondendo a 100% de inibição;
- 1 = crescimento indefinido, correspondendo a 75%;
- 2 = redução proeminente de crescimento, correspondendo a 50 %;
- 3 = ligeira redução do crescimento, correspondendo a 25%;
- 4 = nenhuma redução do crescimento, correspondendo a 0% de inibição;

Para anfotericina B, os pontos finais da reação são, claramente, definidos, sendo fácil distinguir a CIM como a menor concentração de antifúngico, que impede qualquer grau de crescimento discernível. Em geral, não são vistos pontos finais da reação mal definidos. Sendo, portanto, a CIM da anfotericina B definida como a menor concentração em que se observa o *score* 0 (opticamente claro). Para fluorcitosina e para os azóis os pontos finais da reação são menos, claramente, definidos do que os descritos para anfotericina B, o que pode constituir uma fonte substancial de variabilidade. A CIM destes é definida como a menor concentração em que se observa o *score* 2 (redução proeminente de crescimento) ou mais. Esse *score* corresponde à, aproximadamente, 50% ou mais da inibição do crescimento, como determinado numericamente em espectrofotômetro [6]. No entanto, a leitura a olho nú é objetiva e depende da experiência do técnico [5].

Dessa forma, o valor da automatização por leituras espectrofotométricas foi enfatizado pelo EUCAST que propõe sua obrigatoriedade nos testes com leveduras. Além desse ponto, o EUCAST indicou modificações de alguns parâmetros do CLSI, como preparação e concentração do inóculo, suplementação de glicose no RPMI. Diferente do CLSI, o EUCAST considera como ponto final da reação o poço onde há absorvância (sob filtro 530nm), de 50% ou menos em relação ao controle positivo, oferecendo, portanto, a vantagem de se obter uma leitura mais objetiva para a determinação da CIM. Além disso, usando procedimentos cinéticos, a CIM dos antifúngicos podem ser determinadas em qualquer momento desejado durante o período de incubação, não sendo necessário o período de 24 h ou 48 h para a leitura final [68]. Diante das contribuições do EUCAST, a norma E.Def.7.3 é, atualmente, considerada como referência européia e utilizada amplamente.

Os ensaios colorimétricos estão sendo cada vez mais usados em testes com fungos pela facilidade da leitura a olho nú em laboratórios de rotina, mas a questão do *trailing* não é controlada e o técnico deve estar muito bem capacitado para efetuar as leituras [69–71]. Sais de tetrazólio e o corante Alamar Blue® (azul de resazurina), um eficaz indicador de crescimento microbiano, são frequentemente usados em tais testes [70,72–74].

5. Conclusão

Apesar da Norma M27-A3 ser a norma de referência em uso para auxiliar os laboratórios clínicos nos testes de sensibilidade a antifúngicos desde 1992, ainda há muitas possibilidades de melhorias a metodologia do protocolo. E, mesmo com muitas publicações com intuito de avaliar e sugerir melhorias para no desempenho da Norma, parece haver dificuldade para inserção de novas modificações e publicação de um protocolo atualizado. Nesse sentido é de grande interesse que estudos multicêntricos sejam implementados para investigar os parâmetros propostos na literatura.

6. Referências

- [1] Albataineh MT, Sutton DA, Fothergill AW, Wiederhold NP. (2016) Update from the Laboratory: Clinical Identification and Susceptibility Testing of Fungi and Trends in Antifungal Resistance. *Infect. Dis. Clin. North Am* 30: 13–35. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2015.10.014>
- [2] Alastruey-Izquierdo A, Melhem MSC, Bonfietti LX, Rodriguez-Tudela JL. (2015) Susceptibility Test for Fungi: Clinical and Laboratorial Correlations in Medical Mycology. *Rev. Inst. Med. Trop* 57: 57–64.
- [3] Sun KS, Tsai CF, Chen SCC, Huang WC. (2017) Clinical outcome and prognostic factors associated with invasive pulmonary aspergillosis: An 11-year follow-up report from Taiwan. *PLoS One* 12: 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186422>
- [4] Colombo AL, Tobón A, Restrepo A, Queiroz-Telles F, Nucci M. (2011) Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. *Med. Mycol* 49: 785–798. <https://doi.org/10.3109/13693786.2011.577821>
- [5] Paredes CVT. (2009) Actualización en pruebas de susceptibilidad antifúngica. *Rev Chil Infect* 26: 144–150.
- [6] Clinical and Laboratory Standards Institute. (2008) Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Approved Standard-third edition. CLSI document M27- A3. Wayne, PA.
- [7] Vitale RG, Pascuccelli V, Afeltra J. (2012) Influence of capsule size on the in vitro activity of antifungal agents against clinical *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* strains. *J. Med. Microbiol* 61: 384–388. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.036152-0>
- [8] Córdoba S, Afeltra J, Vitale RG. (2011) Evaluation of the in vitro activity of amphotericin B by time-kill curve methodology against large and small capsulate *C. neoformans* isolates. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis* 71: 260–262. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2011.08.003>
- [9] Garcia-Effron G, Park S, Perlin DS. (2011) Improved detection of *Candida* sp. fks hot spot mutants by using the method of the CLSI M27-A3 document with the addition of bovine serum albumin. *Antimicrob. Agents Chemother* 55: 2245–2255.
- [10] Liu W, Zhang X, Liu Z, Luo X. (2011) Impact of pH on the antifungal susceptibility of vaginal *Candida albicans*. *Int. J. Gynecol. Obstet* 114: 278–280.
- [11] Rodríguez-Tudela JL, Martín-Díez F, Cuenca-Estrella M, Rodero L, Carpintero Y, Gorgojo B. (2000) Influence of shaking on antifungal susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans*: A comparison of the NCCLS standard M27A medium,

- buffered yeast nitrogen base, and RPMI-2% glucose. *Antimicrob. Agents Chemother* 44: 400–404.
- [12] Smith KD, Achan B, Hullsiek KH et al (2015) Increased Antifungal Drug Resistance in Ugandan Clinical Isolates of *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob. Agents Chemother* 59: 7197–7204.
- [13] Miller RA. (2018) A Case for Antifungal Stewardship. *Curr. Fungal Infect. Rep* 12: 33–43.
- [14] Fass RJ, Perkins RI. (1971) 5-Fluorocytosine in the Treatment of Cryptococcal and Candida Mycoses. *Ann. Intern. Med* 74: 535-539.
- [15] Hamilton JD, Elliott DM. (1975) Combined activity of amphotericin B and 5-fluorocytosine against *Cryptococcus neoformans* in vitro and in vivo in mice. *J. Infect. Dis* 131: 129–137. <https://doi.org/10.1093/infdis/131.2.129>
- [16] Wiederhold NP. (2018) The antifungal arsenal: alternative drugs and future targets. *Int. J. Antimicrob. Agents* 51: 333–339. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.09.002>
- [17] Perfect JR. (2017) The antifungal pipeline: A reality check. *Nat. Rev. Drug Discov* 16: 603–616.
- [18] Martinez R. (2006) Atualização no uso de agentes antifúngicos. *J Bras Pneumol* 32: 449–460.
- [19] Hospenthal DR, Murray CK, Rinaldi MG. (2004) The role of antifungal susceptibility testing in the therapy of candidiasis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis* 48: 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2003.10.003>
- [20] Richardson PJ, Copper K, Marriott K et al (2016) Discovery of Fluconazole, a Novel Antifungal Agent. *Rev. Infect. Dis* 12: 267–271.
- [21] Robbins N, Caplan T, Cowen LE. (2017) Molecular Evolution of Antifungal Drug Resistance. *Annu. Rev. Microbiol* 71: 753–775. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-030117-020345>
- [22] Lyman CA, Walsh TJ. (1992) Systemically Administered Antifungal Agents. A Review of Their Clinical Pharmacology and Therapeutic Applications. *Drugs* 44: 9–35.
- [23] Shaw JTB, Tarbit MH, Troke PF. (1987) Cytochrome P-450 mediated sterol synthesis and metabolism: differences in sensitivity to fluconazole and other azoles. *In: Fromtling RA (ed). Recent trends in the Discovery, development and Evaluation of antifungal agents.* JR Prous Science Publisher. Barcelona, pp 125-140.
- [24] Berg D, Plempel M, Buchel KH et al (1988) Sterol Biosynthesis inhibitors. *Annals*

- of the New York academy of sciences 544: 338-347.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1988.tb40418.x>
- [25] Santos Jr ID, Souza IAM, Borges RG et al (2005) Características gerais da ação, do tratamento e da resistência fúngica ao fluconazol. *Sci. Medica* 15: 189–197.
- [26] Rang HP, Dale MM, Ritter JM. (2008) *Farmacologia*. Elsevier, Rio de Janeiro.
- [27] Smith KJ, Warnock DW, Kennedy CTC et al (1986) Azole resistance in *Candida albicans*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* 24:133-144. doi:10.1080/02681218680000201.
- [28] Ryley JF, Wilson RG, Barrett-Bee KJ. (1984) Azole resistance in *Candida albicans*. *Sabouradia: Journal of Medical and Veterinary Mycology* 22: 53-63. <https://doi.org/10.1080/02681218680000201>
- [29] Kerridge D, Nicholas RO. (1986) Drug resistance in the opportunistic pathogens *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *J. Antimicrob. Chemother* 18: 39–49. https://doi.org/10.1093/jac/18.Supplement_B.39
- [30] Flowers SA, Barker KS, Berkow EL et al (2012) Gain-of-function mutations in UPC2 are a frequent cause of ERG11 upregulation in azole-resistant clinical isolates of *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell* 11: 1289–1299.
- [31] Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. (2014) *Microbiologia médica*. Elsevier, Rio de Janeiro.
- [32] Hazen KC. (2013) Influence of DMSO on antifungal activity during susceptibility testing in vitro. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis* 75: 60–63. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.09.002>
- [33] Sidrim JJC, Rocha MFG. (2004) *Micologia médica à luz dos autores contemporâneos*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- [34] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (2015). Method for the determination of broth dilution minimum Inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts. E. Def 7.3 (EUCAST-AFST).
- [35] Kassim A, Omuse G, Premji Z, Revathi G. (2016) Comparison of Clinical Laboratory Standards Institute and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing guidelines for the interpretation of antibiotic susceptibility at a University teaching hospital in Nairobi, Kenya: A cross-sectional stud. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob* 15: 1–7.
- [36] Kahlmeter G. (2015) The 2014 Garrod Lecture: EUCAST - are we heading towards international agreement. *J. Antimicrob. Chemother* 70: 2427–2439. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv145>
- [37] Pfaller MA, Burmeister L, Bartlett MS, Rinaldi MG. (1988) Multicenter

- evaluation of four methods of yeast inoculum preparation. *J. Clin. Microbiol* 26: 1437–1441.
- [38] Pfaller MA, Rinaldi MG, Galgiani JN et al (1990) Collaborative investigation of variables in susceptibility testing of yeasts. *Antimicrob. Agents Chemother* 34: 1648–1654.
- [39] Fromtling RA, Galgiani JN, Pfaller MA et al (1993) Multicenter evaluation of a broth macrodilution antifungal susceptibility test for yeasts. *Antimicrob. Agents Chemother* 37: 39–45.
- [40] Espinel-Ingroff A, Kish CW, Kerkering TM et al (1992) Collaborative comparison of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests. *J. Clin. Microbiol* 30: 3138–3145.
- [41] Barchiesi F, Colombo AL, Mcgough DA, Rinaldi MG. (1994) Comparative Study of Broth Macrodilution and Microdilution Techniques for In Vitro Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts by Using the National Committee for Clinical Laboratory Standards Proposed Standard. *J. Clin. Microbiol* 32: 2494–2500.
- [42] Pfaller MA, Bale M, Buschelman B et al (1995) Quality control guidelines for National Committee for Clinical Laboratory Standards recommended broth macrodilution testing of amphotericin B, fluconazole and flucytosine. *J. Clin. Microbiol* 33 1104–1107.
- [43] Barry AL, Pfaller MA, Brown SD et al (2000) Quality Control Limits for Broth Microdilution Susceptibility Tests of Ten Antifungal Agents. *J. Clin. Microbiol* 38: 3457-3459.
- [44] Johnson EM. (2008) Issues in antifungal susceptibility testing. *J. Antimicrob. Chemother* 61: 13–18. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm427>
- [45] Lozano-Chiu M, Nelson PW, Lancaster M et al (1997) Lot-to-lot variability of antibiotic medium 3 used for testing susceptibility of *Candida* isolates to amphotericin B. *J. Clin. Microbiol* 35: 270–272.
- [46] Ghannoum MA, Ibrahim AS, Fu Y et al (1992) Susceptibility Testing of *Cryptococcus neoformans*: a Microdilution Technique. *J. Clin. Microbiol* 30: 2881–2886.
- [47] Pfaller MA, Grant C, Morthland V, Rhine-Chalberg J. (1994) Comparative Evaluation of Alternative Methods for Broth Dilution Susceptibility Testing of Fluconazole against *Candida albicans*. *J. Clin. Microbiol* 32: 506–509.
- [48] Rodriguez-tudela JL, Martinez-suarez JV. (1994) Improved Medium for Fluconazole Susceptibility Testing of *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother* 38: 45–48.

- [49] Zaragoza O, Mesa-Arango AC, Gómez-López A et al (2011) Process analysis of variables for standardization of antifungal susceptibility testing of nonfermentative yeasts. *Antimicrob. Agents Chemother* 55: 1563–1570.
- [50] Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA (2017) *Microbiologia médica*. Elsevier, Rio de Janeiro.
- [51] Broach JR. (2012) Nutritional control of growth and development in yeast. *Genetics* 192: 73–105.
- [52] Young TW (1999) *Brewing Microbiology*. A Chapman & Hall Food Science Book, London.
- [53] Jastrzębowska K, Gabriel I. (2015) Inhibitors of amino acids biosynthesis as antifungal agents. *Amino Acids* 47: 227–249.
- [54] Lee KL, Buckley HR, Campbell CC. (1975) An amino acid liquid synthetic medium for the development of mycelial and yeast forms of *Candida albicans*. *Sabouraudia* 13: 148–153.
- [55] McCoy TA, Maxwell M, Kruse Jr PF. (1959) Amino acid requirements of the novikoff hepatoma in vitro. *Exp. Biol. Med* 100: 115–118.
- [56] Moore GE, Mount D, Tara G, Schwartz N. (1963) Growth of Human Tumor Cells in Suspension Cultures. *AACR Journals Arch* 23: 1735–1741.
- [57] Radetsky M, Wheeler RC, Roe MH, Todd JK. (1986) Microtiter Broth Dilution Method for Yeast Susceptibility Testing with Validation by Clinical Outcome. *J. Clin. Microbiol* 24: 600–606.
- [58] Rex JH, Cooper CR, Merz WG et al (1995) Detection of amphotericin B-resistant *Candida* isolates in a broth-based system. *Antimicrob. Agents Chemother* 39: 906–909.
- [59] Cuenca-Estrella M, Díaz-Guerra TM, Mellado E, Rodríguez-Tudela JL. (2001) Detection of resistance to amphotericin B in *Candida* isolates by using Iso-Sensitest broth. *Antimicrob. Agents Chemother* 45: 2070–2074.
- [60] Cruz R.C, Werneck SMC, Oliveira CS et al (2013) Influence of different media, incubation times, and temperatures for determining the MICs of seven antifungal agents against *paracoccidioides brasiliensis* by microdilution. *J. Clin. Microbiol* 51: 436–443.
- [61] Goughenour KD, Balada-Llasat JM, Rappleye CA. (2015) Quantitative microplate-based growth assay for determination of antifungal susceptibility of *Histoplasma capsulatum* yeasts. *J. Clin. Microbiol* 53: 3286–3295.
- [62] Peano A, Pasquetti M, Tizzani P et al (2017) Methodological Issues in Antifungal Susceptibility Testing of *Malassezia pachydermatis*. *J. Fungi* 3: 2–15.

<https://doi.org/10.3390/jof3030037>

- [63] Ferreira CMH, Pinto ISS, Soares EV, Soares HMVM. (2015) (Un)suitability of the use of pH buffers in biological, biochemical and environmental studies and their interaction with metal ions-a review. *RSC Adv* 5: 30989–31003.
- [64] Will MA, Clark NA, Swain JE. (2011) Biological pH buffers in IVF : help or hindrance to success. *J Assist Reprod Genet* 28: 711–724.
- [65] Gadea I, Cuenca M, Gegúndez MI et al (1997) Effect of pH and buffer system on the in-vitro activity of five antifungals against yeasts. *J. Antimicrob. Chemother* 39: 453–459. <https://doi.org/10.1093/jac/39.4.453>
- [66] McIntyre KA, Galgiani JN. (1989) pH and other effects of the antifungal activity of cilofungin (LY121019). *Antimicrob. Agents Chemother* 33: 731–735.
- [67] Arthington-Skaggs BA, Warnock DW, Morrison CJ. (2000) Quantitation of *Candida albicans* Ergosterol Content Improves the Correlation between In Vitro Antifungal Susceptibility Test Results and In Vivo Outcome after Fluconazole Treatment in a Murine Model of Invasive Candidiasis. *Antimicrob. Agents Chemother* 44: 2081–2085.
- [68] Kaya E, Özbilge H. (2012) Determination of the effect of fluconazole against *Candida albicans* and *Candida glabrata* by using microbroth kinetic assay. *Turk J Med Sci* 42: 325–328.
- [69] Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK. (2016) Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J. Pharm. Anal* 1: 671–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- [70] Kuhn DM, Balkis M, Chandra J et al (2003) Uses and Limitations of the XTT Assay in Studies of *Candida* Growth and Metabolism. *J. Clin. Microbiol* 41: 506–508.
- [71] Stoppa MA, Casemiro LA, Vinholis AHC et al (2009) Estudo comparativo entre as metodologias preconizadas pelo CLSI e pelo EUCAST para avaliação da atividade antifúngica. *Quim. Nova* 32: 498–502.
- [72] Arikan S. (2007) Current status of antifungal susceptibility testing methods. *Med. Mycol* 45: 569–587. <https://doi.org/10.1080/13693780701436794>
- [73] Monteiro MC, Cruz ML, Cantizani J et al (2012) A New Approach to Drug Discovery: High-Throughput Screening of Microbial Natural Extracts against *Aspergillus fumigatus* using resazurin. *J. Biomol. Screen* 17: 542–549. <https://doi.org/10.1177/1087057111433459>.

2. OBJETIVOS

3.1 Geral

Investigar a influência de modificações na técnica de microdiluição em caldo (CLSI M27-A3) na determinação de sensibilidade de leveduras patogênicas frente ao fluconazol.

3.2 Específicos

- Investigar e reunir a literatura especializada sobre a técnica de microdiluição em caldo para leveduras e discutir sobre as limitações da Norma M27-A3;
- Estudar a influência de diferentes meios de crescimento, solução tampão, concentração do inóculo, tempo de incubação e forma de leitura na CIM das leveduras frente ao fluconazol;
- Comparar os resultados da CIM de fluconazol obtidos pelo método referência (protocolo M27-A3), com os resultados obtidos por modificações alternativas deste protocolo;
- Encontrar modificações vantajosas que tornem o teste de suscetibilidade a antifúngicos economicamente viável.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Delineamento experimental

A determinação da suscetibilidade das cepas ao fluconazol seguiu as condições do método de microdiluição em caldo (Norma M27-A3) realizado de acordo com o CLSI. A partir das condições do protocolo M27-A3, experimentos univariados foram realizados para estudar a influência de diferentes fatores (meio de crescimento, solução tampão, concentração do inóculo, tempo de incubação e forma de leitura do ponto final) na CIM das leveduras contra o antifúngico fluconazol. Quando uma variável foi estudada, as demais foram fixadas como constantes. A figura 2 apresenta o fluxo resumido das etapas que foram executadas.

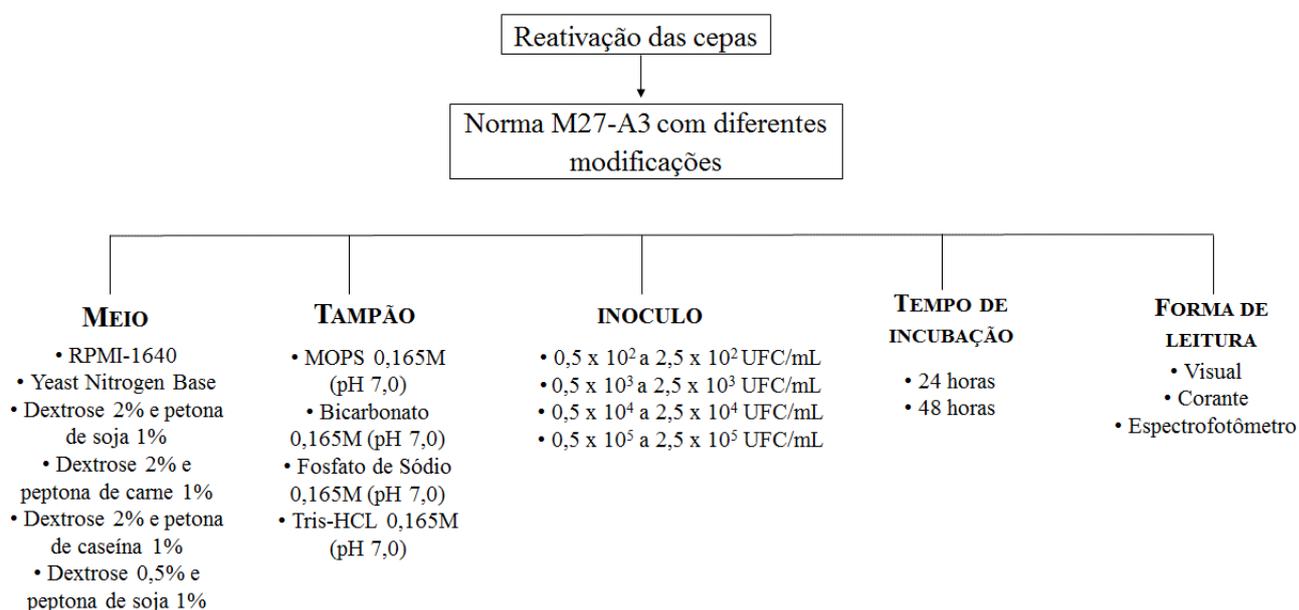


Figura 2 - Fluxograma das atividades realizadas no projeto.

Os itens com o símbolo (*) são os padronizados pelo CLSI para a metodologia de microdiluição.

Fonte: autor.

3.2 Agente antifúngico

A solução estoque concentrada de fluconazol (Iberoquímica Magistral, Jundiaí, Brazil) foi preparada de acordo com as recomendações do fabricante e armazenada a -20 ° C até ser usada.

4.3 Micro-organismos

C. albicans (ATCC 60193 e 36232), *C. glabrata* (ATCC 2001), *C. guilliermondi* (ATCC 6260), *C. tropicalis* (ATCC 13803 e 750), *C. krusei* (ATCC 34135), *Cryptococcus neoformans* (WM148, sorotipo A, VNI), *Cryptococcus neoformans* (WM628, sorotipo AD, VNIII) e oito isolados clínicos, obtidos de amostras biológicas de pacientes diagnosticados na Fundação de Medicina Tropical – Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HDV), em Manaus, Amazonas, Brasil, foram utilizados para investigação da influência dos fatores.

O acesso dos isolados clínicos foi autorizado pelo Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) – Processo N° 907497183.0000.0005. *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida krusei* ATCC 6258 foram incorporadas como cepas controle de qualidade (CQ) em cada conjunto de experimento (CLSI, 2008).

4.4 Teste de microdiluição em caldo

As determinações da CIM ($\mu\text{g/mL}$) de fluconazol frente as leveduras avaliadas foi utilizada a norma M27-A3 (CLSI, 2008). Resumidamente, 100 μL de cada meio de cultura testado foram dispensados em todos os poços da microplaca. Posteriormente, as concentrações de fluconazol foram dispensadas nos poços das linhas 1 a 10 das placas de microdiluição em volumes de 100 μL com uma pipeta multicanal. A fileira 1 continha a concentração mais alta da droga (64 $\mu\text{g/mL}$) e a fileira 10 continha a menor diluição da droga (0,125 $\mu\text{g/mL}$). As placas de microdiluição foram armazenadas dentro de sacos plásticos a -70 ° C até serem usadas. Cada poço foi inoculado no dia do teste com 100 μL da correspondente suspensão do inóculo de cada uma das cepas testadas. Para cada placa

do teste, foram incluídos dois controles isentos de fármaco, um poço com 100 µL do meio mais 100µL de suspensão do inóculo correspondente (controle de crescimento) e o outro poço somente com o meio estéril livre de drogas e de inóculo (controle da esterilidade), fileira 11 e 12, respectivamente.

As placas de microdiluição foram incubadas à temperatura de 35 °C e lidas após 24 horas para *Candida* sp. e 48 horas para *Cryptococcus* sp., exceto quando a variável tempo de incubação foi estudada. Os organismos CQ também foram testados da mesma maneira e foram incluídos cada vez que um conjunto de isolados foi testado.

4.5 Procedimento experimental

O teste de sensibilidade à microdiluição em caldo foi realizado conforme protocolo padrão (CLSI, 2008), com condições de teste modificadas para experimentos específicos, conforme descrito a seguir. Todos os procedimentos foram realizados em duplicata para cada micro-organismo testado.

4.5.1 Meio de crescimento

Os meios avaliados em substituição ao RPMI-1640 foram:

- a) Yeast Nitrogen Base (YNB);
- b) Dextrose 20 g/L e peptona de carne 10 g/L;
- c) Dextrose 20 g/L e peptona de soja 10 g/L;
- d) Dextrose 20 g/L e peptona de caseína 10 g/L;
- e) Dextrose 5 g/L e peptona de soja 10 g/L.

YNB foi preparado conforme recomendado pelo laboratório Difco (Detroit, Mich) e todas as peptonas eram do laboratório Himédia (Índia, Mumbai). Todos os meios foram tamponados para pH 7,0 com tampão 0,165 M de MOPS (ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico) e foram esterilizados por filtração usando uma membrana de 0,22mm (Millipore) ou autoclavados, quando necessário.

4.5.2 Solução Tampão

O meio RPMI-1640 foi tamponado a pH 7,0 com MOPS (Sigma Aldrich Química) em todos os testes, exceto quando a variável tampão foi estudada. Neste caso, em substituição ao tampão MOPS (0,165M) da norma, as soluções tampão tris-HCl, fosfato de sódio ou bicarbonato de sódio foram investigadas. Todos foram adicionados ao meio RPMI-1640 para produzir uma concentração de 0,165M (CINTYRE; GALGIANI, 1989; GADEA et al., 1997).

4.5.3 Concentração do inóculo

A fim de comparar a influência do tamanho do inóculo na concentração inibitória mínima das leveduras, placas de microdiluição foram inoculadas com 100 mL dos seguintes inóculos finais: (i) $2,5 \times 10^2$ células/mL, (ii) $2,5 \times 10^3$ células/mL (tamanho considerado ideal para o teste de suscetibilidade), (iii) $2,5 \times 10^4$ células/mL e (iv) $2,5 \times 10^5$ células/mL.

Antes de realizar o teste, para verificar a pureza e a viabilidade, os isolados de levedura foram cultivados em tubos contendo ágar Sabouraud dextrose a 35 ° C por 24 horas para *Candida* sp. e 48 horas para *Cryptococcus* sp. Os inóculos foram preparados colhendo-se cinco colônias de 21 mm de diâmetro das culturas e suspendendo o material em 5 ml de solução salina estéril a 0,85%. A suspensão resultante foi agitada no vórtice por 15 s, e a densidade celular foi ajustada pelo método espectrofotométrico (CLSI 2008; PFALLER, 1988).

4.5.4 Tempo de incubação

Para avaliar a variável tempo de incubação, placas contendo meio RPMI-1640 foram incubadas a 35 ° C seguindo a metodologia Padrão M27-A3 (CLSI, 2008) e as leituras visuais foram realizadas após 24 e 48 horas para todas as linhagens testadas.

4.5.5 Forma de leitura do ponto final

Após 24 horas de incubação, utilizando meio RPMI-1640, as leituras com corante Resazurina 0,04% (Sigma-Aldrich®) e com leitor espectrofotométrico (RBK 3.500 A) foram investigadas em substituição a leitura visual preconizada no protocolo M27-A3, onde é observada presença ou ausência de crescimento visível na placa (CLSI, 2008).

Na determinação com o auxílio do corante Resazurina 0,04% (Sigma-Aldrich®), o ponto final foi considerado onde o crescimento microbiano era visivelmente detectável pelo corante (STOPPA, 2009) e na determinação por leitura espectrofotométrica do ponto final, a CIM foi considerada onde se obteve uma leitura com absorvância igual ou inferior a 50% em comparação ao poço onde houve o crescimento da levedura, ou seja, o controle positivo (EUCAST, 2015).

4.6 Análise dos resultados

Foi realizada uma análise de correlação pareada entre as CIMs obtidas para o fluconazol, referente aos organismos testados, contrastando os valores gerados pelo método de referência com os obtidos com os métodos alternativos. De acordo com o critério adotado, as CIM obtidas pelos métodos alternativos foram consideradas equivalentes ao método de referência quando ambas apresentaram exatamente o mesmo valor ou diferença de apenas 1 diluição, ou seja, valor de referência ± 1 diluição (COLOMBO, 1995).

4. RESULTADOS

Os resultados do presente trabalho encontram-se expostos na forma de artigo original, o qual será submetido à revista *Medical mycology*. Logo, apresentam-se nessa dissertação com a formatação exigida pela revista, porém aqui, na língua portuguesa.

Avaliação da influência de diferentes condições no teste de suscetibilidade a antifúngicos norma CLSI M27-A3

Edinaira Sulany Oliveira de Sousa¹; Silviane Bezerra Pinheiro¹; Ana Cláudia Alves Cortez²; Marcia de Souza Carvalho Melhem³ João Vicente Braga de Sousa²

1. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal do Amazonas – UFAM. Amazonas, Brasil
2. Departamento de Microbiologia Médica, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia – INPA. Av. André Araújo, Amazonas, Brasil
3. Departamento de Micologia, Instituto Adolfo Lutz. Av. Dr. Arnaldo, São Paulo, Brasil

RESUMO

Uma das principais críticas à metodologia de estudo da atividade antifúngica padronizada pela Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) – protocolo M27-A3 é o custo do meio de crescimento RPMI-1640 e do tampão MOPS (ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico). Devido à essas limitações, o presente trabalho teve como objetivo investigar a influência de modificações na técnica de microdiluição em caldo (CLSI, protocolo M27-A3) na determinação de sensibilidade de leveduras ao fluconazol. Para avaliar esse objetivo foram realizados ensaios univariados modificando o ensaio preconizado pela CLSI protocolo M27-A3. Leveduras utilizadas nos ensaios pertenceram aos gêneros *Candida* e *Cryptococcus*. As modificações feitas no protocolo M27-A3 foram: a) mudança de meio de cultura (cinco meios foram avaliados: o meio YNB e

quatro diferentes variações da composição de Sabouraud); b) tipo de tampão (bicarbonato de sódio, tris-HCL e fosfato), concentração do inóculo (10^2 , 10^4 , 10^5 células/mL), tempo de incubação (24 e 48 h) e forma de leitura (visual, corante e espectrofotômetro) na CIM das leveduras frente ao fluconazol. A partir do conhecimento obtido nos experimentos univariados um novo protocolo foi proposto: a) meio de cultivo: dextrose 5 g/L e peptona de soja 10 g/L; b) tampão: Tris-HCl; c) inóculo de $0,5-2,5 \times 10^3$, d) ensaio de 24 h para *Candida* spp e 48hs para *Cryptococcus neoformans* e e) leitura visual direta. A análise de variância demonstrou regressão de 95% comparando-se os resultados da CIM de 19 leveduras submetidas ao antifungigrama pelo protocolo da CLSI e o proposto no presente estudo. Esses resultados são importantes e robustos e apresentam uma opção mais acessível para a realização dos ensaios de antifungigrama.

Palavras-chave: levedura, microdiluição, RPMI-1640

Introdução

Devido ao aumento das infecções fúngicas e à emergência de fungos resistentes a medicamentos, métodos padronizados foram desenvolvidos a fim de investigar a suscetibilidade desses agentes a antifúngicos ¹. Atualmente, o Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), dos Estados Unidos, permite investigar a concentração inibitória mínima (CIM) das principais espécies de leveduras oportunistas por meio da norma M27-A3. Logo, a CIM permite determinar se o fungo é suscetível, dose-dependente ou resistente e pode, então, nortear a escolha do agente terapêutico mais adequado e/ou prever a chance de sucesso do esquema terapêutico ², tornando-se uma potencial ferramenta para orientar o tratamento de doenças fúngicas.

A diretriz atual recomenda testar a suscetibilidade das leveduras usando um método de microdiluição em placa, contendo caldo RPMI-1640 e tamponado a pH 7,0 com MOPS (ácido 3-N morfolinopropanossulfônico). No entanto, apesar do protocolo M27-A3 do CLSI ser uma norma padrão amplamente aceita na determinação da suscetibilidade ³, em laboratórios de pesquisas e de rotina tem sido criticada visto que, devido ao alto custo para aquisição do meio de cultura RPMI-1640 e do tampão 3-(N-

morpholino)-propanesulfonic acid (MOPS), utilizados no teste antifúngico, o método torna-se frequentemente de difícil execução em laboratórios clínicos de rotina e pesquisas. Além disso, a escolha por parte do comitê quanto ao meio de cultura e tampão utilizados no teste antifúngico não ficou tão clara e estabelecida ⁴ e não se encontra na literatura recente estudos que busquem o uso de outros meios de crescimento no teste de suscetibilidade a antifúngicos. Sendo assim, a necessidade de investigar o uso de meios de cultura e tampão alternativos e tornar o teste de suscetibilidade a antifúngicos economicamente viável sustentaram o presente estudo.

Investigou-se primeiro a influência de modificações alternativas ao método referência (protocolo M27-A3) na determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fluconazol frente a leveduras patogênicas. Em um segundo conjunto de experimentos, analisou-se a influência combinada dessas modificações na determinação das CIM de fluconazol e comparou-se essas CIM com as determinadas pelo método de microdiluição padrão do CLSI. Os detalhes e as descobertas dessas análises são o assunto deste trabalho.

Materiais e métodos

Antifúngico

A solução estoque concentrada de fluconazol (Iberoquímica Magistral, Jundiaí, Brazil) foi preparada e armazenada a -20 ° C até ser usada.

Isolados e cepas padrão

C. albicans (ATCC 60193 e 36232), *C. glabrata* (ATCC 2001), *C. guilliermondi* (ATCC 6260), *C. tropicalis* (ATCC 13803 e 750), *C. krusei* (ATCC 34135), *Cryptococcus neoformans* (WM148, sorotipo A, VNI), *Cryptococcus neoformans* (WM628, sorotipo AD, VNIII) e oito isolados clínicos, obtidos de amostras biológicas de pacientes diagnosticados na Fundação de Medicina Tropical – Doutor Heitor Vieira

Dourado (FMT-HDV), em Manaus, Amazonas, Brasil, foram utilizados para investigação da influência dos fatores.

Candida parapsilosis ATCC 22019 e *Candida krusei* ATCC 6258 foram incorporadas como cepas controle de qualidade (CQ) em cada conjunto de experimento ⁵.

Delineamento experimental

A determinação da suscetibilidade das cepas ao fluconazol seguiu as condições do método de microdiluição em caldo (Norma M27-A3) realizado de acordo com o CLSI. A partir das condições padrões do protocolo M27-A3, experimentos univariados foram realizados estudando a influência de fatores (meio de crescimento, solução tampão, concentração do inóculo, tempo de incubação e forma de leitura do ponto final) na CIM ($\mu\text{g/mL}$) do fluconazol frente as cepas e isolados.

Teste de microdiluição em caldo – Norma M27-A3

Os testes foram realizados de acordo com a Norma M27-A3 ⁵. Volumes de 100 μL de cada meio de cultura foram dispensados em todos os poços da microplaca (placa descartável de 96 poços). Posteriormente, as concentrações de fluconazol foram dispensadas nos poços das linhas 1 a 10 das placas de microdiluição em volumes de 100 μL com uma pipeta multicanal. A fileira 1 continha a concentração mais alta da droga (64 $\mu\text{g/mL}$) e a fileira 10 continha a menor diluição da droga (0,125 $\mu\text{g/mL}$). As placas de microdiluição foram armazenadas dentro de sacos plásticos a -70°C até serem usadas. Cada poço foi inoculado no dia do teste com 100 μL da correspondente suspensão do inóculo de cada uma das cepas testadas. Para cada placa do teste, foram incluídos dois controles isentos de fármaco, um poço com 100 μL do meio mais 100 μL de suspensão do inóculo correspondente (controle de crescimento) e o outro poço somente com o meio estéril livre de drogas e de inóculo (controle da esterilidade), fileira 11 e 12, respectivamente.

As placas de microdiluição foram incubadas à temperatura de 35°C e lidas após 24 horas para *Candidas* sp. e 48 horas para *Cryptococcus* sp, exceto quando a variável tempo

de incubação foi estudada. Os organismos CQ também foram testados da mesma maneira e foram incluídos cada vez que um conjunto de isolados foi testado.

Experimentos univariados

Meio de crescimento

Os meios avaliados em substituição ao RPMI-1640 foram:

- a) Yeast Nitrogen Base (YNB);
- b) Dextrose 20 g/L e peptona de carne 10 g/L;
- c) Dextrose 20 g/L e peptona de soja 10 g/L;
- d) Dextrose 20 g/L e peptona de caseína 10 g/L;
- e) Dextrose 5 g/L e peptona de soja 10 g/L.

YNB foi preparado conforme recomendado pelo laboratório Difco (Detroit, Mich) e todas as peptonas eram do laboratório Himédia (Índia, Mumbai). Todos os meios foram tamponados para pH 7,0 com tampão 0,165 M de MOPS (ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico) e foram esterilizados por filtração usando uma membrana de 0,22 (Millipore) ou autoclavados, quando necessário.

Solução Tampão

Em substituição ao tampão MOPS (0,165M) da norma, foi investigada a influência das soluções tampão tris-HCl, fosfato de sódio ou bicarbonato de sódio. Todos foram adicionados ao meio RPMI-1640 para produzir uma concentração de 0,165M^{6,7}.

Concentração do inóculo

A fim de comparar a influência do tamanho do inóculo na concentração inibitória mínima das leveduras, placas de microdiluição foram inoculadas com 100 mL dos seguintes inóculos finais: (i) $2,5 \times 10^2$ células/mL, (ii) $2,5 \times 10^3$ células/mL (tamanho

considerado ideal para o teste de suscetibilidade), (iii) $2,5 \times 10^4$ células/mL e (iv) $2,5 \times 10^5$ células/mL.

Tempo de incubação

Para avaliar a variável tempo de incubação, placas contendo meio RPMI-1640 foram incubadas a 35 °C seguindo a metodologia Padrão M27-A3⁵ e as leituras visuais foram realizadas após 24 e 48 horas para todas as linhagens testadas.

Forma de leitura do ponto final

As leituras com corante Resazurina 0,04% (Sigm-Aldrich) e com leitor espectrofotométrico (RBK 3.500 A) foram investigadas em substituição a leitura visual preconizada no protocolo M27-A3⁵.

Na determinação com o auxílio do corante, o ponto final foi considerado onde o crescimento microbiano era visivelmente detectável pelo corante⁸, pois a resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido) de cor azul é oxidada na presença de células viáveis à resofurina, substância de coloração vermelha, facilitando a verificação da presença de crescimento microbiano. Na determinação por leitura espectrofotométrica, as CIMs foram consideradas onde se obteve uma leitura com absorbância igual ou inferior a 50% em comparação ao controle positivo⁹.

Análise dos resultados

Foi realizada uma análise de correlação pareada entre as CIMs obtidas para o fluconazol, referente aos organismos testados, contrastando os valores gerados pelo método de referência com os obtidos com os métodos alternativos. De acordo com o critério adotado, as CIM obtidas pelos métodos alternativos foram consideradas

equivalentes ao método de referência quando ambas apresentaram exatamente o mesmo valor ou diferença de apenas 1 diluição, ou seja, valor de referência ± 1 diluição ¹⁰

Resultados

Efeito do meio de crescimento

Experimentos foram realizados com a finalidade de investigar a substituição do meio de cultura RPMI-1640 na determinação da CIM de fluconazol frente a fungos patogênicos. A Tabela 2 apresenta o resultado da CIM do fluconazol frente a diferentes cepas padrões em diferentes meios de cultura. Com exceção do caldo Sabouraud contendo peptona de caseína, os diferentes meios de cultivo avaliados resultaram em resultados similares de CIM aos ensaios realizados com o meio padrão RPMI.

Tabela 2 - Efeito do meio de crescimento na CIM de quatro isolados de *Candida* spp. frente ao fluconazol.

Micro-organismos	ATCC ^a n°	CIM de Fluconazol ($\mu\text{g}/\text{mL}$) em cada meio testado					
		RPMI 1640	YNB ^b	Sabouraud dextrose modificado			
				Dextros e 20 g/L e Peptona de soja 10 g/L ^c	Dextros e 20 g/L e Peptona de carne 10 g/L ^c	Dextrose 20 g/L e Peptona de caseína 10 g/L ^c	Dextrose 5 g/L e Peptona de soja 10 g/L ^c
<i>C. albicans</i>	60193	0,12 5	0,12 5	0,12 5	0,12 5	0,25	0,125
<i>C. tropicalis</i>	750	0,25	0,25	0,25	0,25	0,5	0,25
<i>C. krusei</i>	6258	8	8	8	8	8	8
<i>C. parapsilosis</i>	22019	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

^aATCC, American Type Culture Collection; ^bYNB, yeast nitrogen base medium. ^cPeptonas usadas eram do laboratório Himédia. Referências CIMs foram determinadas pelo método de microdiluição de caldo – Norma M27-A3, incubação 35°C, 24 horas. Todos os meios foram tamponados a pH 7,0 usando MOPS 0,165M.

Efeito da solução tampão

Investigou-se a substituição do tampão da norma (MOPS) pelos tampões: tris-HCl, fosfato e bicarbonato. Todos as soluções estavam com a concentração 0,165M e pH 7. Os ensaios com tampão Tris-HCl resultaram em resultados similares de CIM aos ensaios realizados com o tampão padrão MOPS (Tabela 3).

Tabela 3 - Efeito do sistema tampão na CIM de quatro isolados de *Candida* spp. frente ao fluconazol.

Micro-organismos	ATCC n°	CIM de fluconazol ($\mu\text{g} / \text{mL}$) em RPMI-1640			
		tamponado com:			
		MOPS	Bicarbonato 0,15%	Fosfato	Tris-HCL
<i>C. albicans</i>	60193	0,125	- ^b	0,125	0,125
<i>C. tropicalis</i>	750	0,25	-	0,25	0,25
<i>C. krusei</i>	6258	8	-	8	8
<i>C. parapsilosis</i>	22019	0,5	-	1	0,5

^aATCC, American Type Culture Collection; ^bnão houve crescimento; Referências CIMs foram determinadas pelo método de microdiluição de caldo – Norma M27-A3, incubação 35°C, por 24 horas. Todos os meios foram tamponados a pH 7,0 usando as respectivas solução tampão descritas na tabela.

Efeito do tamanho do inóculo

Foi investigada a influência da concentração de inóculo (células/mL) na CIM de fluconazol frente a leveduras. A norma Norma M27-A3 preconiza em seus ensaios um inóculo de $2,5 \times 10^3$ células/mL. Os resultados desse ensaio (Tabela 4) permitem concluir que as diferenças logarítmicas na concentração de células promovem diferenças significativas na CIM. Sendo que, a concentração de 1×10^3 células/mL foi a única que resultou em resultados similares ao protocolo padrão.

Tabela 4 - Efeito do tamanho do inóculo na CIM de quatro isolados de *Candida* spp. frente ao fluconazol.

Micro-organismos	ATCC ^a n°	CIM de fluconazol ($\mu\text{g} / \text{mL}$) em RPMI-1640 com tamanho de inóculo de:			
		$2,5 \times 10^3$	$2,5 \times 10^2$	$2,5 \times 10^4$	$2,5 \times 10^5$
		células	células	células	células
<i>C. albicans</i>	60193	0,125	0,125	0,125	≥ 64
<i>C. tropicalis</i>	750	0,25	- ^b	0,5	≥ 64
<i>C. krusei</i>	6258	8	-	32	32
<i>C. parapsilosis</i>	22019	0,5	-	2	≥ 64

^aATCC, American Type Culture Collection; ^bnão houve crescimento; Referências CIMs foram determinadas pelo método de microdiluição de caldo – Norma M27-A3, utilizando meio RMPI-1640 tamponado (MOPS 0,165M) pH 7,0 a 35° C e após 24 horas de crescimento.

Tempo de incubação do ensaio

Foi investigada a influência do tempo de incubação do ensaio na CIM de fluconazol frente a leveduras. A norma M27-A3 preconiza em seus ensaios um tempo de incubação de 48 horas para organismos do gênero *Candida*. O tempo de incubação de 48 horas promoveu CIM diferentes às observadas em 24 horas com cepas *C. krusei* ATCC 6258 e *C. parapsilosis* ATCC 22019 (Tabela 5).

Tabela 5 - Efeito do tempo de incubação na CIM de quatro isolados de *Candida* spp.

Micro-organismos	ATCC ^a n°	CIM de Fluconazol ($\mu\text{g} / \text{mL}$) em RPMI-1640	
		24 horas	48 horas
<i>C. albicans</i>	60193	0,125	0,125
<i>C. tropicalis</i>	750	0,25	0,25
<i>C. krusei</i>	6258	8	16
<i>C. parapsilosis</i>	2019	0,5	1

^aATCC, American Type Culture Collection; Referências CIMs foram determinadas pelo método de microdiluição de caldo – Norma M27-A3, utilizando meio RMPI-1640 tamponado (MOPS 0,165M) pH 7,0 a 35° C.

Forma de leitura do ponto final

Foi investigada a influência do tipo de leitura do ensaio na CIM de fluconazol frente a leveduras. A norma M27-A3 preconiza a leitura visual direta. A leitura com o corante biológico (resazurina) ou por espectrometria resultaram em resultados de CIM muito semelhantes aos observados pela leitura direta (Tabela 6).

Tabela 6 - Comparação de três formas de leitura na determinação da CIM de fluconazol contra cepas de *Candida* spp.

Micro-organismos	ATCC ^a n°	CIM ^a de fluconazol (µg / mL) na leitura:		
		Visual	Corante	Espectrofotômetro
<i>C. albicans</i>	60193	0,125	0,125	0,125
<i>C. tropicalis</i>	750	0,25	0,5	0,25
<i>C. krusei</i>	6258	8	16	8
<i>C. parapsilosis</i>	22019	0,5	0,5	1

^aATCC, American Type Culture Collection; Referências CIMs foram determinadas pelo método de microdiluição de caldo – Norma M27-A3, utilizando meio RMPI-1640 tamponado (MOPS 0,165M) pH 7,0 a 35° C.

Teste de suscetibilidade a antifúngicos usando Sabouraud dextrose

Com a finalidade de apresentar um protocolo alternativo a CLSI norma M27-A3 foi realizado um experimento que avaliou a CIM de 19 leveduras por três protocolos distintos: a) CLSI norma M27-A3, b) Protocolo Sabouraud 0,5% dextrose e c) Protocolo Sabouraud 2% dextrose (Tabela 7).

Tabela 7 - Metodologia CLSI versus metodologia para laboratórios com recursos limitados para testes de suscetibilidade antifúngica por leitura visual.

	CLSI M27-A3	SAB 0,5% dextrose	SAB 2% dextrose
Formato	Microdiluição	Microdiluição	Microdiluição
Meio	RPMI-1640	Dextrose 5 g/L e peptona de soja 10 g/L	Dextrose 20 g/L e peptona de soja 10 g/L
Tampão	MOPS	Tris-HCl	Tris-HCl
Teor de glicose	0,2%	0,5%	2%
Tamanho do inóculo	0,5-2,5 x10 ³	0,5-2,5 x10 ³	0,5-2,5 x10 ³
Tempo de incubação	48h (<i>Candida</i> spp.) 72h (<i>C. neoformans</i>)	24 h (<i>Candida</i> spp.) 48 h (<i>C. neoformans</i>)	24 h (<i>Candida</i> spp.) 48 h (<i>C. neoformans</i>)

As diferenças entre os dois métodos estão em negrito. Sabouraud dextrose modificado foi preparado com 10 g de peptona de soja (Himédia Laboratories). As suscetibilidades foram determinadas utilizando meio RPMI-1640 sem glicose tamponado com MOPS 0,165M e Sabouraud dextrose tamponado com Tris-HCL 0,165M, ambos pH 7,0 a 35° C.

Considerando que o resultado do meio de cultura testado seria tido como equivalente ao meio de cultura de referência quando ambos apresentassem exatamente o mesmo valor da CIM ou diferença de apenas 1 diluição, a taxa de concordância usando caldo Sabouraud dextrose 5g/L, entre as 19 espécies de leveduras testadas, foi de 94,7%. Segundo esse critério, a única espécie divergente nos resultados da CIM foi *Candida parapsilosis*. A CIM para esse isolado foi de 2 µg/mL usando Sabouraud dextrose, mas de 0,5 µg/mL pelo meio de referência, RPMI-1640. Os valores das CIMs conforme determinadas usando os três meios de cultura estão ilustradas na Tabela 8.

Tabela 8 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) in vitro de fluconazol, frente a 19 leveduras, utilizando meio RPMI-1640 tamponado com MOPS e meio Sabouraud dextrose tamponado com tris-HCl.

Micro-organismos	n° ATCC/ isolado	CIM de fluconazol ($\mu\text{g} / \text{mL}$) em:		
		RPMI 1640 com MOPS	Sabouraud ^a com Tris HCL (5g de glicose/L)	Sabouraud ^a com Tris-HCL (20 g de glicose/L)
<i>C. albicans</i>	60193	0,125	0,125	0,5
<i>C. albicans</i>	36232	0,125	0,125	1
<i>C. glabrata</i>	2001	1	2	32
<i>C. guilliermondi</i>	6260	0,125	0,125	2
<i>C. tropicalis</i>	13803	0,125	0,125	2
<i>C. tropicalis</i>	750	0,25	0,25	2
<i>C. krusei</i>	34135	8	16	≥ 64
<i>C. krusei</i>	6258	8	8	≥ 64
<i>C. parapsilosis</i>	22019	0,5	2	16
<i>C. neoformans</i>	VNI	4	4	32
<i>C. neoformans</i>	VNIII	4	4	≥ 64
<i>C. neoformans</i>	FMT-366	1	1	≥ 64
<i>C. neoformans</i>	FMT-793	1	1	32
<i>C. neoformans</i>	FMT-545	4	4	≥ 64
<i>C. neoformans</i>	FMT-428	1	1	16
<i>C. neoformans</i>	FMT-69	2	2	16
<i>C. neoformans</i>	FMT-94	2	2	8
<i>C. neoformans</i>	FMT-148	4	4	32
<i>C. neoformans</i>	FMT-272	2	4	≥ 64

^a Sabouraud dextrose foi preparado com 10 g de peptona de soja (Himédia Laboratories). As suscetibilidades foram determinadas utilizando meio RMPI-1640 sem glicose tamponado com MOPS 0,165M e Sabouraud dextrose tamponado com Tris-HCL 0,165M, ambos pH 7,0 a 35° C.

Discussão

Apesar de suas limitações, o método de referência do CLSI para testes de sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica é um marco na evolução da medicina microbiológica e levou ao estabelecimento de pontos de corte interpretativos para os principais antifúngicos ¹¹. Contudo, o alto custo do meio de cultura e do tampão usados no teste são com frequência motivos de críticas.

Neste estudo, o caldo Sabouraud dextrose com peptona de soja mostrou uma capacidade equivalente ao uso do meio RPMI-1640 para determinar a concentração inibitória mínimas das leveduras patogênicas e observou-se que o teste de sensibilidade empregando RPMI-1640 com um tamanho maior de inóculo, a determinação do ponto final espectrofotométrico ou com auxílio de corante e a leitura após um período de incubação de 48 horas não aprimoram as habilidades dos testes de suscetibilidade antimicrobiana

Com exceção do bicarbonato de sódio, os demais sistemas tampão apresentaram resultados equivalentes na determinação da CIM (Tabela 3). Da mesma forma, McIntyre e Galgiani ⁷ observaram que na atividade antifúngica de cilofungina não houve variações nos resultados de suscetibilidade, quando tamponou o meio de cultura SAAMF (*synthetic amino acid medium fungal*) com os sistemas tampão HEPES, MOPS, combinação de MOPS-Tris ou fosfato.

A suplementação com glicose 20g/L influenciou significativamente as CIMs obtidas com caldo Sabouraud dextrose (Tabela 8). Índices de crescimento mais densos e CIMs com frequência acima de 64µg/mL foram obtidas quando o meio foi suplementado nessa concentração. Por outro lado, a suplementação com glicose 5g/L apresentou resultados equivalentes às CIMs determinadas pelo RPMI-1640. Isso é importante uma vez que torna o teste de microdiluição mais viável financeiramente, sobretudo para países de baixa renda, onde esse ensaio é com frequência inacessível ¹².

Com 5g/L de glicose, o único isolado que não estava dentro do critério de equivalência ao método de referência de exatamente o mesmo valor ou diferença de 1 diluição (valor de referência ± 1 diluição), foi *C. parapsilosis*, com CIM de 2 µg/mL usando Sabouraud dextrose, mas de 0,5 µg/mL pelo meio de referência, RPMI-1640.

Apesar disso essa, cepa apresentou, utilizando ambos os meios, o valor de CIM dentro da faixa recomendada na literatura, que é de 0,5-4,0 µg/mL para testes de microdiluição¹³.

Além do caldo Sabouraud dextrose, também escolheu-se testar o meio yeast nitrogen base (YNB), por ser indicado na atual norma para destacar o crescimento de *Cryptococcus neoformans* e melhorar a relevância clínica das CIMs dos agentes antifúngicos. Neste meio, as espécies de *Candida* apresentaram crescimento uniformemente fraco, necessitando com frequência de confirmação da CIM em 48 horas. Isso era esperado, uma vez que segundo Calhoun e colaboradores¹⁴, o YNB a um pH fisiológico (pH \cong 7,3), frequentemente resulta em um prolongado tempo de duplicação para as espécies de *Candida*. Isso pode explicar o crescimento uniformemente fraco dessas cepas neste meio. Além disso, YNB é recomendado sobretudo para espécies de *C. neoformans* e não de *Candidas*⁴.

Um crescimento mais lento dos isolados foi observado nos meios definidos (YNB e RPMI-1640), do que no meio Sabouraud usando qualquer uma das peptonas. Isso estava de acordo com Pfaller e colaboradores⁴, que observaram um crescimento superior dos isolados em meios complexos do que em meios definidos. Ademais, por serem meios filtrados, o preparo do meio YNB, assim como do meio RPMI-1640 era com frequência oneroso.

Em conclusão, os resultados desta investigação indicam que o teste de suscetibilidade antifúngica em microdiluição em caldo, quando realizado de acordo com o protocolo utilizado neste estudo (Tabela 7), fornece resultados de suscetibilidade semelhantes ao uso do meio RPMI-1640. Logo, em laboratórios com recursos limitados, parece razoável usar caldo Sabouraud modificado (dextrose 5 g/L e 10 g/L peptona) tamponado com tris-HCL como meio de teste, 35 °C como a temperatura de incubação e 24 h (*Candida* spp.) ou 48 h (*Cryptococcus neoformans*) como a duração da incubação. Entretanto, testes adicionais com um número maior de micro-organismos serão necessários para avaliar adequadamente a utilização desse meio para testes de suscetibilidade, além de um estudo multicêntrico para avaliar o efeito do meio de cultura nas variações intra e interlaboratoriais nas CIM de fluconazol para as leveduras.

Referências

1. Paredes CVT. Actualización en pruebas de susceptibilidad antifúngica. *Rev Chil Infect.* 2009;26(2):144-150. doi:10.4067/S0716-10182009000200005
2. Hazen KC. Influence of DMSO on antifungal activity during susceptibility testing in vitro. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013;75(1):60-63. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2012.09.002
3. Johnson EM. Issues in antifungal susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother.* 2008;61(SUPPL. 1):13-18. doi:10.1093/jac/dkm427
4. Pfaller MA, Rinaldi MG, Galgiani JN, et al. Collaborative investigation of variables in susceptibility testing of yeasts. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990;34(9):1648-1654. doi:10.1128/AAC.34.9.1648
5. CLSI. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts*; Approved Standard NCCLS Document M27- A3. Wayne, PA; 2008:19087-1898.
6. Gadea I, Cuenca M, Gegúndez MI, Zapardiel J, Valero ML, Soriano F. Effect of pH and buffer system on the in-vitro activity of five antifungals against yeasts. *J Antimicrob Chemother.* 1997;39(4):453-459. doi:10.1093/jac/39.4.453
7. McIntyre KA, Galgiani JN. pH and other effects of the antifungal activity of cilofungin (LY121019). *Antimicrob Agents Chemother.* 1989;33(5):731-735. doi:10.1128/AAC.33.5.731
8. Stoppa MA, Casemiro LA, Vinholis AHC, Cunha WR, Silva MLA, Martins HG. Estudo comparativo Entre as metodologias preconizadas pelo CLSI e pelo EUCAST para avaliação da atividade antifúngica. *Quim Nova.* 2009;32(2):498-502.
9. Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Lass-Flörl C, Hope W. EUCAST technical note on the EUCAST definitive document EDef 7.3: Method for the determination of broth dilution minimum Inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts EDef 7.3 (EUCAST-AFST). *Eucast EDef 73.* 2015;(December):1-21.
10. Colombo AL, Barchiesi F, McGough DA, Rinaldi MG. Comparison of Etest and National Committee for Clinical Laboratory Standards broth macrodilution method for azole antifungal susceptibility testing. *J Clin Microbiol.* 1995;33(3):535-540.

11. Cuenca-Estrella M, Díaz-Guerra TM, Mellado E, Rodríguez-Tudela JL. Detection of resistance to amphotericin B in *Candida* isolates by using Iso-Sensitest broth. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(7):2070-2074. doi:10.1128/AAC.45.7.2070-2074.2001
12. Smith KD, Achan B, Huppler Hullsiek K, et al. Increased Antifungal Drug Resistance in Ugandan Clinical Isolates of *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(12):7197-7204. doi:10.1128/AAC.01299-15
13. Barry AL, Pfaller MA, Brown SD, et al. Quality Control Limits for Broth Microdilution Susceptibility Tests of Ten Antifungal Agents Quality Control Limits for Broth Microdilution Susceptibility Tests of Ten Antifungal Agents. *Society.* 2000;38(9):8-11.
14. Calhoun DL, Galgiani JN. Analysis of pH and Buffer Effects on Flucytosine Activity in Broth Dilution Susceptibility Testing of *Candida albicans* in Two Synthetic Media. *Antimicrob Agents Chemother.* 1984;26(3):364-367.

5. CONCLUSÃO

- Com exceção do caldo Sabouraud contendo peptona de caseína, os diferentes meios de cultivo avaliados resultaram em resultados similares de concentração inibitória mínima aos ensaios realizados com o meio padrão RPMI;
- Os ensaios com tampão Tris-HCl resultaram em resultados similares de CIM aos ensaios realizados com o tampão padrão MOPS;
- A concentração de 1×10^3 células/mL foi a única que resultou em resultados similares ao protocolo padrão;
- Leitura após um período de incubação de 48 horas promoveu CIM diferentes às observadas em 24 horas para as cepas controle *C. krusei* ATCC 6258 e *C. parapsilosis* ATCC 22019;
- A leitura com o corante (resazurina) ou por espectrometria resultaram em resultados de CIM muito semelhantes aos observados pela leitura direta;
- O teste de suscetibilidade antifúngica em microdiluição em caldo, quando realizado de acordo com o protocolo obtido neste estudo (dextrose 5 g/L e peptona de soja 10 g/L, tamponado com Tris-HCl, um tamanho de inóculo de $0,5-2,5 \times 10^3$, ensaio de 24 h para *Candida* spp e 48hs para *Cryptococcus neoformans* e leitura visual direta), fornece resultados de suscetibilidade semelhantes ao uso do meio RPMI-1640.
- O novo protocolo apresenta uma opção mais acessível para a realização dos ensaios de antifungigrama.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALASTRUEY-IZQUIERDO, A. et al. Susceptibility Test for Fungi: Clinical and Laboratorial Correlations in Medical Mycology. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 57, n. Suppl 19, p. 57–64, 2015.

ALBATAINEH, M. T. et al. Update from the Laboratory: Clinical Identification and Susceptibility Testing of Fungi and Trends in Antifungal Resistance. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 1, p. 13–35, 2016.

ARENDRUP, M. C. et al. EUCAST technical note on the EUCAST definitive document EDef 7.3: Method for the determination of broth dilution minimum Inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts EDef 7.3 (EUCAST-AFST). **Eucast E.Def 7.3**, n. December, p. 1–21, 2015.

ARIKAN, S. Current status of antifungal susceptibility testing methods. **Medical Mycology**, v. 45, n. 7, p. 569–587, 2007.

ARTHINGTON-SKAGGS, B. A.; WARNOCK, D. W.; MORRISON, C. J. Quantitation of *Candida albicans* Ergosterol Content Improves the Correlation between In Vitro Antifungal Susceptibility Test Results and In Vivo Outcome after Fluconazole Treatment in a Murine Model of Invasive Candidiasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 8, p. 2081–2085, 2000.

BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; K, I. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of pharmaceutical analysis**, v. 16, n. 1, p. 71–79, 2016.

BARCHIESI, F. et al. Comparative Study of Broth Macrodilution and Microdilution Techniques for In Vitro Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts by Using the National Committee for Clinical Laboratory Standards Proposed Standard. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 10, p. 2494–2500, 1994.

BARRY, A. L. et al. Quality Control Limits for Broth Microdilution Susceptibility Tests of Ten Antifungal Agents Quality Control Limits for Broth Microdilution Susceptibility Tests of Ten Antifungal Agents. **Society**, v. 38, n. 9, p. 8–11, 2000.

BROACH, J. R. Nutritional control of growth and development in yeast. **Genetics**, v. 192, n. 1, p. 73–105, 2012.

CALHOUN, D. L.; GALGIANI, J. N. Analysis of pH and Buffer Effects on Flucytosine Activity in Broth Dilution Susceptibility Testing of *Candida albicans* in Two Synthetic Media. **Antimicrobial Agents and Chemotherap**, v. 26, n. 3, p. 364–367, 1984.

CLSI. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts**; Approved Standard NCCLS document M27- A3. Wayne, PA, 2008.

COLOMBO, A. L. et al. Comparison of Etest and National Committee for Clinical Laboratory Standards broth macrodilution method for azole antifungal susceptibility testing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 535–540, 1995.

COLOMBO, A. L. et al. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. **Medical Mycology**, v. 49, n. 8, p. 785–798, 2011.

CÓRDOBA, S.; AFELTRA, J.; VITALE, R. G. Evaluation of the in vitro activity of amphotericin B by time-kill curve methodology against large and small capsulate *C. neoformans* isolates. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 71, n. 3, p. 260–262, 2011.

CRUZ, R. C. et al. Influence of different media, incubation times, and temperatures for determining the MICs of seven antifungal agents against *Paracoccidioides brasiliensis* by microdilution. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 436–443, 2013.

CUENCA-ESTRELLA, M. et al. Detection of resistance to amphotericin B in *Candida* isolates by using Iso-Sensitest broth. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 7, p. 2070–2074, 2001.

DIAS, K. DE C.; BARBUGLI, P. A.; VERGANI, C. E. Influence of different buffers (HEPES/MOPS) on keratinocyte cell viability and microbial growth. **Journal of Microbiological Methods**, v. 125, p. 40–42, 2016.

DIETER, B. M. P.; KARL-HEINZ, B; GRAHAM, H. A. K. S. Sterol Biosynthesis Inhibitors. **Modern Crop Protection Compounds: Second Edition**, v. 2, p. 761–805, 2012.

ELLIOTT, J.D.H. AND D. M. Combined activity of amphotericin B and 5-fluorocytosine against *Cryptococcus neoformans* in vitro and in vivo in mice. **The Journal of infectious diseases**, v. 131, n. 2, p. 129–137, 1975.

ESPINEL-INGROFF, A. et al. Collaborative comparison of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 12, p. 3138–3145, 1992.

FASS, R. J. 5-Fluorocytosine in the Treatment of Cryptococcal and Candida Mycoses. **Annals of Internal Medicine**, v. 74, n. 4, p. 535, 2013.

FERREIRA, C. M. H. et al. (Un)suitability of the use of pH buffers in biological, biochemical and environmental studies and their interaction with metal ions-a review. **RSC Advances**, v. 5, n. 39, p. 30989–31003, 2015.

FLOWERS, S. A. et al. Gain-of-function mutations in UPC2 are a frequent cause of ERG11 upregulation in azole-resistant clinical isolates of *Candida albicans*. **Eukaryotic Cell**, v. 11, n. 10, p. 1289–1299, 2012.

FROMTLING, R. A. et al. Multicenter evaluation of a broth macrodilution antifungal susceptibility test for yeasts. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, n. 1, p. 39–45, 1993.

GADEA, I. et al. Effect of pH and buffer system on the in-vitro activity of five antifungals against yeasts. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 39, n. 4, p. 453–459, 1997.

GARCIA-EFFRON, G.; PARK, S.; PERLIN, D. S. Improved detection of *Candida* sp. fks hot spot mutants by using the method of the CLSI M27-A3 document with the addition of bovine serum albumin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 5, p. 2245–2255, 2011.

GHANNOUM, M. A. et al. Susceptibility Testing of *Cryptococcus neoformans*: a Microdilution Technique. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 11, p. 2881–2886, 1992.

GOUGHENOUR, K. D.; BALADA-LLASAT, J.M.; RAPPLEYE, C.A. Quantitative microplate-based growth assay for determination of antifungal susceptibility of histoplasma capsulatum yeasts. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 10, p. 3286–3295, 2015.

HAZEN, K. C. Influence of DMSO on antifungal activity during susceptibility testing in vitro. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 75, n. 1, p. 60–63, 2013.

HOSPENTHAL, D. R.; MURRAY, C. K.; RINALDI, M. G. The role of antifungal susceptibility testing in the therapy of candidiasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 48, n. 3, p. 153–160, 2004.

JASTRZĘBOWSKA, K.; GABRIEL, I. Inhibitors of amino acids biosynthesis as antifungal agents. **Amino Acids**, v. 47, n. 2, p. 227–249, 2015.

JOHN F. RYLEY, R. G. W. A. K. J. B.-B. Azole resistance in *Candida albicans*. **Medical Mycology**, v. 24, n. 2, p. 133–144, 1986.

JOHNSON, E. M. Issues in antifungal susceptibility testing. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n. SUPPL. 1, p. 13–18, 2008.

JR INALDO, D. S. et al. Características gerais da ação , do tratamento e da resistência fúngica ao fluconazol. **Scientia Medica. Porto Alegre: PUCRS**, v. 15, n. 3, p. 189–197, 2005.

SMITH, K.J.D.W. et al. Azole resistance in *Candida albicans*. **Medical Mycology**, v. 24, n. 2, p. 133–144, 1986.

KAHLMETER, G. The 2014 Garrod Lecture: EUCAST - are we heading towards international agreement? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 9, p. 2427–2439, 2015.

KASSIM, A. et al. Comparison of Clinical Laboratory Standards Institute and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing guidelines for the interpretation of antibiotic susceptibility at a University teaching hospital in Nairobi, Kenya: A cross-sectional stud. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 15, n. 1, p. 1–7, 2016.

KAYA, E.; ÖZBILGE, H. Determination of the effect of fluconazole against *Candida albicans* and *Candida glabrata* by using microbroth kinetic assay. **Turk J Med Sci**, v. 42, n. 2, p. 325–328, 2012.

KERRIDGE, D.; NICHOLAS, R. O. Drug resistance in the opportunistic pathogens *Candida albicans* and *Candida glabrata*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 18, n. Supplement_B, p. 39–49, 1986.

KUHN, D. M. et al. Uses and Limitations of the XTT Assay in Studies of *Candida* Growth and Metabolism. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 506–508, 2003.

LEE, K. L.; BUCKLEY, H. R.; CAMPBELL, C. C. An amino acid liquid synthetic medium for the development of mycelial and yeas forms of *Candida albicans*. **Sabouraudia**, v. 13, p. 148–153, 1975.

LIU, M. et al. Colorimetric broth microdilution method for the antifungal screening of plant extracts against yeasts. **Methods**, v. 42, n. 4, p. 325–329, 2007.

LIU, W. et al. Impact of pH on the antifungal susceptibility of vaginal *Candida albicans*. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, v. 114, n. 3, p. 278–280, 2011.

LOZANO-CHIU, M. et al. Lot-to-lot variability of antibiotic medium 3 used for testing

- susceptibility of *Candida* isolates to amphotericin B. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 1, p. 270–272, 1997.
- LYMAN, C. A.; WALSH, T. J. Systemically Administered Antifungal Agents. **Drugs**, v. 44, n. 1, p. 9–35, 1992.
- MARTINEZ, R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. **J Bras Pneumol**, v. 32, n. 5, p. 446–455, 2006.
- MCCOY, T.; MAXWELL, M.; JR KRUSE, P. F. Amino acid requirements of the novikoff hepatoma in vitro. **Experimental biology and medicine**, v. 100, n. 1, p. 115–118, 1959.
- MCINTYRE, K. A.; GALGIANI, J. N. pH and other effects of the antifungal activity of cilofungin (LY121019). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 33, n. 5, p. 731–735, 1989.
- MILLER, R. A. A Case for Antifungal Stewardship. **Current Fungal Infection Reports**, v. 12, n. 1, p. 33–43, 2018.
- MONTEIRO, M. C. et al. A New Approach to Drug Discovery: High-Throughput Screening of Microbial Natural Extracts against *Aspergillus fumigatus* Using Resazurin. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 17, n. 4, p. 542–549, 2012.
- MOORE, G. E. et al. Growth of Human Tumor Cells in Suspension Cultures. **AACR Journals Archives**, v. 23, p. 1735–1741, 1963.
- MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia médica**. 7^a ed ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.
- MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia médica**. 8^a ed ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017.
- PAREDES, C. V. T. Actualización en pruebas de susceptibilidad antifúngica. **Rev Chil Infect**, v. 26, n. 2, p. 144–150, 2009.
- PEANO, A. et al. Methodological Issues in Antifungal Susceptibility Testing of *Malassezia pachydermatis*. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 37, p. 2–15, 2017.
- PERFECT, J. R. The antifungal pipeline: A reality check. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 16, n. 9, p. 603–616, 2017.
- PFALLER, M. A. et al. Multicenter evaluation of four methods of yeast inoculum preparation. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, n. 8, p. 1437–1441, 1988.

- PFALLER, M. A. et al. Collaborative investigation of variables in susceptibility testing of yeasts. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 34, n. 9, p. 1648–1654, 1990.
- PFALLER, M. A. et al. Comparative Evaluation of Alternative Methods for Broth Dilution Susceptibility Testing of Fluconazole against *Candida albicans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 506–509, 1994.
- PFALLER, M. A. et al. Quality control guidelines for National Committee for Clinical Laboratory Standards recommended broth macrodilution testing of amphotericin B , fluconazole, and flucytosine . **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 5, p. 1104–1107, 1995.
- RADETSKY, M. et al. Microtiter Broth Dilution Method for Yeast Susceptibility Testing with Validation by Clinical Outcome. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 24, n. 4, p. 600–606, 1986.
- RANG HP, DALE MM, RITTER JM, F. R. **Farmacologia**. 6^a ed ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
- REX, J. H. et al. Detection of amphotericin B-resistant *Candida* isolates in a broth-based system. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 4, p. 906–909, 1995.
- RICHARDSON, .K. et al. Discovery of Fluconazole, a Novel Antifungal Agent. **REVIEWS OF INFECTIOUS DISEASES**, v. 12, n. 3, p. 267–271, 2016.
- ROBBINS, N.; CAPLAN, T.; COWEN, L. E. Molecular Evolution of Antifungal Drug Resistance. **Annual Review of Microbiology**, v. 71, n. 1, p. 753–775, 2017.
- RODRÍGUEZ-TUDELA, J. L. et al. Influence of shaking on antifungal susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans*: A comparison of the NCCLS standard M27A medium, buffered yeast nitrogen base, and RPMI-2% glucose. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 2, p. 400–404, 2000.
- RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; MARTINEZ-SUAREZ, J. V. Improved Medium for Fluconazole Susceptibility Testing of *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, n. 1, p. 45–48, 1994.
- SHAW JTB, TARBIT MH, T. P. Cytochrome P-450 mediated sterol synthesis and metabolism: differences in sensitivity to fluconazole and other azoles. (Ed) ed. Barcelona: [s.n.].
- SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz dos autores contemporâneos**. 1^a ed ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

SMITH, K. D. et al. Increased Antifungal Drug Resistance in Ugandan Clinical Isolates of *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 12, p. 7197–7204, 2015.

STOPPA, M. A. et al. Estudo comparativo entre as metodologias preconizadas pelo CLSI e pelo EUCAST para avaliação da atividade antifúngica. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 498–502, 2009.

SUN, K.-S. et al. Clinical outcome and prognostic factors associated with invasive pulmonary aspergillosis: An 11-year follow-up report from Taiwan. **Plos One**, v. 12, n. 10, p. 1–10, 2017.

VITALE, R. G.; PASCUCCELLI, V.; AFELTRA, J. Influence of capsule size on the in vitro activity of antifungal agents against clinical *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* strains. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 384–388, 2012.

WIEDERHOLD, N. P. The antifungal arsenal: alternative drugs and future targets. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 51, n. 3, p. 333–339, 2018.

WILL, M. A.; CLARK, N. A.; SWAIN, J. E. Biological pH buffers in IVF: help or hindrance to success. **J Assist Reprod Genet**, v. 28, p. 711–724, 2011.

YOUNG, T. W. **Brewing Microbiology**. 2ª edição ed. London: A Chapman & Hall Food Science Book, 1999.

ZARAGOZA, O. et al. Process analysis of variables for standardization of antifungal susceptibility testing of nonfermentative yeasts. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 4, p. 1563–1570, 2011.