

## **AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *Nakaseomyces (Candida) glabrata* FRENTE A ANTIFÚNGICOS CONVENCIONAIS.**

Camila Dutra de Castro (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Vitória Monteiro de Araújo Vilela (UEM), Patrícia de Souza Bonfim de Mendonça (Coorientador), Terezinha Estivalet Svidzinski (Orientador).

E-mail: terezinha.svidzinski@gmail.com.

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Maringá, PR.

**Microbiologia; Microbiologia Aplicada/ Microbiologia Médica.**

**Palavras-chave:** *Candida*; fluconazol; voriconazol.

### **RESUMO**

Atualmente as infecções fúngicas invasivas vem apresentando altas taxas de mortalidade, acometendo principalmente pacientes imunocomprometidos. *Nakaseomyces* (anteriormente denominada de *Candida*) *glabrata* é considerada uma das principais causas de candidíase invasiva, apresentando a prevalência de resistência a antifúngicos da classe dos azóis. O presente estudo analisou a suscetibilidade de 51 isolados clínicos de *N. glabrata* frente aos antifúngicos fluconazol e voriconazol. Para o preparo das placas de microdiluição e realização dos testes de suscetibilidade, foram seguidas as normas presentes no BrCAST. Para o preparo do inóculo, as colônias foram ressuspensas em 3 mL de água destilada, homogêneas e padronizadas em  $1 \times 10^6$  UFC/mL. Foram aliqüotados 100 µL do inóculo padronizado em 11 poços da microplaca de 96 poços, juntamente com 100 µL de antifúngico, diluído em meio RPMI. As colunas 11 e 12 da placa foram utilizadas como controle positivo e negativo. Após a incubação, foi realizada uma leitura por espectrofotometria em diferentes comprimentos de onda. Para os dois antifúngicos analisados não foram encontrados isolados resistentes. Para ambos os antifúngicos foram observados um perfil de sensibilidade. Dessa forma, foi possível concluir que não ocorreram casos de resistência de *N. glabrata* aos antifúngicos utilizados nos testes, sendo encontrado um perfil de variação entre os valores de CIM observados dentro do intervalo de sensibilidade.

### **INTRODUÇÃO**

As infecções fúngicas invasivas (IFIs) podem ser definidas como infecções sistêmicas causadas pela presença de fungos em tecidos profundos, responsáveis por altas taxas de morbidade e mortalidade (Fang *et al*, 2023). *Nakaseomyces*

*glabrata*, anteriormente chamada *Candida glabrata*, é considerada uma das principais causas de candidíase, possuindo aumento na prevalência de resistência a antifúngicos da classe dos azóis (Salimi *et al*, 2024). O desenvolvimento de estudos que demonstram os padrões de suscetibilidade antifúngica nos níveis local e regional apresentam grande importância, visto que a resistência antifúngica de *N. glabrata* pode variar de acordo com a região geográfica estudada (Martínez-Herrera *et al*, 2021). Portanto, o presente estudo analisou a suscetibilidade de isolados da espécie *N. glabrata* frente a antifúngicos convencionais mais utilizados na prática clínica.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### *Preparação das placas de microdiluição;*

Para o preparo das soluções dos antifúngicos utilizados na placa de microdiluição, a quantidade de antifúngico e do solvente necessário para a diluição foram calculados com base nas normas presentes no *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (BrCAST), publicadas no documento E.DEF. 7.3.2 – Abril 2020. A solução estoque dos antifúngicos foi preparada em concentrações 200 vezes maior do que a utilizada posteriormente na placa. A partir da solução estoque do antifúngico, foi preparada uma solução intermediária composta por uma diluição do antifúngico com Dimetilsulfóxido (DMSO). Por meio dessa solução foram preparadas diluições dos antifúngicos em eppendorfs, apresentando concentrações de 12.800 µg/mL a 25 µg/mL para o fluconazol e de 800 µg/mL a 1,56 µg/mL para o voriconazol. Para o preparo da placa de microdiluição, foi realizada uma diluição 1:100 de cada concentração presente nos eppendorfs em RPMI 2% G. Posteriormente, 100 µL de cada concentração foram distribuídas para as colunas da placa. Após a adição do inóculo, as placas de microdiluição apresentavam concentrações de 64 a 0,125 µL para o fluconazol e de 4 a 0,008 µL para o voriconazol.

### *Teste de susceptibilidade antifúngica dos isolados de *Nakaseomyces glabrata* frente aos antifúngicos fluconazol e voriconazol;*

Para os testes foram utilizados isolados clínicos armazenados na micoteca do laboratório de Micologia Médica, UEM. Para o preparo do inóculo, os isolados passaram pelos processos de reativação em 3 mL de meio *Sabouraud Dextrose Broth* (SDB) e verificação da pureza através de meio cromogênico (*CHROMagar Candida*). Uma colônia isolada foi transferida para o meio *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA), onde após o crescimento das leveduras em 24 horas, as colônias foram ressuspensas em 3 mL de água destilada e homogeneizadas com o uso de um vórtex a aproximadamente 2.000 rpm. O inóculo foi padronizado em  $1 \times 10^6$  unidades formadoras de colônia (UFC/mL), referente a leitura da transmitância de  $90 \pm 2$  em 530nm pelo espectrofotômetro. Posteriormente, foram aliqüotados 100µL do inóculo padronizado em 11 poços da microplaca de 96 poços, juntamente com 100µL de antifúngico, diluído em meio RPMI 2%G em diferentes concentrações. As

colunas 11 e 12 da placa de microdiluição foram utilizadas como controle positivo e negativo, contendo na coluna 11 apenas 100  $\mu\text{L}$  de meio estéril sem antifúngico, juntamente com 100  $\mu\text{L}$  do inóculo padronizado. A coluna 12 foi utilizada para o controle negativo, sendo adicionada a esta 100  $\mu\text{L}$  de água destilada e 100  $\mu\text{L}$  de RPMI 2%G estéril. O tempo de incubação foi de 24 horas a 37°C, sendo realizada uma leitura por espectrofotometria com comprimentos de onda de 405nm, 450nm e 530nm. Por fim, o valor do controle negativo foi subtraído dos demais poços.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizados testes de susceptibilidade antifúngica de 51 isolados clínicos. Não foram observadas diferenças significativas entre os comprimentos de onda utilizados na leitura por espectrofotometria. Para o antifúngico fluconazol os isolados clínicos apresentando valores de concentração inibitória mínima (CIM) maiores que 16  $\mu\text{g/mL}$  foram considerados resistentes e os demais valores classificados como intermediários. Não foram observados casos de resistência de *N. glabrata* ao antifúngico fluconazol entre as leveduras testadas, entretanto foi possível observar entre os isolados a presença de variação entre os valores de CIM suscetíveis. Ademais, vale considerar que a frequência de resistência de *N. glabrata* pode variar de acordo com a região geográfica, visto que em regiões como na América Latina e Ásia-Pacífico onde a presença da espécie é menos comum, os isolados são menos resistentes ao fluconazol (Pfaller e Diekema, 2007). Sendo assim, os maiores valores de CIM encontrados nos testes com fluconazol foram de 16  $\mu\text{g/mL}$  e 8  $\mu\text{g/mL}$ , ambos encontrados em 3,92% dos isolados, sendo considerados concentrações altas para CIM. Esses altos valores de CIM podem estar relacionados à capacidade da espécie em adquirir resistência aos azóis (Salimi *et al*, 2024). A maioria dos isolados clínicos obtiveram CIM de 4  $\mu\text{g/mL}$ , ou seja 70,6% do total de leveduras testadas. Por fim, 19,6% tiveram CIM de 2  $\mu\text{g/mL}$  e 1,96% de 0,25  $\mu\text{g/mL}$ , indicando uma alta sensibilidade ao composto (Tabela 1).

Para o antifúngico voriconazol, isolados clínicos apresentando valores de CIM maiores que 1  $\mu\text{g/mL}$  foram considerados resistentes e valores de CIM menores ou iguais que 1  $\mu\text{g/mL}$  considerados sensíveis ao antifúngico. Semelhantemente ao antifúngico fluconazol, não foram encontrados isolados resistentes para voriconazol, porém foram encontradas oscilações entre os valores de CIM. Grande parte dos isolados apresentaram CIM de 0,125  $\mu\text{g/mL}$  (45,10%), seguidos pelas concentrações de 0,25  $\mu\text{g/mL}$  (31,37%), 0,06  $\mu\text{g/mL}$  (17,65%) e 0,5  $\mu\text{g/mL}$  (5,88%) (Tabela 1).

Fármaco	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )	S	R
Fluconazol	4	90%	0%
	2	10%	
Voriconazol	0,06	40%	0%
	0,125	10%	

0,25

50%

**Tabela 1:** Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) obtidos através dos testes de susceptibilidade antifúngica de isolados de *N. glabrata* com os antifúngicos fluconazol e voriconazol.  
**S=** Sensível ao antifúngico; **R=** Resistente ao antifúngico.

## CONCLUSÕES

Após a realização dos testes de suscetibilidade antifúngica, foi possível concluir que não ocorreram casos de resistência de *N. glabrata* aos antifúngicos fluconazol e voriconazol nos isolados clínicos testados, sendo observado um perfil de variação entre os valores de CIM observados. Porém, como foi possível concluir a partir deste trabalho, a maioria das cepas analisadas mostrou-se suscetível contra os fármacos testados, sendo de extrema importância continuar o acompanhamento do perfil epidemiológico e dos isolados clínicos frente a suscetibilidade a fármacos.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Fundação Araucária pela atribuição da bolsa e ao Laboratório de Micologia Médica/UEM pelo apoio durante todo o processo.

## REFERÊNCIAS

ARENDRUP, M. C. *et al.* BrCAST/ EUCAST: Método para determinação de concentração inibitória mínima em caldo dos agentes antifúngicos para leveduras. Documento Definitivo E.DEF. 7.3.2, abril 2020. Disponível em: <https://brcast.org.br/documentos/>. Acesso em: jul. 2024.

FANG, W. *et al.* Diagnosis of invasive fungal infections: challenges and recent developments. **Journal of Biomedical Science**, v. 30, n. 1, p. 42, 19 jun. 2023. DOI: 10.1186/s12929-023-00926-2. PMID: 37337179; PMCID: PMC10278348.

MARTINEZ-HERRERA, Erick *et al.* Antifungal resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* in Ibero-America. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 1, p. 14, 2021. DOI: 10.3390/jof8010014. PMID: 35049954; PMCID: PMC8781625.

PFALLER, Michael A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 1, p. 133-163, 2007. DOI: 10.1128/CMR.00029-06. PMID: 17223626; PMCID: PMC1797637.

SALIMI, M. *et al.* Molecular Epidemiology and Antifungal Susceptibility Profile in *Nakaseomyces glabrata* Species Complex: A 5-Year Countrywide Study. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 38, n. 9, e25042, 2024. DOI: 10.1002/jcla.25042.



PMID:

38775102;

PMCID:

PMC11137845.