

LUCIANA SARMENTO MOREIRA

***ESTUDO DA ATIVIDADE DE DROGAS ANTIFÚNGICAS
ATRAVÉS DE CURVAS DE CRESCIMENTO DE
Candida albicans UTILIZANDO O SISTEMA
AUTOMATIZADO BIO-CELL TRACER®***

CAMPINAS

2003

LUCIANA SARMENTO MOREIRA

**ESTUDO DA ATIVIDADE DE DROGAS ANTIFÚNGICAS
ATRAVÉS DE CURVAS DE CRESCIMENTO DE
Candida albicans UTILIZANDO O SISTEMA
AUTOMATIZADO BIO-CELL TRACER®**

*Dissertação de Mestrado apresentada à
Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas,
da Universidade Estadual de Campinas, para
obtenção do título de Mestre em Clínica Médica,
área de Ciências Básicas.*

Orientador: Profa. Dra. Maria Luiza Moretti Branchini

CAMPINAS

2003

AGRADECIMENTOS

A Prof^a. Dra. Maria Luiza Moretti Branchini, pela receptividade, orientação e confiança demonstrada ao longo deste Mestrado;

Ao Dr. Hideaki Taguchi, pelo carinho, paciência e orientação;

Aos técnicos e alunos do Laboratório de Doenças infecciosas do Hospital das Clínicas da Unicamp pela convivência;

Aos meus pais pela grande lição de vida;

A minha família pelo incansável incentivo e amor;

Aos meus amigos pelo incentivo;

A Tiago Andrade pela dedicação, amor e paciência;

Ao Alexandre Zielinsky pelo apoio computacional e amizade;

A FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) e JICA (Japanese International Cooperation Agency) pelo apoio financeiro.

	<i>Pág.</i>
RESUMO	<i>xi</i>
ABSTRACT	<i>xiii</i>
1- INTRODUÇÃO	15
1.1- Candida sp.....	16
1.2- Candidemia.....	18
1.3- Antifúngicos.....	19
1.4- Testes de Suscetibilidade.....	21
1.5- Sistema Bio-Cell Tracer [®]	23
2- OBJETIVOS	25
3- MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1- Amostras.....	28
3.2- Concentração Inibitória Mínima – CIM (NCCLS).....	29
3.3- Agente Antifúngico para Teste no Sistema Bio-Cell Tracer [®]	30
3.4- Preparação para Monitoramento no Sistema Bio-Cell Tracer [®]	30
3.5- Sistema Bio-Cell Tracer [®]	31
4- RESULTADOS	34
4.1- Resultado do Teste de Resistência ao Fluconazol.....	35
4.2- Resultados dos Testes de Suscetibilidade para Fluconazol, 5-Fluorocitosina e Anfotericina B.....	39
5- DISCUSSÃO	53
6- CONCLUSÕES	59
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

LISTA DE ABREVIATURAS

Aids	Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
ANF	Anfotericina B
BCT	Bio-Cell Tracer [®]
CI	Média do crescimento pré-exposição ao antifúngico
CIF	Coefficiente de índice fracionário
CIM	Concentração inibitória mínima
CP	Média do crescimento pós-exposição ao antifúngico
FCZ	Fluconazol
5-FC	5-fluorocitissina
ITZ	Itraconazol
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
TI	Taxa de inibição

		<i>Pág.</i>
Tabela 1-	Lista de cepas que fizeram parte do estudo, bem como suas origens.....	28
Tabela 2-	Taxas de inibição (TI) do crescimento das pseudo-hifas de <i>C. albicans</i> , para adição de FCZ 64µg/mL e seus respectivos controles (sem adição do antifúngico), geradas através do Sistema BCT®. Também estão descritas as médias do crescimento inicial de pseudo-hifas (CI) durante os 30min iniciais do experimento (pré-exposição) e dos 30min finais, pós-adicação (CP).....	35
Tabela 3-	Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) para as cepas de <i>C. albicans</i> , testadas com fluconazol, 5-fluorocitosina e anfotericina B.....	39
Tabela 4-	Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) Combinada para as cepas de <i>C. albicans</i> e seus respectivos valores do Calculo de Concentração Inibitória Fracionária (CIF).....	40
Tabela 5-	Taxas de inibição (TI) do crescimento de pseudo-hifas de <i>C. albicans</i> (cepa ATCC 90028) e seus respectivos controles (sem adição do antifúngico), geradas através do Sistema BCT®. Também estão descritas as médias do crescimento inicial de pseudo-hifas (CI) durante os 30min iniciais do experimento (pré-exposição) e dos 30 min finais, pós-adicação (CP).....	41
Tabela 6-	Taxas de inibição (TI) do crescimento de pseudo-hifas de <i>C. albicans</i> (cepa IFM 48138) e seus respectivos controles (sem adição do antifúngico), geradas através do Sistema BCT®. Também estão descritas as médias do crescimento inicial de pseudo-hifas (CI) durante os 30min iniciais do experimento (pré-exposição) e dos 30min finais, pós-adicação (CP).....	42

Tabela 7-	Taxas de inibição (TI) do crescimento de pseudo-hifas de <i>C. albicans</i> (cepa UN 205) e seus respectivos controles (sem adição do antifúngico), geradas através do Sistema BCT [®] . Também estão descritas as médias do crescimento inicial de pseudo-hifas (CI) durante os 30min iniciais do experimento (pré-exposição) e dos 30min finais, pós-adição (CP).....	43
Tabela 8-	Taxas de inibição (TI) do crescimento de pseudo-hifas de <i>C. albicans</i> (cepa UN 219) e seus respectivos controles (sem adição do antifúngico), geradas através do Sistema BCT [®] . Também estão descritas as médias do crescimento inicial de pseudo-hifas (CI) durante os 30min iniciais do experimento (pré-exposição) e dos 30 min finais, pós-adição (CP).....	44
Tabela 9-	Efeito sinérgico ou antagônico dependente de tempo para adições combinadas dos antifúngicos 5-FC/ANF e FCZ/ANF no crescimento de pseudo-hifas de <i>C. albicans</i> (cepa ATCC 90028), geradas através do Sistema BCT [®] . Estão descritas as Taxas de inibição (TI) e as médias do crescimento inicial de pseudo-hifas (CI) durante os 30min iniciais do experimento (pré-exposição) e dos 30min finais, pós-adição (CP).....	46
Tabela 10-	Efeito sinérgico ou antagônico dependente de tempo para adições combinadas dos antifúngicos 5-FC/ANF e FCZ/ANF no crescimento de pseudo-hifas de <i>C. albicans</i> (cepa IFM 48138), geradas através do Sistema BCT [®] . Estão descritas as Taxas de inibição (TI) e as médias do crescimento inicial de pseudo-hifas (CI) durante os 30min iniciais do experimento (pré-exposição) e dos 30 min finais, pós-adição (CP).....	47

Tabela 11-	Efeito sinérgico ou antagônico dependente de tempo para adições combinadas dos antifúngicos 5-FC/ANF e FCZ/ANF no crescimento de pseudo-hifas de <i>C. albicans</i> (cepa UN 205), geradas através do Sistema BCT [®] . Estão descritas as Taxas de inibição (TI) e as médias do crescimento inicial de pseudo-hifas (CI) durante os 30min iniciais do experimento (pré-exposição) e dos 30min finais, pós-adição (CP).....	48
Tabela 12-	Efeito sinérgico ou antagônico dependente de tempo para adições combinadas dos antifúngicos 5-FC/ANF e FCZ/ANF no crescimento de pseudo-hifas de <i>C. albicans</i> (cepa UN 219), geradas através do Sistema BCT [®] . Estão descritas as Taxas de inibição (TI) e as médias do crescimento inicial de pseudo-hifas (CI) durante os 30min iniciais do experimento (pré-exposição) e dos 30 min finais, pós-adição (CP).....	49

	<i>Pág.</i>
Figura 1- Sistema BCT®	31
Figura 2- Curva de crescimento das cepas UN 205, UN 219 e UN 238 com adição de FCZ 64µg/mL. Como referência está a curva de crescimento da cepa UN 205 sem adição do FCZ.....	36
Figura 3- Curva de crescimento das cepas IFM 48139, IFM 48138 com adição de FCZ 64µg/mL e ATCC 90028 sem adição do FCZ.....	37
Figura 4- Observação de pseudo-hifas de <i>C. albicans</i>	38
Figura 5- Curvas de crescimento da cepa UN 205 com adição de diferentes concentrações de ANF e o perfil de crescimento do seu controle sem adição, obtidas através do Sistema BCT®	45
Figura 6- Curvas de crescimento da cepa ATCC 90028 com adição da combinação de 5-FC mais ANF, e o perfil de crescimento do seu controle sem adição, obtidas através do Sistema BCT®	50
Figura 7- Curvas de crescimento da cepa UN 219 com adição da combinação de FCZ mais ANF, e o perfil de crescimento do seu controle sem adição, obtidas através do Sistema BCT®	51
Figura 8- Curvas de crescimento da cepa UN 219 com adição da combinação de FCZ mais ANF, simultaneamente e em tempos sequenciais, obtidas através do Sistema BCT®	52



RESUMO

O crescente aumento de casos de candidemia nas últimas décadas vem sendo um fato preocupante devido a diversos fatores, e dentre eles destacam-se a mortalidade, o aumento de casos de espécies não-*albicans* como causadoras de candidemia, e a crescente emergência da resistência de leveduras aos antifúngicos. Para o tratamento da candidemia, temos como drogas mais usadas a anfotericina B (ANF), o itraconazol (ITZ), o fluconazol (FCZ), a 5-fluorocitosina (5-FC), como também as combinações de ANF com FCZ ou 5-FC que visam favorecer a terapia. Porém, atualmente, ainda pouco se sabe a respeito das respostas clínicas dadas por *Candida* sp. às terapias utilizadas quando comparadas com testes de suscetibilidade *in vitro*. Os testes padronizados para estudar a suscetibilidade de *Candida* sp. *in vitro* não avaliam as células individualmente, e sim uma população celular. O sistema automatizado Bio-Cell Tracer[®] (BCT[®]), surge como uma nova ferramenta complementar para o estudo da dinâmica da formação de hifas, pseudo-hifas e germinação de conídios e de respostas quanto a suscetibilidade aos antifúngicos. Neste trabalho, utilizamos o BCT[®] para avaliar o crescimento de cepas de *Candida albicans* frente aos seguintes antifúngicos: FCZ, 5-FC e ANF, além das combinações 5-FC/ANF e FCZ/ANF em adições com tempos simultâneos e seqüenciais. O sistema BCT[®] consiste de uma base para placas, microscópio, digitalizador de imagem e computador com programa que permitiu o acompanhamento do crescimento automático das extremidades das pseudo-hifas estudadas. Os resultados para *Candida albicans* obtidos com o teste de resistência ao FCZ, encontrados no BCT[®] foram correspondentes àqueles utilizando o teste padrão de microdiluição em caldo (NCCLS A27), sugerindo diferentes classes de taxas de inibição que poderiam ser agrupadas como valores associados a suscetibilidade e resistência. Os estudos com drogas combinadas, em tempos seqüenciais, revelou que a cepa (UN 219) apresentou comportamento de antagonismo para a combinação de FCZ/ANF, dado que

diferiu do encontrado na microdiluição em caldo. Neste caso, a possibilidade de monitoramento de hifas, pseudo-hifas pode permitir maior versatilidade e induzir respostas biológicas antes não encontradas nos testes *in vitro*. Este estudo contribuiu com novas informações a respeito de um sistema automatizado para análise de pseudo-hifas e germinação de conídios, que pode vir a ser utilizado no desenvolvimento de novas estratégias para uma rápida determinação de suscetibilidade antifúngica de *C. albicans* ou de outros fungos patogênicos.



ABSTRACT

Candida species are opportunistic fungal pathogens that are often the causative agents of infections in immunocompromised patients. amphotericin B (AMPH), itraconazole (ITCZ), fluconazole (FLCZ) and 5-flucytosine (5-FC) are the principal drugs used on the treatment of candidemic patients. However, in some cases, the clinical responses of *Candida* are different from those obtained with the *in vitro* susceptibility tests. Moreover, the standard methods of monitoring the susceptibility of *Candida* to antifungal agents are unable to evaluate single cells, true hyphae or pseudohyphae forms. Thus, new techniques developed to measure the growth rate of true hyphae or pseudohyphae forms *in vitro* could contribute to better understand the dynamics of the formation of these invasive structures and the response of the organism to antifungal agents. Here we describe the application of an automated system (Bio-Cell Tracer[®] - BCT[®]) to examine the responses of *Candida albicans* to AMPH, FLCZ, 5-FC, as well as AMPH/FLCZ and AMPH/5-FC combinations, in simultaneous and distinct addition times. The BCT[®] consists of a culture vessel, a microscope and a image analyzer with a computer program system that traces the growth of a hyphal tip automatically. The results obtained using the BCT[®] system were correspondent to those using the standard MIC (NCCLS A27) assay on the detection of susceptibility and resistance in clinical isolates and reference samples. The combinatory studies show an antagonistic pattern on the UN 219 strain, differently from the MIC studies. The possibility of tracing pseudohyphae structures allows a larger versatility and biological responses not found on the other tests. This work contributed with new information about an automated system for analysis of pseudohyphal structures, that may be used on the development of new strategies for a rapid and reliable assessment of antifungal susceptibility in *Candida albicans* or other infectious species.



1- INTRODUÇÃO

O avanço da medicina nos últimos anos, tanto na área clínica quanto na cirúrgica, vem promovendo um aumento considerável na média de sobrevivência de pacientes antes sem possibilidade terapêutica, levando a um aumento no número de pacientes instáveis nos hospitais. Estes são suscetíveis a infecções por microrganismos, onde destacam-se as causadas por fungos (EDWARDS et al., 1997).

1.1- *Candida* sp.

O gênero *Candida* pertence a Divisão Eumycota, Subdivisão Deuteromycotina, Classe Blastomycetes e à Família Cryptococcaceae, apresentando predominantemente desenvolvimento unicelular e geralmente reproduzindo-se por brotamento unilateral. Entretanto, espécies de *Candida* podem desenvolver estrutura micelial em resposta a diferentes fatores ambientais e apresentar hifas verdadeiras ou pseudo-hifas (GRAHAM et al. 1995; BERMAM & SUDBERY, 2002).

O gênero *Candida* possui mais de 200 espécies, tendo como representante principal *C. albicans*, que é o patógeno oportunista de maior incidência (VALDIVIESO et al., 1976; HORN et al., 1985; ODDS, 1988; GHANNOUM & ABU-ELTEEN, 1990; BODEY, 1993). Algumas espécies fazem parte da microbiota humana, podendo ser isoladas do trato genital feminino e sistema digestório, incluindo orofaringe, reto e períneo. Estas e outras espécies podem também ser isoladas de outros animais, solo, água, alimentos, vegetais, atmosfera, e ambientes hospitalares, entre outros. Entretanto, a fonte endógena é a de maior importância para o desenvolvimento de doenças humanas (ODDS, 1988; DEMBRY et al., 1994; WEISSMAN et al., 1995). A mudança do fungo do estado comensal para o patogênico ocorre possivelmente por motivo de deficiência nos mecanismos de defesa, que é a condição biológica favorável para o mesmo causar infecções e doenças ao hospedeiro (EMMONS, 1962; UTZ, 1962; ODDS, 1988; RUECHEL, 1990; TORRES-RODRÍGUEZ & CARCELLER, 1993).

Candida sp. causa diversas manifestações clínicas como candidíase oral e esofágica, infecções de pele e unha, doenças pulmonares, enterites, esofagites, endocardites, meningites, abscesso cerebral, artrites, cistites, vaginites, septicemias, ceratites, nefrites, doença mucocutânea crônica, diarreia associada ao uso de antibióticos, entre outras. A candidíase oral e/ou esofágica é uma das manifestações clínicas de maior frequência e, em muitos casos, a primeira manifestação de infecção oportunista em pacientes portadores do vírus da Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (Aids) (HOLMBERG & MEYER, 1986; GUPTA & EHRINPREIS, 1990; DUPONT et al., 1992; BODEY, 1993; DUBE et al., 1994; PFALLER & BARRY, 1994).

A patogenia de *Candida* sp. pode ser observada por algumas características tais como:

- 1- somente as espécies capazes de crescer a 37°C são potencialmente patogênicas ao homem;
- 2- a formação de estrutura filamentosa, como hifas e pseudo-hifas com mais de 200µm de comprimento, próprias de algumas espécies de *Candida*, pode representar um obstáculo à fagocitose, que é o principal meio de defesa do organismo contra a infecção fúngica;
- 3- produção de alguns metabólitos por cepas de *Candida* capazes de desencadear manifestações alérgicas;
- 4- nas infecções severas, onde são encontradas grandes quantidades de leveduras, a inundação antigênica do microrganismo pode ser a causa de depressão da imunidade celular, o que permite o desenvolvimento da infecção e evolução para a forma crônica (SIDRIM & MOREIRA, 1999).

Os fatores que estão relacionados ao microrganismo na instalação do processo infeccioso são: presença de cepas com melhor aderência celular ao hospedeiro, produção de pseudo-hifas e pseudomicélio, presença de toxinas e a produção de enzimas proteolíticas.

Entretanto os dois últimos fatores ainda estão sendo estudados, no que se refere à espécie humana (MCGINNIS, 1980; KREGER VAN RIJ, 1984; SIDRIM & MOREIRA, 1999).

1.2- CANDIDEMIA

A candidemia caracteriza-se basicamente por infecção fúngica sistêmica, com possível origem infecciosa localizada que, em sua evolução, disseminou-se a outros órgãos por via hematogênica. A maioria dos casos de infecções invasivas são causados por *C. albicans*, representando cerca de 50% a 70% (BODEY, 1993).

Dentre os fatores de risco associados à candidemia estão pacientes submetidos a transplantes de órgão, cirurgias de grande porte, tratamentos com terapia imunossupressora, com neutropenia, neoplasia, que fizeram uso de antibióticos de amplo espectro, alimentação parenteral por longo período, esteróides, catéteres, como também pacientes hospitalizados em unidade de tratamento intensivo (NIELSEN et al., 1991; BODEY et al., 1992; MEUNIER et al., 1992; PFALLER, 1992; BODEY, 1993; EDWARDS et al., 1997; LUNEL et al., 1999). Além disso, a capacidade de *Candida* sp. em sobreviver em meio inanimado, torna maior a possibilidade de infecção por via exógena de pacientes debilitados (PFALLER, 1995).

O crescente aumento de casos de candidemia nas últimas décadas vem sendo um fato preocupante devido a diversos fatores, e dentre eles destacam-se: a mortalidade, o aumento de casos de espécies não-*albicans* como causadoras de candidemia, e a crescente emergência da resistência de *C. albicans* aos antifúngicos (EDWARDS et al., 1997; COLOMBO et al., 1999).

No Brasil, pesquisa realizada em seis Hospitais Gerais do Estado de São Paulo e Rio de Janeiro, relata uma alta taxa de candidemia hospitalar causada por *Candida* de espécies não-*albicans*, situação similar à encontrada em diversos países do mundo.

No estudo, 145 pacientes candidêmicos foram observados, sendo 85 deles homens, com média de idade de 32 anos. Foram encontradas em 63% de todos os casos espécies não-*albicans*, sendo a proporção de *C. albicans* (37%), *C. parapsilosis* (25%), *C. tropicalis* (24%), *C. rugosa* (5%) e *C. glabrata* (4%) (COLOMBO et al., 1999).

Em um estudo de 100 casos de candidemia no Hospital das Clínicas da Universidade de Campinas, FCM/UNICAMP, nos anos de 1998 a 2000, foi observada uma frequência de 49% de *C. albicans*, 20% de *C. parapsilosis* e 15% de *C. tropicalis* (dados do Laboratório de Epidemiologia Molecular e Doenças Infecciosas, FCM/UNICAMP).

A detecção de *Candida* sp. em culturas de sangue (hemocultura) é meio básico para o diagnóstico da candidemia (TARRAND et al., 1991; BRAWNER et al., 1992), mas é importante ressaltar que uma possível inibição do crescimento do patógeno pode se dar por conta de prévio uso de antifúngicos, condições de temperatura inadequada, entre outros fatores (MEUNIER, 1998). Dada a alta taxa de mortalidade, é consenso que todos os pacientes, independentemente do número de hemoculturas positivas, devem receber tratamento antifúngico sistemático (EDWARDS et al., 1997).

A identificação da *Candida* deve ser realizada até o nível de espécie, devido às características patogênicas e do perfil de resistência aos antifúngicos individuais de cada espécie.

1.3- ANTIFÚNGICOS

Para o tratamento da candidemia, é utilizado o fluconazol (FCZ), 5-fluorocitosina (5-FC), anfotericina B (ANF) e suas distintas formulações lipídicas, como também as combinações de ANF com FCZ ou 5-FC que visam favorecer a terapia. Além disto surge potenciais antifúngicos que aumentam as possibilidades de escolha terapêutica, são eles: posaconazol, ravuconazol, voriconazol, caspofungina e micafungina.

A escolha terapêutica depende do quadro clínico apresentado pelo paciente, da espécie de *Candida* isolada em cultura e da suscetibilidade aos antifúngicos.

A ANF é altamente tóxica, o que provoca nos pacientes efeitos colaterais, sendo esse fator limitante para o tratamento prolongado. Pacientes instáveis devem ser tratados com ANF lipídica, devido sua baixa toxicidade. Tem sido pouco freqüente relatos de resistência secundária à ANF (HOEPRICH, 1992; MEYER, 1992; WINGARD, 1995). A caspofungina e micafungina, da mesma classe da ANF (echinocandinas), parecem apresentar boa atividade antifúngica para tratamento de infecções causadas por *Candida* sp. (MULLER et al., 2001; JONSON & PERFECT, 2003). Estudos *in vitro* quanto a ação da caspofungin verificaram que sua atividade antifúngica inibiu o crescimento de cepas de *Candida* sp. resistentes ao FCZ, ITZ e ANF (PFALLER et al., 2003; LETSCHER-BRU & HERBRECHT, 2003). Caspofungin é um promissor agente antifúngico de primeira linha para terapia de candidíase invasiva (JONSON & PERFECT, 2003).

O FCZ antifúngico triazólico, de baixa toxidade, que apresenta boa farmacocinética e eficácia terapêutica quanto as infecções sistêmicas, vem sendo utilizado com bons resultados terapêuticos. O sucesso da utilização do FCZ por via oral ou endovenosa nos últimos anos, favorece principalmente pacientes com Aids, nos quais a terapêutica pode ser continuada, com a dose de manutenção, sem muitas complicações para o mesmo. Apesar de pouco freqüente, relatos de resistência secundária a azólicos têm sido descritos (WINGARD, 1995). A *C. albicans* é a espécie que apresenta maior suscetibilidade ao FCZ, ao contrário de espécies não-*albicans*, como a *C. krusei* e a *C. glabrata* que são usualmente menos sensíveis. Cepas de *Candida* sp. isoladas de sangue de pacientes com câncer, com redução de susceptibilidade para FCZ e ITZ apresentaram para os novos azólicos posaconazol, ravuconazol e voriconazol, considerável suscetibilidade (GRANIER, 2002; JEU et al., 2003; LAVERDIERE et al. 2002). PFALLER et al., (2003), relata em seu estudo que o voriconazol parece ser um antifúngico excepcional quanto a sua atividade em cepas de *Candida* sp. isoladas de sangue.

Diferente dos demais azólicos e derivados poliênicos, a 5-FC não atua a nível de membrana citoplasmática e sim inibindo síntese de DNA. São encontrados na literatura relatos a respeito de níveis variáveis de resistência primária à essa droga, entre vários isolados clínicos de *C. albicans*, bem como o surgimento de resistência induzida durante a terapêutica. Fato que preocupa é o surgimento de mutantes resistentes à droga ser maior que a esperada (HOEPRICH et al., 1974; IWATA, 1992; GALGANI et al., 1992).

Para se obter melhor resposta terapêutica, tem sido realizados estudos para testar a utilização de drogas antifúngicas combinadas. O estudo de REX et al. (2003), demonstrou uma tendência de sucesso terapêutico nos pacientes com candidemia, tratados com FCZ combinado à ANF convencional. Esses pacientes apresentaram uma percentagem maior de hemoculturas negativas do que o grupo controle tratado com FCZ combinado a placebo. Porém, o grupo tratado com as duas drogas antifúngicas apresentou maior toxicidade renal, e não houve diferença significativa na mortalidade nos dois grupos de pacientes quando comparados. O estudo demonstra que a resposta a utilização do FCZ combinado à ANF não é antagonista.

1.4- TESTES DE SUSCETIBILIDADE

Com o surgimento de novos antifúngicos disponíveis no mercado, tornaram-se necessários novos estudos a fim de testar essas drogas, para que se possa solucionar questões da comunidade médica, como a escolha da terapia mais apropriada para cada caso de infecção (RINALDI, 1992; EDWARDS et al., 1997). Quanto à resistência fúngica às drogas existentes, há diversos casos relatados na literatura, porém existem controvérsias quanto à problemas com testes *in vitro*. Mesmo com as publicações de trabalhos científicos, ainda é insuficiente o número de informações quanto ao crescimento fúngico e a testes de suscetibilidade fúngica às drogas antifúngicas (EDWARDS et al., 1997; COLOMBO, 1994; OH et al., 1995).

Os testes existentes para avaliação *in vitro* da atividade antifúngica tem como princípio a exposição de um inóculo definido, do microorganismo em estudo, à pré-determinadas concentrações da droga a ser testada, em condições que suportem o crescimento do microorganismo e que pouco ou nada interfiram com a ação da droga. O resultado obtido no teste visa permitir identificar a concentração da droga testada que inibe o crescimento do fungo patogênico (REX et al., 1993). Os métodos de diluição em caldo, em ágar e difusão em ágar são exemplos conhecidos de métodos.

O método de diluição em caldo consiste na diluição da droga em meio de cultivo líquido onde será inoculado o microorganismo. Esse método pode ser realizado em tubos (macrodiluição) ou em placas (microdiluição).

A diluição em placas é menos laboriosa do que a em tubos e ainda permite a automatização do método.

O método permite a definição da concentração inibitória mínima (CIM), a menor concentração de um determinado antifúngico que inibe o crescimento do microorganismo em estudo (SHEEHAN et al., 1993).

O método de diluição em ágar consiste na diluição da droga em meio de cultivo solidificado. Este é realizado em placas que contém, cada uma, diferentes concentrações da droga, onde inocula-se o microorganismo. Este método fornece resultado quantitativo da atividade da droga. A principal desvantagem do método é o trabalho e o tempo necessário para preparar as placas (ALVES & CURY, 1992).

O método de difusão em ágar consiste em colocar-se um disco que contém concentração única da droga a ser testada em meio de cultivo ágar, que contém o inóculo do microorganismo. O halo que é formado por inibição do crescimento ao redor do disco fornece resultado apenas qualitativo quanto à droga. Adicionalmente, temos resultados onde algumas drogas apresentam baixa difusibilidade no ágar e a dificuldade de leitura dos testes realizados com azóis leva a baixa reprodutibilidade dos resultados (SAUBOLLE & HOEPRICH, 1978; ODDS, 1991; PFALLER, 1992).

Outros sistemas de análise comerciais têm sido difundidos para avaliação *in vitro* de drogas antifúngicas, como é o caso do Etest[®] (AB Biodisk, Solna, Suécia). O Etest[®] consiste de uma fita plástica contendo uma droga em diferentes concentrações, que uma vez difundida em meio sólido, mantém por longo período um gradiente fixo de concentração em torno da fita. Este teste tem a vantagem da simplicidade da execução do método, e fornece dados quantitativos referentes a concentração inibitória mínima, mas é muito dispendioso (BAKER et al., 1991; SANCHEZ & JONES, 1993).

Atualmente, a avaliação quanto à suscetibilidade de *Candida* sp. aos antifúngicos é feita por testes de suscetibilidade padronizados por entidade responsável pela normatização de técnicas de laboratório clínico nos Estados Unidos da América, o “National Committee for Clinical Laboratory Standards” (NCCLS) (GHANNOUM et al., 1996). Baseados em estudos de farmacocinética de antifúngicos, bem como nos resultados obtidos na terapêutica de infecções por *Candida* sp., o NCCLS sugeriu valores de “breakpoints” para interpretações dos resultados de CIM obtidas com FCZ, ITZ e 5-FC (PFALLER et al, 1995; REX et al., 1997; ESPINEL-INGROFF, 1997).

1.5- SISTEMA BIO-CELL TRACER[®]

O sistema automatizado Bio-Cell Tracer[®] (BCT[®]) foi primeiramente descrito por MATSUOKA et al. (1990), como uma nova proposta na avaliação de atividade antifúngica. O sistema BCT[®] possibilita a análise de hifas, pseudo-hifas e a germinação de conídios fúngicos, mediante monitoramento automático do crescimento das estruturas previamente selecionadas. As amostras são incubadas em câmara estéril, com temperatura ajustada segundo as especificações do experimento. Em seguida, as hifas e pseudo-hifas, captadas por microscópio e câmera de vídeo, são selecionadas, e as imagens digitalizadas são acompanhadas por um programa específico de computador.

A aplicabilidade do método no estudo da atividade antifúngica em *C. albicans* foi avaliada por OH et al. (1995), em um estudo sobre o efeito combinado de ANF e 5-FC no crescimento de hifas. Entretanto, o método foi utilizado principalmente na avaliação de susceptibilidade de fungos filamentosos à drogas antifúngicas (MATSUOKA et al. 1990; Oh et al. 1992; YAMADA et al. 1992; OH et al. 1993; TAGUCHI et al. 1995; ANSHENG et al. 1999; IIDA et al. 1999; INOUYC et al. 2000). Assim, estudos utilizando o BCT[®] que possam avaliar o comportamento do crescimento de pseudo-hifas de *Candida* sp. frente a outros agentes antifúngicos ou combinações de drogas, podem contribuir com importantes informações sobre o comportamento de suscetibilidade do patógeno. Além disto, pouco se sabe a respeito de possíveis respostas dadas por *Candida* sp. às terapias utilizadas atualmente. Torna-se assim necessário a utilização de testes *in vitro*, que auxiliem a clínica, gerando informações adicionais a respeito da escolha terapêutica apropriada, tendo em vista o restabelecimento rápido do paciente, bem como a diminuição da mortalidade (EDWARDS et al., 1997; OH et al., 1995).



2- OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos:

1- Estudar o crescimento de *Candida albicans* frente aos seguintes antifúngicos: FCZ, 5-FC e ANF, utilizando o sistema BCT[®].

2- Estudar o crescimento de *Candida albicans* frente a utilização combinada dos antifúngicos: 5-FC e ANF, além de FCZ e ANF em adições conjuntas e em tempos seqüenciais, utilizando o sistema BCT[®].



3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- AMOSTRAS

Foram utilizadas as cepas de *Candida albicans*: ATCC 90028, cepas resistentes ao FCZ IFM 48139 e 48138 (Chiba University, Chiba, Japão), e os isolados clínicos de candidemia UN 205, UN 219 e UN 238 (Laboratório de Epidemiologia Molecular e Doenças Infecciosas, UNICAMP, Campinas-SP, Brasil) (Tabela 1). As cepas foram crescidas por 24h a 37°C em meio Batata Dextrose Agar (BDA: Difco, Detroit, U.S.A.) e posteriormente transferidas para o meio RPMI 1640 autoclavado (Nissui Pharmaceutical CO., LTD. Tokio, Japão) tamponado com MOPS (ácido 3-Morfolinopropanesulfônico-Dorjindo. Japão) pH 7,0 sendo o pH ajustado com hidróxido de sódio (NaOH-Merck S.A. Indústrias Químicas. Rio de Janeiro-Brasil) 1mol/L. O meio foi suplementado com L-glutamina (Vetec Química Fina Ltda. Rio de Janeiro-Brasil) 2% e com D(+)-glucose (Destrose, Anhydrous-Wako Pure Chemical Industries, Ltda. Japão) 2% e submetido por 24h a 37°C em agitador (shaker) com rotação de 120 rpm, para posteriormente serem analisadas através do modelo do BCT[®].

Tabela 1- Abaixo estão listadas as cepas que fizeram parte do estudo, bem como suas origens:

Espécie	Dados referentes as cepas	Origem
C. albicans	Cepa sensível ATCC-90028	Cepa de Referência-USA
C. albicans	Cepa resistente a FCZ IFM 48138	Universidade de Chiba-Japão
C. albicans	Cepa resistente a FCZ IFM 48139*	Universidade de Chiba-Japão
C. albicans	Isolado clínico de candidemia UN205	FCM/UNICAMP
C. albicans	Isolado clínico de candidemia UN219	FCM/UNICAMP
C. albicans	Isolado clínico de candidemia UN238*	FCM/UNICAMP

* Cepas que participaram exclusivamente do estudo da resistência ao FCZ, não fazendo parte dos testes combinatório de antifúngicos.

3.2- CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA – CIM (NCCLS)

As cepas foram submetidas previamente a análise da CIM. Foi utilizado o método do NCCLS documento A27 referente a microdiluição em caldo, simples (utilizando um antifúngico) e combinada (combinação de dois antifúngicos), na determinação das CIMs para o FCZ, 5-FC, ANF, bem como para as combinações de FCZ e 5-FC com ANF. Os valores de referência (ponto de corte) para a microdiluição em caldo padronizados pelo NCCLS e utilizados no presente estudo são para FCZ $\leq 8 \mu\text{g/mL}$ (sensível); 16-32 $\mu\text{g/mL}$ (sensível dose-dependente) e $\geq 32 \mu\text{g/mL}$ (resistente), para 5-FC $\leq 4 \mu\text{g/mL}$ (sensível); 8-16 $\mu\text{g/mL}$ (intermediária); $\geq 32 \mu\text{g/mL}$ (resistente) (NCCLS A27).

Foram utilizadas placas plásticas estéreis, de fundo chato, possuindo oito séries de 12 poços, identificadas de A à H, totalizando 96 poços. Para determinar a CIM simples as placas utilizadas com concentrações já determinadas variaram para FCZ, de 0.125 a 64 $\mu\text{g/mL}$, ANF de 0.03 a 16 $\mu\text{g/mL}$ e 5-FC de 0.125 a 64 $\mu\text{g/mL}$. Para determinar a CIM combinada foram utilizadas as concentrações de 0.03 a 2 $\mu\text{g/mL}$ para ANF e de 0.06 a 64 $\mu\text{g/mL}$ para FCZ, nas combinações de FCZ/ANF. Para a combinação de 5-FC/ANF, a variação para 5-FC foi de 0.03 a 32 $\mu\text{g/mL}$, sendo a da ANF a mesma da combinação anterior. Em conjunto com as concentrações dos antifúngicos foram inoculadas as cepas de *Candida albicans*, com concentração celular variando de 0.5×10^3 a 2.5×10^3 CFU/mL, bem como seus controles positivo (inóculo com meio) e negativo (só o meio), em 200 μL para cada poço de RPMI 1640 suplementado, crescidas por 48h a 35°C. Foram feitas duas leituras visuais com 24 e 48h para determinação das respectivas CIMs.

As placas foram colocadas em suporte contendo espelho, permitindo a observação de seu reverso. No momento da leitura foi observado o crescimento da levedura no poço controle positivo e este foi comparado com o crescimento dos demais poços com as diferentes concentrações para FCZ, 5-FC e ANF.

A determinação da CIM para FCZ e 5-FC (droga fungistáticas) foi realizada por inibição do crescimento fúngico, que consistiu de aproximadamente 80%. Para ANF (droga fungicida) a inibição foi de 100%. Para as combinações de 5-FC/ANF e FCZ/ANF, foi realizada por inibição do crescimento de aproximadamente 80% (NCCLS A27).

Para definirmos o sinergismo, a adição e o antagonismo dos antifúngicos, quando utilizamos o CIM combinatório, realizamos o cálculo da Concentração Inibitória Fracionaria (CIF), que é feita pela soma das divisões dos valores do CIM dos antifúngicos obtidos na combinação pelo valor do mesmo sozinho. Defini-se o sinergismo quando for o $CIF \leq 0.5$, a adição 1 e o antagonismo ≥ 2 (TUDELA et al, 2002).

3.3- AGENTE ANTIFÚNGICO PARA TESTE NO SISTEMA BIO-CELL TRACER[®]

FCZ (Pfizer Pharmaceutical Incorporation.), ANF e 5-FC (Sigma Chemical Co., Ltd., St. Louis, Mo., U.S.A.) foram dissolvidos em DMSO (Dimetil Sulfóxido-Wako Pure Chemical Industries, Ltda.) com concentração de 12.8mg/mL, para estocagem. Os mesmos foram dissolvidos posteriormente em meio RPMI 1640 para obter-se soluções para trabalho em concentrações variadas.

3.4- PREPARAÇÃO PARA MONITORAMENTO NO SISTEMA BIO-CELL TRACER[®]

Foram utilizadas placas plásticas estéreis (35 x 10mm), tratadas previamente cada com 2mL da solução de Poli-L-lisina (Sigma Chemical Co., Ltd., St. Louis, Mo., U.S.A.) 0.01%(w/v) por 1h e secadas em radiação UV. Para o monitoramento do crescimento das amostras foi adicionado às placas 1mL de solução celular com concentração de 1 a 10×10^3 CFU/mL e deixadas em repouso por 30 a 50min em temperatura ambiente, para fixação das células a Poli-L-lisina. Após lavagem das placas com H₂O destilada filtrada (Filtro MFS-Advantec MFS, Inc.-U.S.A.), foi adicionado 1mL de RPMI 1640 e incubadas a 37°C por 2 a 4h para posterior análise no BCT[®].

3.5 - SISTEMA BIO-CELL TRACER[®]

O sistema BCT[®] é composto (Fig.1) por uma base para placas, onde as placas são colocadas para monitoramento, um microscópio (Olympus;IMT-2), uma câmera fotográfica que registra a pseudo-hifa escolhida, uma câmera de vídeo CCD (Charge Coupled Device) que capta a imagem das placas e as envia para um digitalizador de imagem (Flovel), sendo estas analisadas por um programa de computador (BCT[®]) que monitora automaticamente todo o desenvolvimento do experimento. O sistema possui ainda uma câmara de incubação onde a temperatura interna é ajustada de 10 a 50°C para proporcionar a temperatura mais adequada ao crescimento fúngico. A velocidade em que pode ser acompanhado o crescimento das extremidades das pseudo-hifas no sistema BCT[®] está dentro de uma faixa que vai de 0.5 a 20 $\mu\text{m}/\text{min}$. As extremidades das pseudo-hifas são observadas no monitor de TV e as imagens podem ser gravadas em vídeo cassete sendo as mesmas analisadas pelo programa do computador BCT[®].

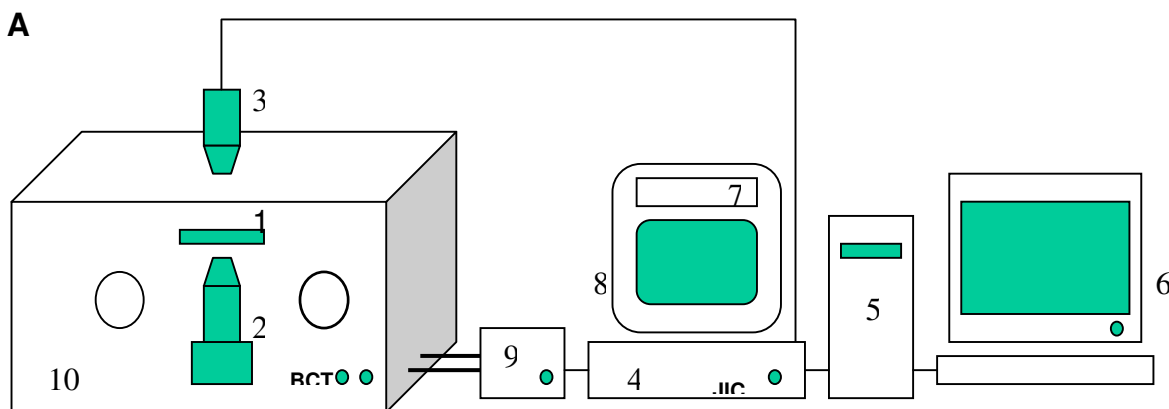


Fig.1- Sistema BCT[®].

A- Diagrama do Sistema BCT[®]:

1- Base para placa; 2- Microscópio; 3- Câmera de vídeo CCD; 4- Digitalizador de imagem; 5- Microcomputador; 6- Monitor; 7- Vídeo cassete; 8- Monitor de TV; 9- Regulador de Temperatura; 10- Câmara incubadora.

B

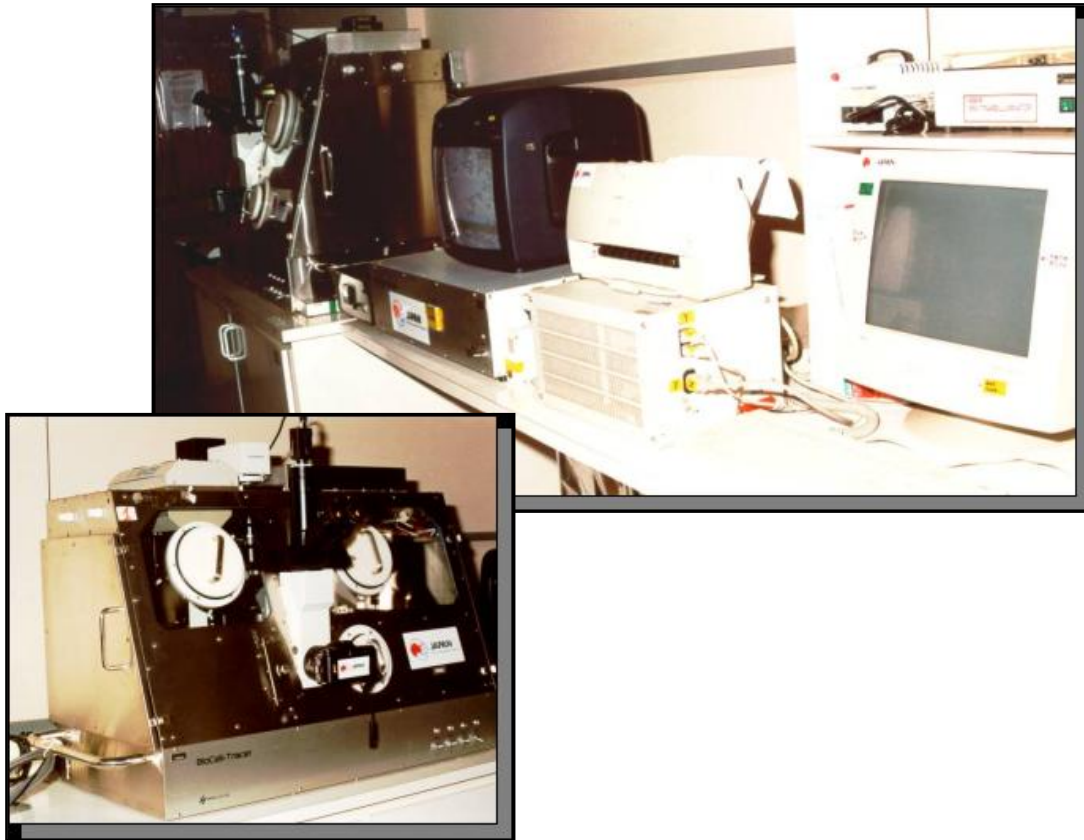


Fig.1- Sistema BCT® .

B- Imagem do equipamento disponível no Laboratório de Epidemiologia Molecular e Doenças Infecciosas do HC Unicamp. Em destaque está a câmara incubadora.

O cálculo da taxa de crescimento de pseudo-hifa, feita automaticamente pelo programa, consiste na divisão do valor correspondente ao crescimento da pseudo-hifa no tempo determinado, a cada 5min (L1), dividido pela subtração dos tempos final (t1) menos inicial (t0), também a cada 5min ($V1 = L1 / (t1-t0)$, $V2 = L2 / (t2-t1)$,...). Os dados obtidos são transferidos para uma planilha de EXCEL (Microsoft – USA), onde a Taxa de Inibição (TI) é calculada utilizando a fórmula ($TI = CI - CP / CI \times 100$). CI e CP representam a média de crescimento durante o período de pré-exposição (30min iniciais) e pós-exposição (últimos 15-30min) à droga, respectivamente.

A análise foi feita a partir de 10-20 extremidades de pseudo-hifas de *C. albinas*. Cada experimento foi reproduzido em duplicata ou triplicata, onde foram observadas de 1 a 2 placas sendo marcadas em cada experimento de 15 a 40 pseudo-hifas. A temperatura utilizada nos experimentos foi de 37°C. O tempo de acompanhamento do crescimento das extremidades das pseudo-hifas para os experimento foi ajustado ao nosso modelo de estocagem para as cepas, sendo padronizado com variação de 2:30h (para ANF) a 4:30h (para FCZ e 5-FC), onde os primeiros 30min serviram para acompanhamento do crescimento sem a adição do antifúngico e após esses 30min foi observada a ação dos antifúngicos FCZ, 5-FC e ANF sozinhos, em combinação (ao mesmo tempo e em tempos diferenciados). No caso dos controles positivos foi adicionado apenas o meio RPMI 1640 suplementado, sem antifúngicos. Para uma melhor definição de imagem de pseudo-hifas foram preparadas placas coradas com azul de bromofenol, com posterior visualização em microscópio (Fig 4B).



4- RESULTADOS

4.1- RESULTADO DO TESTE DE RESISTÊNCIA AO FLUCONAZOL

As cepas de referência ATCC 90028 (sensível FCZ), IFM 48139 e 48138 (resistentes FCZ), bem como os isolados clínicos UN 205, UN 219 e UN 238, estão listados na Tabela 2 com seus respectivos valores de CIM e TI do crescimento de pseudo-hifas no BCT[®], para *C. albicans* com adição de FCZ 64µg/mL. Observamos valores de CIM de suscetibilidade ao FCZ (1µg/mL) para os isolados UN 205 e UN 238 e um valor de dose-dependência (32µg/mL) para a cepa UN 219.

Tabela 2- Taxas de inibição (TI) do crescimento das pseudo-hifas de *C. albicans*, para adição de FCZ 64µg/mL e seus respectivos controles (sem adição do antifúngico), geradas através do Sistema BCT[®]. Também estão descritas as médias do crescimento inicial de pseudo-hifas (CI) durante os 30min iniciais do experimento (pré-exposição) e dos 30min finais, pós-adicação (CP).

Cepa	CI (µm/5 min)	CP (µm/5 min)	TI (FCZ)	TI (controle)	CIM
ATCC 90028	0.94	0.27	70.90%	-72.37%	1µg/mL
IFM 48139	1.46	1.17	19.43%	-59.41%	64µg/mL
IFM 48138	1.09	1.16	6.89%	-131.99%	64µg/mL
UN 205	1.11	0.29	73.04%	-38.32%	1µg/mL
UN 219	1.06	0.38	64.27%	-33.12%	32µg/mL
UN 238	1.01	0.33	67.07%	-28.12%	1µg/mL

Nas Figuras 2 e 3 estão representadas as curvas de crescimento das cepas estudadas com adição do FCZ (64 μ g/mL). É possível diferenciar claramente o comportamento das amostras resistentes das sensíveis.

Além dos registros gráficos, visualizamos o crescimento das pseudo-hifas de *C. albicans* em monitor de TV, gravando em fita de vídeo cassete grande parte dos experimentos, além de fotografarmos as pseudo-hifas (Fig. 4).

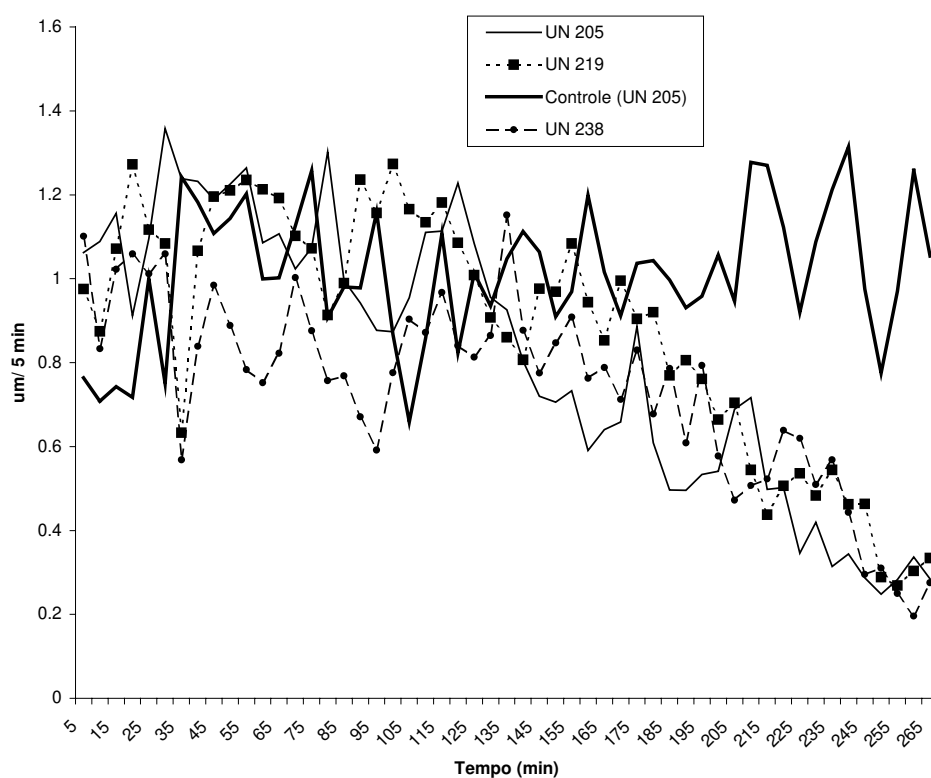


Figura 2- Curva de crescimento das cepas UN 205, UN 219 e UN 238 com adição de FCZ 64 μ g/mL. Como referência está a curva de crescimento da cepa UN 205 sem adição do FCZ.

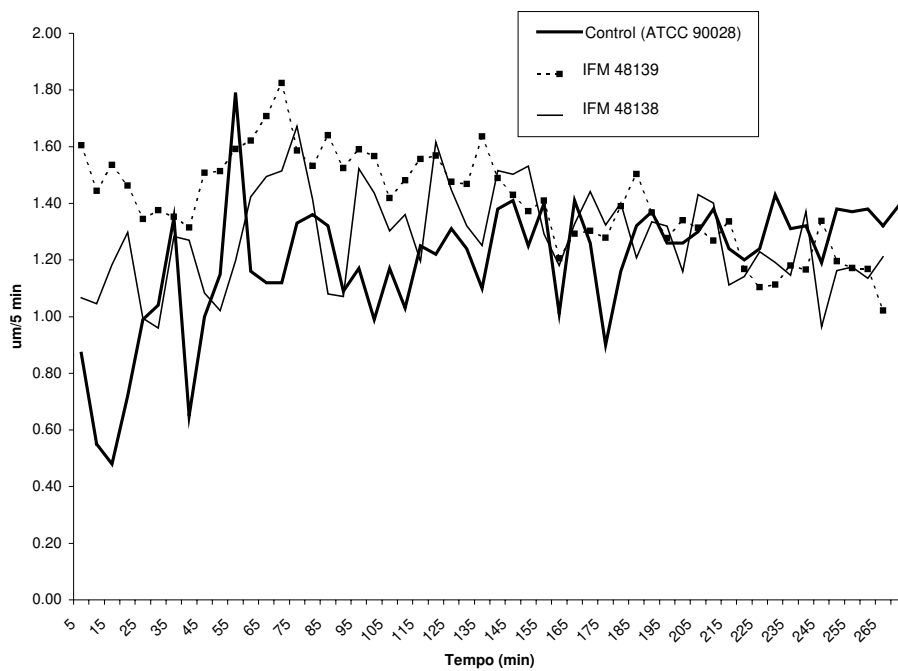


Figura 3- Curva de crescimento das cepas IFM 48139, IFM 48138 com adição de FCZ 64µg/mL e ATCC 90028 sem adição do FCZ, como referência.

A-Visualização no BCT[®]



B-Visualização após coloração com azul de bromofenol



Fig. 4- Observação de pseudo-hifas de *C. albicans* fixada por poli-L-lisina, incubação a 37°C por 3h em RPMI 1640.

4.2- RESULTADOS DOS TESTES DE SUSCETIBILIDADE PARA FLUCONAZOL, 5-FLUOROCITOSINA E ANFOTERICINA B:

Os valores encontrados de CIM para as cepas nos testes com FCZ, 5-FC e ANF estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3- Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) para as cepas de *C. albicans*, testadas com fluconazol, 5-fluorocitosina e anfotericina B

	Cepas/CIM			
	IFM 48138	ATCC 90028	UN 219	UN 205
Antifúngicos				
Fluconazol	64µg/mL	1µg/mL	32µg/mL	1µg/mL
Anfotericina B	1µg/mL	1µg/mL	0.5µg/mL	1µg/mL
5-Fluorocitosina	2µg/mL	1µg/mL	0.125µg/mL	0.125µg/mL

Os Valores de CIM Combinada para ANF/5-FC e ANF/FCZ estão relacionados na Tabela 4, em conjunto com os valores do cálculo da Concentração Inibitória Fracionária (CIF) obtidos da combinação dos mesmos antifúngicos. Observamos para as combinações antifúngicas valores de CIF indicativos de sinergismo e antagonismo.

Tabela 4- Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) Combinada para as cepas de *C. albicans* e seus respectivos valores do Calculo de Concentração Inibitória Fracionária (CIF).

	CIM Combinada			
	ANF5-FC (µg/mL)CIF	CIF	ANF/ FCZ (µg/mL)	CIF
Cepas				
ATCC 90028	0.25/0.5	0.75	1/0.25	0.62
IFM 48138	0.25/1	0.75	1/64	2.5
UN 219	0.25/0.5	0.75	0.25/0.5	0.5
UN 205	0.25/0.25	0.75	0.25/0.5	0.75

Obs: Parâmetro para definição de sinergismo $CIF \leq 0.5$, adição = 1 e antagonismo ≥ 2 .

Os valores encontrados das taxas de inibição do crescimento de pseudo-hifas das cepas estudadas através do Sistema BCT[®] estão relacionados nas Tabela 5 a 8, em conjunto com os valores de seus respectivos controles (as mesmas cepas analisadas sem adição dos antifúngicos), além das médias de crescimento pré e pós adição da droga (CI e CP). Foram utilizadas diferentes concentrações de FCZ, ANF e 5-FC, bem como adições combinadas dos antifúngicos 5-FC/ANF e FCZ/ANF.

Tabela 5- Taxas de inibição (TI) do crescimento de pseudo-hifas de *C. albicans* (cepa ATCC 90028) e seus respectivos controles (sem adição do antifúngico), geradas através do Sistema BCT[®]. Também estão descritas as médias do crescimento inicial de pseudo-hifas (CI) durante os 30min iniciais do experimento (pré-exposição) e dos 30min finais, pós-adicação (CP).

Antifúngicos (µg/mL)	CI (µm/5 min)	CP (µm/5 min)	TI
Anfotericina B			
1.0	0.95	0.03	96.17%
0.5	1.12	0.04	95.61%
0.25	1.09	0.03	96.93%
0.125	0.80	0.10	86.63%
5-Fluorocitosina			
1.0	1.32	0.52	60.56%
0.5	1.11	0.72	34.67%
0.25	1.10	0.61	44.12%
Fluconazol			
1	1.03	0.38	63.03%
0.5	0.96	0.77	20.16%
0.25	1.14	1.01	10.61%
0.125	0.96	1.18	-23.25%
0.06	0.94	1.06	-12.15%
5-FC/ ANF (µg/mL)			
0.5/ 0.25	1.17	0.07	93.92%
0.25/ 0.125	0.84	0.05	93.15%
0.125/ 0.06	1.06	0.17	83.43%
FCZ/ANF (µg/mL)			
0.25/1	1.26	0.04	96.94%
0.125/0.5	1.17	0.04	96.28%
0.06/0.25	1.03	0.09	90.93%
Controle	0.77	1.33	-73.37%

Tabela 6- Taxas de inibição (TI) do crescimento de pseudo-hifas de *C. albicans* (cepa IFM 48138) e seus respectivos controles (sem adição do antifúngico), geradas através do Sistema BCT[®]. Também estão descritas as médias do crescimento inicial de pseudo-hifas (CI) durante os 30min iniciais do experimento (pré-exposição) e dos 30min finais, pós-adicação (CP).

Antifúngicos (µg/mL)	CI (µm/5 min)	CP (µm/5 min)	TI
Anfotericina B			
1.0	1.27	0.04	96.47%
0.5	0.72	0.04	94.15%
0.25	0.81	0.03	96.10%
0.125	1.08	0.06	93.67%
0.06	1.36	0.07	94.76%
5-Fluorocitosina			
2.0	0.93	0.42	54.79%
1.0	0.99	0.60	39.61%
0.5	1.22	0.76	38.08%
0.25	1.23	0.78	36.62%
Fluconazol			
64	1.09	1.16	6.89%
5-FC/ ANF (µg/mL)			
1/ 0.25	1.07	0.04	95.84%
0.5/ 0.125	0.69	0.05	91.53%
0.25/ 0.06	0.97	0.10	89.65%
FCZ/ANF (µg/mL)			
64/1	1.00	0.05	94.61%
Controle	0.64	1.50	-131.99%

Tabela 7- Taxas de inibição (TI) do crescimento de pseudo-hifas de *C. albicans* (cepa UN 205) e seus respectivos controles (sem adição do antifúngico), geradas através do Sistema BCT[®]. Também estão descritas as médias do crescimento inicial de pseudo-hifas (CI) durante os 30min iniciais do experimento (pré-exposição) e dos 30min finais, pós-adição (CP).

Antifúngicos (µg/mL)	CI (µm/5 min)	CP (µm/5 min)	TI
Anfotericina B			
1.0	0.93	0.05	94.59%
0.5	1.01	0.04	95.28%
0.25	0.98	0.04	95.74%
0.125	0.98	0.02	97.57%
0.06	1.34	0.05	95.65%
0.03	1.28	0.58	54.04%
5-Fluorocitosina			
0.25	1.11	0.16	85.52%
0.125	0.93	0.25	73.20%
0.06	1.19	0.40	65.82%
Fluconazol			
1	1.17	0.68	42.30%
0.5	0.92	0.42	54.05%
0.25	1.25	0.94	24.92%
0.125	1.13	0.80	29.21%
0.06	1.45	1.39	4.41%
5-FC/ ANF (µg/mL)			
0.25/0.25	1.18	0.05	95.17%
0.125/0.125	1.08	0.05	94.57%
0.06/0.06	1.00	0.18	82.17%
FCZ/ANF (µg/mL)			
0.5/0.25	1.20	0.04	96.30%
0.25/0.125	1.32	0.05	96.12%
0.125/0.06	0.96	0.06	93.25%
0.06/0.03	1.47	0.65	55.78%
Controle	0.78	1.07	-38.04%

Tabela 8- Taxas de inibição (TI) do crescimento de pseudo-hifas de *C. albicans* (cepa UN 219) e seus respectivos controles (sem adição do antifúngico), geradas através do Sistema BCT[®]. Também estão descritas as médias do crescimento inicial de pseudo-hifas (CI) durante os 30min iniciais do experimento (pré-exposição) e dos 30min finais, pós-adicação (CP).

Antifúngicos (µg/mL)	CI (µm/5 min)	CP (µm/5 min)	TI
Anfotericina B			
0.5	1.61	0.05	96.78%
0.25	1.43	0.06	95.58%
0.125	1.04	0.04	95.28%
0.06	1.31	0.07	94.09%
0.03	1.41	0.55	60.67%
5-Fluorocitosina			
0.5	1.28	0.60	53.10%
0.25	1.23	0.64	47.63%
0.125	1.39	0.96	30.40%
Fluconazol			
32	1.34	0.35	73.54%
0.5	1.34	0.65	51.79%
0.25	1.55	0.78	49.82%
0.125	1.30	1.26	3.49%
0.06	1.34	1.48	-10.81%
5-FC/ ANF (µg/mL)			
0.5/0.25	1.48	0.05	96.48%
0.25/0.125	1.09	0.06	94.41%
0.125/0.06	1.21	0.15	87.41%
FCZ/ANF (µg/mL)			
0.5/0.25	1.30	0.04	96.79%
0.25/0.125	1.12	0.04	95.76%
0.125/0.06	1.05	0.06	93.86%
0.06/0.03	1.44	0.32	77.19%
Controle	1.24	1.65	-33.12%

Na Figura 5 estão ilustradas curvas de crescimento da cepa UN 205 com adição de diferentes concentrações de ANF.

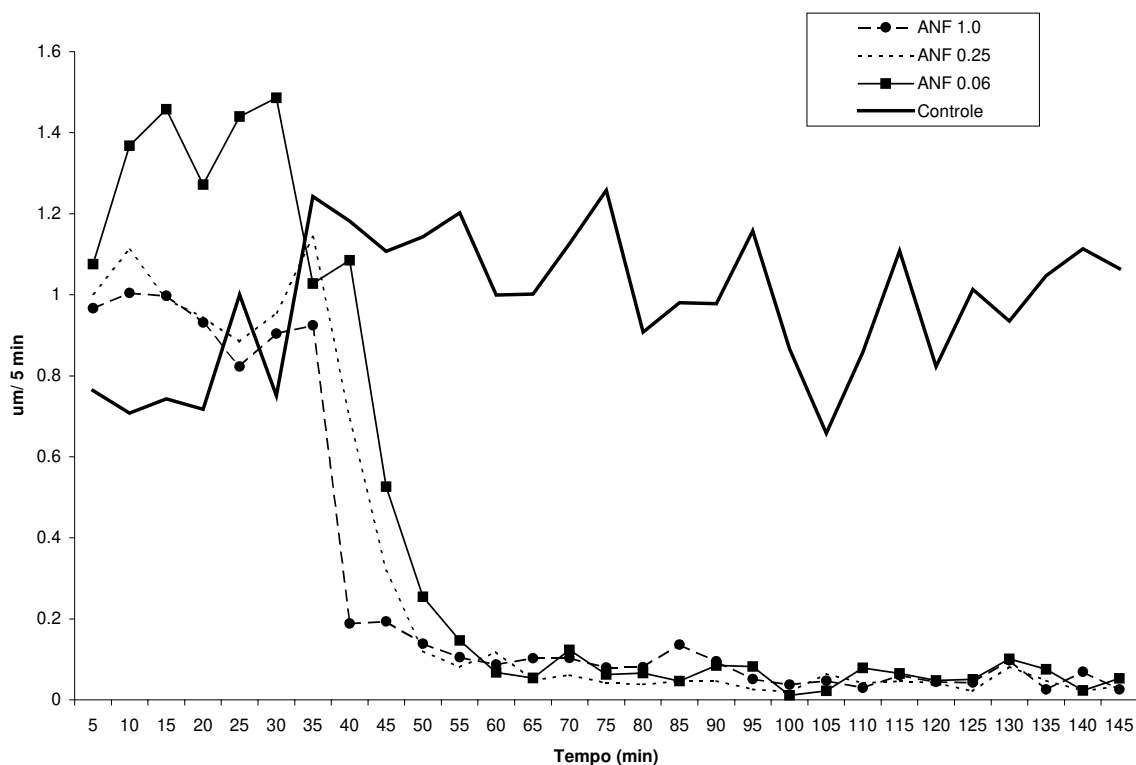


Figura 5- Curvas de crescimento da cepa UN 205 com adição de diferentes concentrações de ANF e o perfil de crescimento do seu controle sem adição, obtidas através do Sistema BCT[®].

Nas Tabelas 9 a 12 estão os resultados dos testes feitos com combinações escolhidas (em torno de 90% de inibição) de ANF/5-FC e ANF/FCZ, com adição em conjunto (30 minutos) ou em tempos seqüenciais (adição de 5-FC ou FCZ nos 30min de crescimento da cepa e de ANF com 10, 20 e 30 minutos após a adição anterior). Estes testes foram feitos com o intuito de analisar possíveis efeitos sinérgicos ou antagônicos das drogas combinadas.

Tabela 9- Efeito sinérgico ou antagônico dependente de tempo para adições combinadas dos antifúngicos 5-FC/ANF e FCZ/ANF no crescimento de pseudo-hifas de *C. albicans* (cepa ATCC 90028), geradas através do Sistema BCT[®]. Estão descritas as Taxas de inibição (TI) e as médias do crescimento inicial de pseudo-hifas (CI) durante os 30min iniciais do experimento (pré-exposição) e dos 30min finais, pós-adição (CP).

Antifúngicos (µg/mL)	CI (µm/5 min)	CP (µm/5 min)	TI
5- FC 0.25 + ANF 0.125			
<i>5- FC + ANF (adição simultânea)</i>			
5- FC (30 min) + ANF (30 min)	0.84	0.05	93.15%
<i>5- FC + ANF (adição separada)</i>			
5- FC (30 min) + ANF (40 min)	0.80	0.05	93.95%
5- FC (30 min) + ANF (50 min)	0.87	0.04	95.41%
5- FC (30 min) + ANF (60 min)	1.08	0.08	91.93%
FCZ 0.125 + ANF 0.5			
<i>FCZ + ANF (adição simultânea)</i>			
FCZ (30 min) + ANF (30 min)	1.17	0.04	96.28%
<i>FCZ + ANF (adição separada)</i>			
FCZ (30 min) + ANF (40 min)	0.99	0.02	97.33%
FCZ (30 min) + ANF (50 min)	1.18	0.06	96.47%
FCZ (30 min) + ANF (60 min)	0.82	0.06	92.25%

Tabela 10- Efeito sinérgico ou antagônico dependente de tempo para adições combinadas dos antifúngicos 5-FC/ANF e FCZ/ANF no crescimento de pseudo-hifas de *C. albicans* (cepa IFM 48138), geradas através do Sistema BCT[®]. Estão descritas as Taxas de inibição (TI) e as médias do crescimento inicial de pseudo-hifas (CI) durante os 30min iniciais do experimento (pré-exposição) e dos 30min finais, pós-adição (CP).

Antifúngicos (µg/mL)	CI (µm/5 min)	CP (µm/5 min)	TI
5- FC 0.5 + ANF 0.125			
<i>5- FC + ANF (adição simultânea)</i>			
5- FC (30 min) + ANF (30 min)	0.69	0.05	91.53%
<i>5- FC + ANF (adição separada)</i>			
5- FC (30 min) + ANF (40 min)	0.98	0.05	94.70%
5- FC (30 min) + ANF (50 min)	1.02	0.05	95.26%
5- FC (30 min) + ANF (60 min)	1.11	0.08	92.77%
FCZ 64 + ANF 1			
<i>FCZ + ANF (adição simultânea)</i>			
FCZ (30 min) + ANF (30 min)	1.00	0.05	94.61%
<i>FCZ + ANF (adição separada)</i>			
FCZ (30 min) + ANF (40 min)	0.83	0.03	96.49%
FCZ (30 min) + ANF (50 min)	1.13	0.04	96.04%
FCZ (30 min) + ANF (60 min)	1.12	0.03	96.67%

Tabela 11- Efeito sinérgico ou antagônico dependente de tempo para adições combinadas dos antifúngicos 5-FC/ANF e FCZ/ANF no crescimento de pseudo-hifas de *C. albicans* (cepa UN 205), geradas através do Sistema BCT[®]. Estão descritas as Taxas de inibição (TI) e as médias do crescimento inicial de pseudo-hifas (CI) durante os 30min iniciais do experimento (pré-exposição) e dos 30min finais, pós-adicação (CP).

Antifúngicos ($\mu\text{g/mL}$)	CI ($\mu\text{m}/5 \text{ min}$)	CP ($\mu\text{m}/5 \text{ min}$)	TI
5- FC 0.125 + ANF 0.125			
<i>5- FC + ANF (adição simultânea)</i>			
5- FC (30 min) + ANF (30 min)	1.08	0.05	94.57%
<i>5- FC + ANF (adição separada)</i>			
5- FC (30 min) + ANF (40 min)	1.16	0.11	89.99%
5- FC (30 min) + ANF (50 min)	1.12	0.04	95.93%
5- FC (30 min) + ANF (60 min)	1.10	0.14	87.19%
FCZ 0.125 + ANF 0.06			
<i>FCZ + ANF (adição simultânea)</i>			
FCZ (30 min) + ANF (30 min)	0.96	0.06	93.25%
<i>FCZ + ANF (adição separada)</i>			
FCZ (30 min) + ANF (40 min)	1.64	0.47	70.77%
FCZ (30 min) + ANF (50 min)	1.53	0.53	64.95%
FCZ (30 min) + ANF (60 min)	1.11	0.15	86.54%

Tabela 12- Efeito sinérgico ou antagônico dependente de tempo para adições combinadas dos antifúngicos 5-FC/ANF e FCZ/ANF no crescimento de pseudo-hifas de *C. albicans* (cepa UN 219), geradas através do Sistema BCT[®]. Estão descritas as Taxas de inibição (TI) e as médias do crescimento inicial de pseudo-hifas (CI) durante os 30min iniciais do experimento (pré-exposição) e dos 30min finais, pós-adicação (CP).

Antifúngicos (µg/mL)	CI (µm/5 min)	CP (µm/5 min)	TI
5- FC 0.25 + ANF 0.125			
<i>5- FC + ANF (adição simultânea)</i>			
5- FC (30 min) + ANF (30 min)	1.09	0.06	94.41%
<i>5- FC + ANF (adição separada)</i>			
5- FC (30 min) + ANF (40 min)	1.52	0.05	96.69%
5- FC (30 min) + ANF (50 min)	1.49	0.44	70.15%
5- FC (30 min) + ANF (60 min)	1.35	0.55	59.27%
FCZ 0.125 + ANF 0.06			
<i>FCZ + ANF (adição simultânea)</i>			
FCZ (30 min) + ANF (30 min)	1.05	0.06	93.86%
<i>FCZ + ANF (adição separada)</i>			
FCZ (30 min) + ANF (40 min)	1.59	1.29	18.85%
FCZ (30 min) + ANF (50 min)	1.37	1.02	25.33%
FCZ (30 min) + ANF (60 min)	2.06	1.99	3.42%

Nas Figuras 6 e 7 podemos visualizar o comportamento das curvas de crescimento de *C. albicans* ATCC 90028 e UN 219, quando adicionadas as concentrações combinadas de ANF mais 5-FC e ANF mais FCZ, respectivamente, comparadas com seus controles, sem adição do antifúngico. Na Figura 8 encontra-se a representação gráfica da dinâmica de crescimento da cepa UN 219, na adição combinada FCZ/ANF, em tempos diferentes.

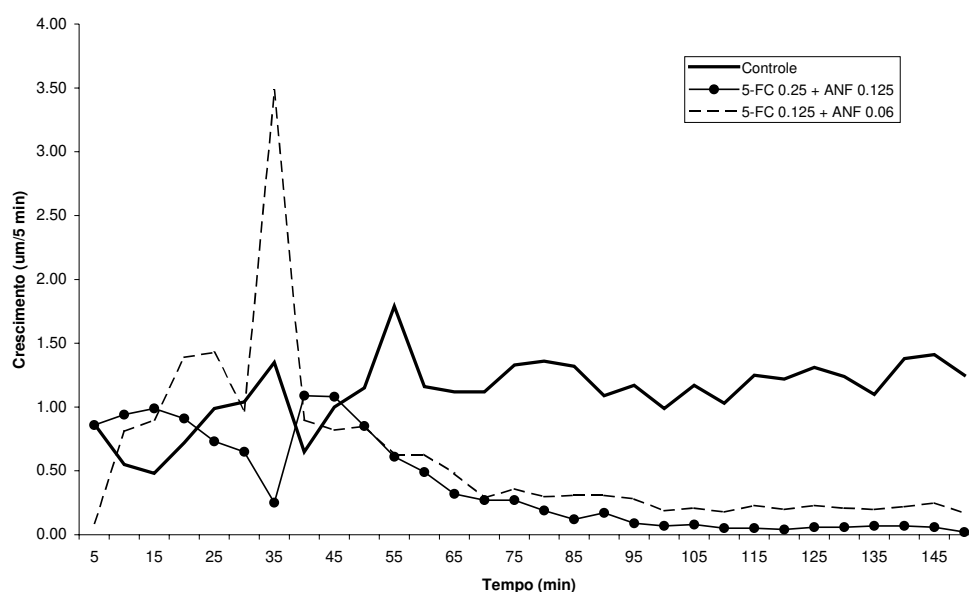


Figura 6- Curvas de crescimento da cepa ATCC 90028 com adição da combinação de 5-FC mais ANF, e o perfil de crescimento do seu controle sem adição, obtidas através do Sistema BCT[®].

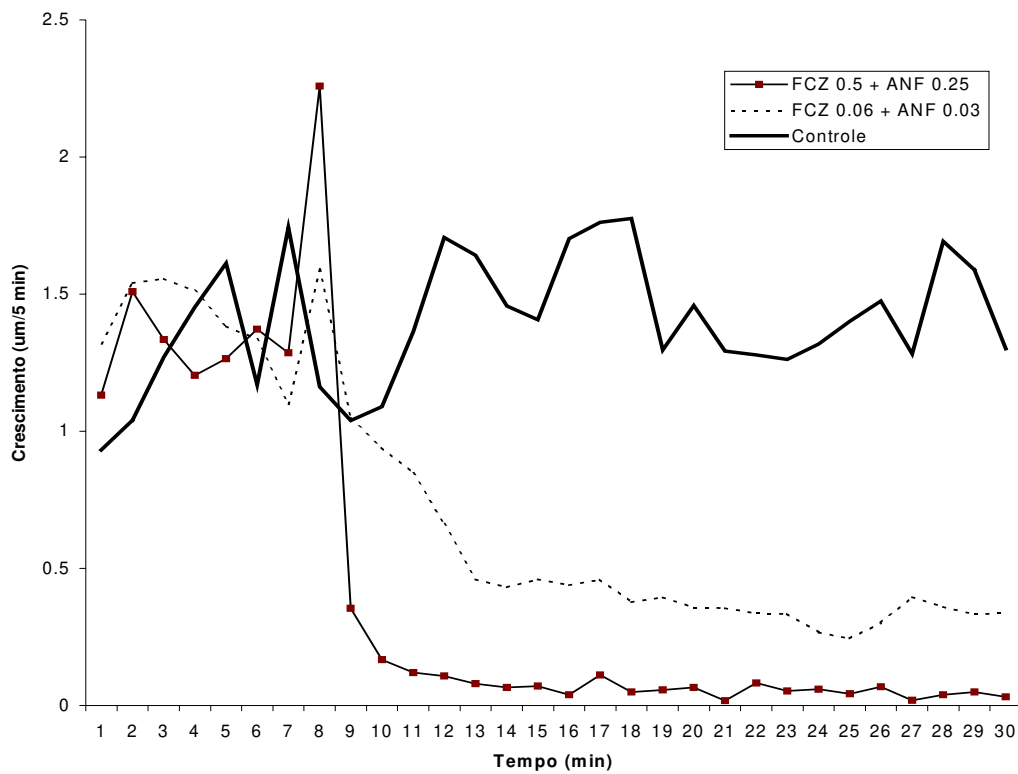


Figura 7- Curvas de crescimento da cepa UN 219 com adição da combinação de FCZ mais ANF, e o perfil de crescimento do seu controle sem adição, obtidas através do Sistema BCT®.

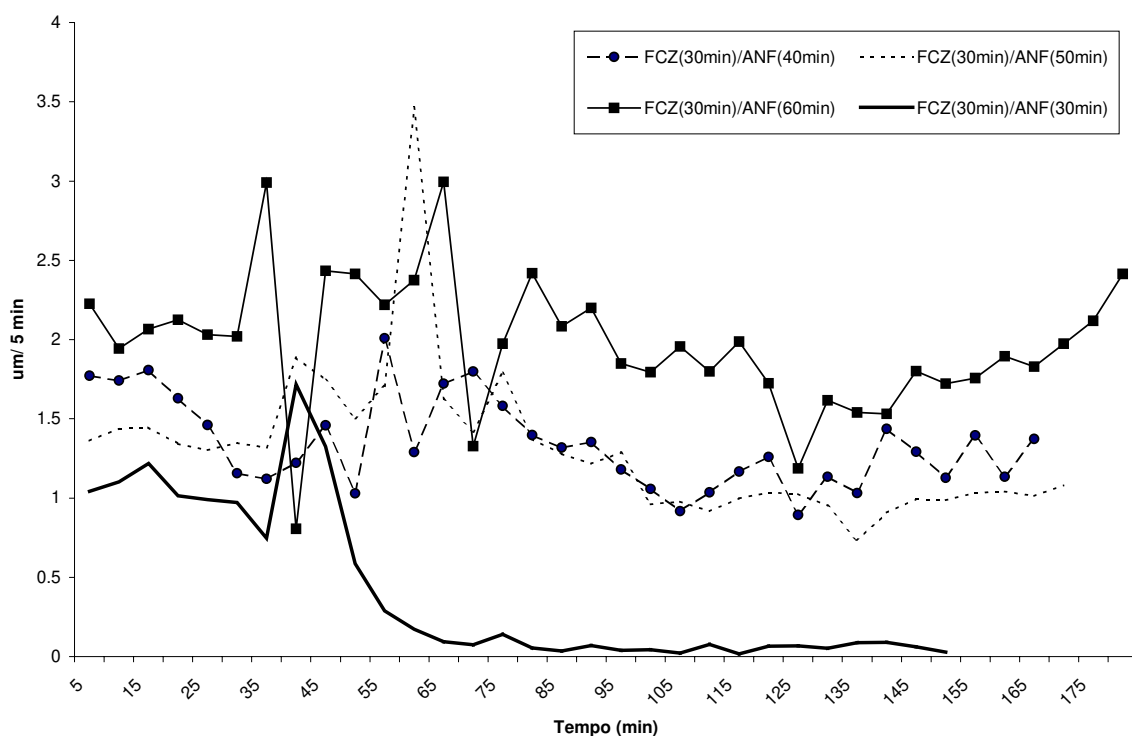


Figura 8- Curvas de crescimento da cepa UN 219 com adição da combinação de FCZ mais ANF, simultaneamente e em tempos seqüenciais, obtidas através do Sistema BCT®.



5- DISCUSSÃO

A maioria dos pesquisadores tem estudado *in vitro* apenas os estágios iniciais do crescimento de hifa fúngica, sendo os eventos que se sucedem igualmente importantes. O método BCT[®] propõe a análise de estágios subseqüentes ao surgimento de hifa, pseudo-hifas fúngica, permitindo uma análise refinada de sua inibição em resposta a drogas antifúngicas (OH et al. 1995). Neste estudo, utilizamos o sistema BCT[®] para analisar o crescimento de pseudo-hifas de *C. albicans* em resposta aos antifúngicos FCZ, ANF, 5-FC, isolados e de forma combinada (FCZ/ANF e 5-FC/ANF) em conjunto e em tempos seqüenciais.

O FCZ é um importante antifúngico utilizado no tratamento de pacientes com Aids, devido a sua baixa toxicidade e suas formulações de administração, via oral e parenteral (TERREL & HUGHES, 1992). Contudo, alguns relatos de resistência secundária ao FCZ tem sido descritos (WINGARD, 1995). Por este motivo, utilizamos o BCT[®] para avaliar o comportamento de suscetibilidade de cepas de *C. albicans* na presença de 64µg/mL de FCZ, valor referente a maior concentração utilizada na clínica.

As cepas de referência ATCC 90028 (sensível ao FCZ), IFM 48139 e IFM 48138 (resistentes ao FCZ) apresentaram comportamento esperado, tanto para os valores obtidos com a microdiluição em caldo, quanto para TI no BCT[®]. A cepa ATCC 90028 apresentou taxa de inibição do crescimento de 70.90 %, a IFM 48139 19.43% e IFM 48138 6.89%, o que indica, nestes últimos casos uma baixa TI para pseudo-hifas. Os isolados clínicos UN 205, UN 219 e UN 238 apresentaram comportamento de suscetibilidade, estando suas taxas de inibição do crescimento variando entre 64.27% a 73.04%. Os valores de CIMs encontrados para UN 205 e UN 238 foram de 1µg/mL, e para a UN 219 de 32µg/mL, o que representa valores de suscetibilidade e dose-dependência, respectivamente. Não detectamos grandes diferenças na taxa de inibição do crescimento da cepa UN 219, quando utilizamos a concentração de 32 µg/mL de FCZ, sendo a mesma de 73.54%. As taxas de inibição dos controles (cepas sem adição da droga) foram todas negativas, indicando um crescimento contínuo das pseudo-hifas rastreadas.

Os resultados obtidos com o teste de resistência ao FCZ, encontrados no BCT[®] foram similares àqueles utilizando o teste padrão de microdiluição em caldo, sugerindo diferentes classes de taxas de inibição que poderiam ser agrupadas como valores correspondentes à suscetibilidade (acima de 60%) e resistência (até 20%). Entretanto, outros estudos são necessários com uma maior quantidade de amostras, maior número de experimentos por amostra e em diferentes condições, para que se possa padronizar estes valores para aplicações clínicas.

Também avaliamos o comportamento de algumas cepas frente a diferentes concentrações de ANF, 5-FC, além de FCZ, bem como as combinações de 5-FC e FCZ com ANF. Na administração de ANF, todas concentrações apresentaram altas taxas de inibição (em torno de 90%). Por se tratar de uma droga fungicida, poderia se esperar que a ANF promovesse inibição total, ou de 100%, no BCT[®], como ocorre no teste de microdiluição em caldo. Contudo, existem diferenças entre estes métodos que poderiam explicar esta taxa residual de crescimento. A análise de CIM foi feita por inspeção visual, ao contrário do BCT[®] onde se acompanham pseudo-hifas individuais ao microscópio. Além disso, o tempo de experimento no BCT[®] (2:30 h) é inferior ao do teste de microdiluição em caldo (24-48 h), proporcionando um tempo menor de exposição à droga. Assim, células que exibissem certa tolerância ao antifúngico durante curto período de exposição, poderiam ser detectadas no BCT[®]. Outro fato que pode estar associado a este fenômeno é que no BCT[®] se analisam pseudo-hifas, enquanto no teste de microdiluição em caldo, populações de células. Estas estruturas vegetativas poderiam apresentar respostas diferentes, mesmo que pequenas variações, à presença de um antifúngico. A isto se associa o fato de termos observado que, mesmo utilizando concentrações menores que a CIM para ANF, obtivemos no BCT[®] taxas de inibição do crescimento de pseudo-hifas em torno de 90% para todas as cepas estudadas. Para 5-FC, as taxas de inibição foram mais baixas, variando entre 53.10% e 85.52% utilizando a concentração encontrada no teste de microdiluição em caldo para cada cepa. A CIM foi definida com 80% de inibição, por se

tratar a 5-FC de uma droga fungistática. Este crescimento residual pode ser equivalente no BCT[®] para as pseudo-hifas que tiveram menor inibição de crescimento, refletindo nas taxas de inibição mais baixas para 5-FC.

As taxas de inibição encontradas para FCZ utilizando o valor da CIM foram de 73.54% para UN 219, 63.03% para ATCC 90028 e 42.30% para UN 205. A baixa taxa de inibição encontrada para UN 205 pode ter sido consequência de algum artefato na realização do experimento.

Nos testes de microdiluição em caldo combinada para ANF/5-FC, os valores encontrados no cálculo de CIF foram de 0.75 para todas as cepas testadas, não sendo enquadrado em nenhuma categoria teórica, apesar de tender ao sinergismo. Os CIFs foram similares para as cepas ATCC 90028 e UN 205 na combinação ANF/FCZ. O CIF (2.5) da cepa resistente ao FCZ IFM 48138 para adição combinada de FCZ/ANF reflete o efeito antagonico exercido pela ANF, que é fungicida. A cepa UN 219 para a combinação ANF/FCZ apresentou CIF de 0.5, indicando sinergismo. Nos experimentos do BCT[®] com as drogas combinadas, as taxas de inibição utilizando os valores de CIM combinada e concentrações uma a duas vezes mais baixas ficaram em torno de 90%. Os valores de CIM combinada mais baixos, em torno de 90% de inibição, foram utilizados nos experimentos de BCT[®] com adição das drogas em tempos diferentes.

As taxas de inibição para adições combinadas em tempos diferentes mantiveram os padrões para adições simultâneas, com exceção dos isolados clínicos UN 205 e UN 219. A cepa UN 205 apresentou pequenas reduções na TI, quando ANF foi adicionada após FCZ. Contudo, estas variações foram menores do que as encontradas na cepa UN 219. Observamos que esta cepa apresentou uma variação de TI de 96.48% a 59.27%, utilizando ANF/5-FC em tempos diferenciados. Para a combinação de ANF/FCZ, ela apresentou comportamento singular, variando sua TI de 93.83% até 3.42%. Este dado difere do encontrado na microdiluição combinada, onde a CIF (0.5) indicou um efeito

sinérgico da drogas. Também, os testes combinados com estes antifúngicos no BCT[®] revelaram altas taxas de inibição. Neste caso, é possível que a administração inicial de FCZ tenha desencadeado algum mecanismo secundário de resistência a ANF, o que não aconteceria quando as drogas são administrados em conjunto.

A interação do FCZ com ANF já foi relatada em alguns estudos e as respostas *in vitro* para os testes com adição de FCZ antes da ANF indicaram antagonismo, sendo similares aos dados encontrados em nosso trabalho (ERNST et al., 1998). No entanto outros relatos indicam que para testes *in vivo* a resposta parece não ser a mesma. Neste caso, a adição de FCZ antes de ANF em ratos com candidemia não comprometeu o poder fungicida da ANF (SUGAR et al., 1995). ERNST et al., (1998), demonstrou que a atividade de ANF poderia ser recuperada após a remoção do FCZ *in vitro*. Este fenômeno poderia explicar o fato de não ter sido observado antagonismo entre as drogas nos ensaios com modelos animais. É possível que, por características próprias do organismo, como metabolização da droga, a recuperação da atividade fungicida de ANF seja mais rápida. Outro estudo (SUGAR et al., 1995) sugere que a interação das duas drogas é dependente da espécie de fungo utilizada no teste, mas no presente estudo observamos para as cepas avaliadas comportamentos diferenciados.

Nolte et al, 1997 descreve dois isolados de *C. albicans* obtidos de hemocultura de pacientes com leucemia submetidos a profilaxia com FCZ (400mg/dia) e ANF empírica (0.5mg/dia), que apresentaram resistência a estes antifúngicos e outros azólicos, sendo os mesmos pacientes anteriormente tratados com êxito com ANF e 5-FC, tendo CIMs referentes a suscetibilidade. Os resultados dos estudos detectaram mutação em um gene que codifica esteróis de membrana. A ausência de ergosterol de membrana em cepas resistentes ao FCZ produziria resistência a ANF. Entretanto, fenômenos de resistência cruzada ainda não estão totalmente compreendidos (WHITE et al, 1998).

O sistema BCT[®] permite que se analise o comportamento do fungo frente a adição combinada de drogas em tempos diferentes. Assim, a utilização do BCT[®] pode ser útil no estudo de casos onde se encontrem fenômenos de resistência cruzada ou comportamentos de sinergismo e antagonismo em cepas de fungos patogênicos.

Diferente do teste de microdiluição em caldo, que lida com massa de células e determina a inibição do crescimento fúngico por turbidez celular, o BCT[®] é capaz de acompanhar as nuances do crescimento dinâmico de pseudo-hifas em resposta a um agente antifúngico (OH et al., 1995). O modelo BCT[®] proporcionou um acompanhamento do crescimento das cepas estudadas com uma maior suscetibilidade, sendo possível verificar, por exemplo, as diferenciações a nível de membrana celular quando na presença de antifúngico específico. Tendo sido observado que alguns antifúngicos não são letais a certas espécies de fungo, sendo portanto somente inibidores do crescimento (COLOMBO et al., 1993), o BCT[®] nos fornece maior segurança na avaliação da inibição do crescimento. Além disto, a temperatura utilizada nos experimentos com BCT[®] (37° C) é próxima à encontrada no corpo humano, em contraste com a temperatura de 35°C dos testes da CIM, o que poderia melhor modular as condições do ambiente para o patógeno.

A análise completa do BCT[®] levou em torno de 9-12 h, enquanto o teste convencional de microdiluição em caldo leva de 24-48 h para fungos leveduriformes, como padronizado pelo NCCLS. Desta forma, o BCT[®] poderia ser implementado como um modelo alternativo na avaliação de suscetibilidade antifúngica em pacientes candidemicos, fornecendo respostas mais rápidas para que se possa contribuir com os procedimentos clínicos.

Este estudo contribuiu com novas informações a respeito de um sistema automatizado (BCT[®]) para análise de pseudo-hifas, que pode vir a ser utilizado no desenvolvimento de novas estratégias para uma rápida determinação de suscetibilidade antifúngica de *C. albicans* ou outros agentes infecciosos.



6- CONCLUSÕES

- Os resultados obtidos com o teste de resistência ao FCZ, encontrados no BCT[®] foram similares àqueles utilizando o teste padrão de microdiluição em caldo, sugerindo diferentes classes de taxas de inibição que poderiam ser agrupadas como valores correspondentes à suscetibilidade e resistência.

- A cepa UN 219 apresentou comportamento singular para a combinação de FCZ e ANF em tempos diferentes, variando sua taxa de inibição de 93.83% até 3.42%. Este dado difere do encontrado no CIM combinatório e nos testes com adição simultânea destes antifúngicos no BCT[®] e são similares a dados encontrados na literatura sobre administração seqüencial destas drogas.

- Este estudo contribuiu com novas informações a respeito de um sistema automatizado para análise de pseudo-hifas, que demonstrou ser versátil e mais rápido que os métodos convencionais na determinação de suscetibilidade antifúngica de *C. albicans*.



7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, S. & CURY, A. E. Estudo comparativo entre as técnicas de diluição em caldo e diluição em ágar , nos antibiogramas para *Candida*. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, 34: 259-262, 1992.

ANSHENG, L.; TAGUCHI, H.; MIYAJI, M.; NISHIMURA, K.; SHAOXI, W. Study on the hyphal response of *Aspergillus fumigatus* to the antifungal agent by bio-cell tracer. **Mycopathologia**, 148: 17-23, 1999.

BAKER, C.N.; STOCKER, S.A.; CULVER, D.H.; THORNSBERRY, C. Comparison of the Etest to agar dilution, broth microdilution, and agar diffusion susceptibility testing techniques by using a special challenge set of bacteria. **J Clin Microbiol**, 29: 533-538, 1991.

BERMAN, J. & SUDBERY, P.E. *Candida albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. **Nat Rev Genet**, 3: 918-932, 2002.

BODEY, G.P.; BUELTMANN, B.; DUGUID, W.; GIBBS, D.; HANAK, HOTCHI, M.; MALL, G.; MARTINO, P.; MEUNIER, F.; MILLIKEN, S.; NAOE, S.; OKUDAIRA, M.; SCEVOLA, D.; VAN'T WOUT, J. Fungal infections in cancer patients: an international autopsy survey. **Europ J Clin Microbiol Infect Dis**, 11: 99-109, 1992.

BODEY, G.P. Hematogenous and major organ candidiasis In. **Candidiasis: pathogenesis, dianosis and tratment**. Ed. Raven Press, New York, 1993. p.279-329.

BORG-VON, Z.M.; ZASCHKE, K.; GROSS, U.; MONOD, M.; MULLER, F.M. Effect of micafungin (FK463) on *Candida albicans* adherence to epithelial cells. **Chemotherapy**, 48(3): 148-53, 2002.

BRAWNER, D.L. & CUTLER, J.E. Oral *Candida albicans* isolates from nonhospitalized normal carries, immunocompetent hospitalized patients, and immunocompromised patients with or without acquired immunodeficiency syndrome. **J Clin Microbiol**, 27: 1335-1341, 1989.

BRAWNER, D.L.; ANDERSON, G.L.; YUEN, K.Y. Serotype prevalence of *Candida albicans* from blood culture isolates. **J Clin Microbiol**, 30: 149-153, 1992.

COLOMBO, A.L.; MCGOUGH, D.A.; RINALDI, M.G. Amphotericin B tolerance with *Aspergillus* species. In: **Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 33, New Orleans/Estados Unidos da América, 1993. Program and Abstracts, Washington, 1993, America Society for Microbiology, p.478. (Abstract, 748).

COLOMBO, A.L. **Avaliação in vitro, por três diferentes métodos, da sensibilidade de leveduras a antifúngicos azólicos.** São Paulo, 1994. (Tese – Doutorado - Escola Paulista de Medicina).

COLOMBO, A.L.; NUCCI, M.; SALOMÃO, R.; BRANCHINI, M.L.M.; RICHTMANN, R.; DEROSI, A.; WEY, S.B. High rate of non-*albicans* candidemia in brazilian tertiary care hospitals. **Diagn Microbiol Infect Dis**, 34: 281-289, 1999.

DEMBRY, L.M.; VAZQUEZ, J.A.; ZERVOS, M.J. DNA analysis in the study of the epidemiology of nosocomial candidiasis. **Infect Control Hosp Epidemiol**, 15: 48-53, 1994.

DUBE, M.P.; HESELTINE, P.N.; RINALDI, M.G.; EVANS, S.; ZAWACKI, B. Fungemia and colonization with nystatin-resistant *Candida rugosa* in a burn unit. **Clin Infect Dis**, 18: 77-82, 1994.

DUPONT, B.; GRAYBILL, J.R. ARMSTRONG, D.; LAROCHE, R.; TOUZÉ, J.E.; WHEAT, L.J. Fungal infections in AIDS patients. **J Med Vet Mycol**, 30(1): 9-28, 1992.

EDWARDS, J.E.; BODEY, G.P.; BOWDEN, R.A.; PAUW, B.E.; GHANNOUM, M.A.; GLAUSER, M.; HERBRECHT, R.; KAUFFMAN, C.A.; KONHO, S.; MARTINO, P.; MEUNIER, F.; MORI, T.; PFALLER, M.A.; PEX, J.H.; ROGERS, T.R.; RUBIN, R.H.; SOLOMKIM, J.; VISCOLI, C.; WALSH, T.J.; WHITE, M. International conference for the development of a consensus on the management and prevention of severe candidal infections. **Clin Infect Dis**, 25: 43-59, 1997.

EMMONS, C.W. Natural occurrence of opportunistic fungi. **Lab Invest**, 11: 1026-1032, 1962.

ERNST, E.J.; KLEPSEK, M.E.; PFALLER, M.A. In vitro interaction of fluconazole and amphotericin B administered sequentially against *Candida albicans*: effect of concentration and exposure time. **Diagn Microbiol Infect Dis**, 32: 205-210, 1998.

ESPINEL-INGROFF, A. Clinical relevance of antifungal resistance. **Infect. Dis. Clin. North America**, 11(4): 929-944, 1997.

GALGANI, J.N.; RINALDI, M.G.; POLACK, A.M.; PFALLER, M.A. Standardization of antifungal susceptibility testing. **J Med Vet Mycol**, 30(1): 213-224, 1992.

GHANNOUM, M. & ABU-ELTEEN, K.H. Pathogenicity determinants of *Candida*. **Mycoses**, 33: 265-282, 1990.

GHANNOUM, M.A.; REX, J.H.; GALGANI, J.N. Susceptibility testing of fungi: current status of correlation of in vitro data with clinical outcome. **J Clin Microbiol**, 34: 489-495, 1996.

GRAHAM, W.G. The dynamics of hyphal growth. **Mycol Res**, 99: 385-394, 1995.

GRANIER, F. Antifungal treatments. **Presse Med**, 30;31(38): 1785-91, 2002.

GUPTA, T.P. & EHRINPREIS. *Candida*-associated diarrhea in hospitalized patients. **Gastroent**, 98: 780-785, 1990.

HANENCLEVER, H.F. & MITCHELL, W.O. Antigenic studies of *Candida*. I. Observation of two antigenic groups in *Candida albicans*. **J Bacteriol**, 82: 570-573, 1961a.

HANENCLEVER, H.F. & MITCHELL, W.O. Antigenic studies of *Candida*. III. Comparative pathogenicity of *Candida albicans* group A, group B, and *Candida stellatoidea*. **J Bacteriol**, 82: 578-581, 1961b.

HOEPRICH, P.D. Clinical use of amphotericin B and derivatives: lore, mystique, and fact. **Clin Infect Dis**, 14(1): 114-119, 1992.

HOEPRICH, P.D.; INGRAHAM, J.L.; KLEKER, E.; WINSHIP, M.J. Development of resistance to 5-fluorocytosine in *Candida parapsilosis* during therapy. **J Infect Dis**, 130: 112-118, 1974.

HOLMBERG, K. & MEYER, R.D. Fungal infections in patients with AIDS and AIDS-related complex. **Scand J Infect Dis**, 18: 407-421, 1986.

HORN, R.; WONG, B.; KIEHN, T.; ARMSTRONG, D. Fungemia in a cancer hospital: changing frequency, onset and results of therapy. **Ver Infect Dis**, 7: 646-655, 1985.

IIDA, Y.; OH, K.; SAITO, M.; KURATA, H.; NATSUME, M.; ABE, H. Detection of antifungal activity in *Anemarrhena asphodeloides* by sensitive BCT method and isolation of its active compound. **J Agric Food Chem**, 47: 584-587, 1999.

INOUC, S.; TSURUOKA, T.; WATANABE, M.; TAKEO, K.; AKAO, M.; NISHIYAMA, Y.; YAMAGUCHI, H. Inhibitory effect of essential oils on apical growth of *Aspergillus fumigatus* by vapour contact. **Mycoses**, 43: 17-23, 2000.

IWATA, K. Drug resistance in human pathogenic fungi. **Eur J Epidemiol**, 8: 407- 421, 1992.

JEU, L.; PIACENTI, F.J.; LYAKHOVETSKIY, A.G.; FUNG, H.B. Voriconazole. **Clin Ther**, 25(5): 1321-81, 2003.

JOHNSON, M.D. & PERFECT, J.R. Caspofungin: first approved agent in a new class of antifungals. **Expert Opin Pharmacother**, 4(5): 807-23, 2003.

KREGER VAN RIJ, N.J.W. **The yeasts: a taxonomic study**. Amsterdam, Elsevier, 1984. 1082p.

LAVERDIERE, M.; HOBAN, D.; RESTIERI, C.; HABEL, F. In vitro activity of three new triazoles and one echinocandin against *Candida* bloodstream isolates from cancer patients. **J Antimicrob Chemother**, 50(1): 119-23, 2002.

LETSCHER-BRU, V. & HERBRECHT, R. Caspofungin: the first representative of a new antifungal class. **J Antimicrob Chemother**, 51(3): 513-21, 2003.

LUNEL, F.M.V.; MEIS, J.F.G.M.; VOSS, A. Nosocomial fungal infections: candidemia. **Diagn Microbiol Infect Dis**, 34: 213-220, 1999.

MARCO, F.; DANES, C.; ALMELA, M.; JURADO, A.; MENSA, J.; DE LA BELLACASA, J.P.; ESPASA, M.; MARTINEZ, J.A.; JIMENEZ DE ANTA, M.T. Trends in frequency and in vitro susceptibilities to antifungal agents, including voriconazole and anidulafungin, of *Candida* bloodstream isolates, results from a six-year study. **Diagn Microbiol Infect Dis**, 46(4): 259-264, 2003.

MATSUOKA, H.; II, Y.; TAKEKAWA, Y.; TERAOKA, T. Evaluation of antifungal volatile compounds on the basis of the elongation rate of a single hypha. **Appl Env Microbiol**, 56: 3779-3784, 1990.

MCGINNIS, MR. **Laboratory handbook of medical mycology**. New York, Academic Press, 1980. 661p.

MEUNIER, F. Fungal infections in the compromised host. In R.H. Rubin and L.S. Youngs (ed.), **Clinical Approaches to Infection in the Compromised Host**. Plenum Publishing Corp., New York, 1998. p.193-220.

MEUNIER, F.; AOUN, M.; BITAR, N. Candidemia in immunocompromised patients. **Clin Infect Dis**, 14(1): 120-125, 1992.

MEYER, R.D. Current role of therapy with amphotericin B. **Clin Infect Dis**, 14(1): 154-160, 1992.

MULLER, F.M.; KURZAI, O.; HACKER, J.; FROSCHE, M.; MUHLSCHLEGEL, F. Effect of the growth medium on the in vitro antifungal activity of micafungin (FK-463) against clinical isolates of *Candida dubliniensis*. **J Antimicrob Chemother**, 48(5): 713-5, 2001.

NIELSEN, H.; STENDERUP, J.; BRUUN, B. Fungemia in a University Hospital 1984-1988. Clinical and Mycological characteristics. **Scand J Infect Dis**, 23: 275-282, 1991.

NOLTE, F.; PARKINSON, T.; FALCONER, D.; DIX, S.; WILLIAMS, J.; GILMORE, C.; GELLER, R.; WINGARD, J. Isolation and characterization of fluconazole and amphotericin B-resistant *Candida albicans* from blood of two patients with leukemia. **Antimicrob Agents Chemother**, 41(1): 196-199, 1997.

ODDS, F.C. **Candida and candidosis**. 2° ed. London, Baillière Tisdall, 1988. 468p.

ODDS, F.C. Sabouraud(´s) agar. **J Med Vet Mycol**, 29: 355-359, 1991.

OH, K.; MATSUKA, H.; SUMITA, O.; TAKATORI, K.; KURATA, H. Evaluation of antifungal activity of antimycotics by automatic analyzing system. **Mycopathologia**, 118: 71-81, 1992.

OH, K.; MATSUKA, H.; NEMOTO, Y.; SUMITA, O.; TAKATORI, K.; KURATA, H. Determination of anti-*Aspergillus* activity of antifungal agents based on the dynamic growth rate of a single hypha. **Appl Microbiol Biotechnol**, 39: 363-367, 1993.

OH, K.B.; YANG, H.C.; MATSUOKA, H.; YAMAMOTO, A.; KURATA, H. Combined effect of amphotericin B and flucytosine on hyphal growth of *Candida albicans* estimated at a single hypha level. **J Med Vet Mycol**, 33: 191-195, 1995.

PACETTI, S.A. & GELONE, S.P. Caspofungin acetate for treatment of invasive fungal infections. **Ann Pharmacother**, 37(1): 90-8, 2003.

PFALLER, M.A. Epidemiological typing methods for mycoses. **Clin Infect Dis**, 14: 04-10, 1992.

PFALLER, M.A. & BARRY, A.L. Evaluation of novel colorimetric broth microdilution method for antifungal susceptibility testing of yeast isolates. **J Clin Microbiol**, 32: 1992-1996, 1994.

PFALLER, M.A. Epidemiology of candidiasis. **J Hosp Infect**, 30: 329-338, 1995.

PFALLER, M.A.; BALE, M.; BUSCHELMAN, B.; LANCASTER, M.; ESPINELINGROFF, A.; REX, J.H.; RINALDI, M.G.; COOPER, C.R.; MCGINNIS, M.R. Quality control guidelines for National Committee for Clinical Laboratory Standards recommended broth microdilution testing of Amphotericin B, Fluconazole and Flucytosine. **J Clin Microbiol**, 33(5): 1104-1107, 1995.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J.; MESSER, S.A.; BOYKEN, L.; HOLLIS, R.J.; JONES, R.N. In vitro activities of voriconazole, posaconazole, and four license systemic antifungal agents against *Candida* species infrequently isolated from blood. **J Clin Microbiol**, 41(1): 78-83, 2003.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J.; MESSER, S.A.; HOLLIS, R.J.; JONES, R.N. In vitro activities of caspofungin compared with those of fluconazole and itraconazole against 3,959 clinical isolates of *Candida* spp., including 157 fluconazole-resistant isolates. **Antimicrob Agents Chemother**, 47(3): 1068-71, 2003.

REX, J.H.; PFALLER, M.A.; POLAK, A.; GALGANI, J.N. Antifungal susceptibility testing. **Clin Microbiol Rev**, 6:367-381, 1993.

REX, J.H.; PFALLER, M.A.; GALGANI, J.N.; BARTLETT, M.S.; ESPINEL-INGROFF, A.; GHANNOUM, M.A.; LANCASTER, M.; ODDS, F.C.; RINALDI, M.G.; WALSH, T.J.; BARRY, A.L. Development of interpretative breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of in vitro - in vivo correlation data for fluconazole, itraconazole, and *Candida* infections. **Clin Infect Dis**, 24: 235-247, 1997.

REX, J.H; PAPPAS, P.G; KARCHMER, A.W; SOBEL J; EDWARDS, J.E; HADLEY, S; BRASS, C; VAZQUEZ, J.A; CHAPMAN, S.W; HOROWITZ, H.W; ZERVOS, M; MCKINSEY, D; LEE, J; BABINCHAK, T; BRADSHER, R.W; CLEARY, J.D; COHEN, D.M; DANZIGER, L; GOLDMAN, M; GOODMAN, J; HILTON, E; HYSLOP, N.E; KETT, D.H; LUTZ, J; RUBIN, R.H; SCHELD, W.M; SCHUSTER, M; SIMMONS, B; STEIN, D.K; WASHBURN, R.G; MAUTNER, L; CHU, T.C; PANZER, H; ROSENSTEIN, R.B; BOOTH, J. A randomized and blinded multicenter trial of high-dose fluconazole plus placebo versus fluconazole plus amphotericin B as therapy for candidemia and its consequences in nonneutropenic subjects. **Clin Infect Dis**, 15;36(10): 1221-8, 2003.

RINALDI, G.M. Laboratory evaluation of antifungal agents: a brief overview. **Clin Infect Dis**, 14(1): 130-133, 1992.

RUECHEL, R. Virulence factor of *Candida* species. In: Samaranayake & Maccfarlane, T.W. Ed. **Oral Candidosis**. London, Wright, 1990. p.47-65.

SANCHEZ, M.L. & JONES, R.N. Etest, an antimicrobial susceptibility testing method with broad clinical and epidemiologic application. **Antimicrobial Newsletter**, 8: 01-07, 1993.

SAUBOLLE, M.A. & HOEPRICH, P.D. Disk agar diffusion susceptibility testing of yeasts. **Antimicrob Agents Chemother**, 14: 517-530, 1978.

SHEEHAN, D.J.; ESPINEL-INGROFF, A.; MOORE, L.S.; WEBB, C.D. Antifungal susceptibility testing of yeasts: a brief overview. **Clin Infect Dis**, 17(2): 494-500, 1993.

SIDRIM, J.J.C.; MOREIRA, J.L.B. **Fundamentos clínicos e laboratoriais de micologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p.287.

SUGAR, A.M. Use of amphotericin B with azole antifungal drugs: what are we doing? **Antimicrob Agents Chemother**, 39: 1970-12, 1995.

SUGAR, A.M.; HITCHCOCK, C.A.; TROKE, P.E.; PICARD, M. Combination therapy of murine invasive candidiasis with fluconazol and amphotericin B. **Antimicrob Agents Chemother**, 39: 598-601, 1995.

TAGUCHI, H.; MIYAJI, M.; NISHIMURA, K.; XU, M. Studies on the synergistic effect of amphotericin B and 5-fluorocytosine on the growth rate of single hyphae of *Aspergillus fumigatus* by a biocell-tracer system. **Mycoscience**, 36: 341-344, 1995.

TARRAND, J.J.; GUILLOT, C.; WENGLAR, M.; JACKSON, J.; LAJEUNESSE, J.D.; ROLTON, K.V. Clinical comparison of the resin-containing BACTEC 26 Plus and the Isolator 10 blood culture system. **J Clin Microbiol**, 29: 2245-2249, 1991.

TERREL, C.L. & HUGHES, C.E. Antifungal agents used for deep-seated mycotic infections. **Mayo Clin Proc**, 67: 69-91, 1992.

THE NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**. Pennsylvania: NCCLS, 1997, 32p.

THE NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**. Pennsylvania: NCCLS, 2003, 30p.

TORRES-RODRÍGUEZ, J.M.; & CARCELLER, A. Factores de patogenicidade en *Candida*. **Rev Iberoam Micol**, 02-07, 1993.

TUDELA, J.L.R.; RODELO, L.; ESTRELLA, M.C.; CÓRDOBA, S. Antifúngicos e testes de sensibilidade. **II Curso Brasileiro – Hispano – Argentino de Micologia Médica**. 2002, 218p.

UTZ, J.P. The spectrum of opportunistic fungus infections. **Lab Invest**, 11: 1018-1025, 1962.

VALDIVIESO, M.; LUNA, M.; BODEY, G.P.; RODRIGUEZ, V.; GROSCHELL, D.; Fungimia dua to *Torulopsis glabrata* in the compromised host. **Cancer**, 38:1750-1756, 1976.

WEISSMAN, Z.; BERDICEVSKY, I.; CAVARI, B. Molecular identification of *Candida albicans*. **J Med Vet Mycol**, 33: 205-207, 1995.

WHITE, T.C.; MARR, K.A.; BOWDEN, R.A. Clinical, cellular, and molecular factor that contribute to antifungal drug resistance. **Clin Microbiol Rev**, 282-402, 1998.

WINGARD, J.R. Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. **Clin Infect Dis**, 20: 115-125, 1995.

YAMADA, S.; CAO, J.; SUMITA, O.; KURASAWA, K.; KURATA, H.; OH, K.; MATSUOKA, H.; Automatic antifungal activity analyzing system on basis of dynamic growth process of a single hypha. **Mycopathologia**, 118: 65-69, 1992.