

QUANTIFICAÇÃO DE ERGOSTEROL COMO MÉTODO DE CONFIRMAÇÃO DE PADRÃO DE SUSCEPTIBILIDADE DE AMOSTRAS DE *Candida tropicalis* A FLUCONAZOL.

Azevedo, Viviane Reis*; Silva, Thelma Alves**; Colombo, Arnaldo Lopes***

*Bolsista PIBIC, ** Colaboradora, ***Orientador, Professor Titular da Disciplina de Infecçologia Laboratório Especial de Micologia - LEMI

Introdução

- A literatura registra grande variação nos índices de resistência a fluconazol observadas em amostras de *C. tropicalis*, com índices de 0 a 35%;
 - Esta grande variação faz supor que o fenômeno *in vitro* conhecido como "trailing", que é caracterizado pela inibição parcial de inóculo na presença de drogas fungistáticas, esteja sendo interpretado erroneamente como resistência;
 - Devido a essa discrepância de resultados, Arthington-Skaggs *et al* (1999), sugeriram a técnica de **quantificação de ergosterol** para determinar valores de CIMs em cepas que apresentam "trailing".
- Os **objetivos** desse estudo foram:

- Descrever o perfil de susceptibilidade de cepas de *Candida tropicalis* isoladas de episódios de fungemia frente a fluconazol;
- Avaliar a prevalência de cepas de *Candida tropicalis* com o fenótipo "low-high MICs" observados em leitura após 24 e 48 horas de incubação;
- Utilizar o método de quantificação de ergosterol como ferramenta para discriminar cepas verdadeiramente resistentes a fluconazol entre aquelas com "trailing".

Resultados

TABELA 1. Valores CIMs apresentados pelas 224 cepas de *Candida tropicalis* frente a fluconazol, pelo método de microdiluição em caldo com leituras visuais e espectrofotométricas de 24 e 48hrs

| Valores de Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) | Leitura de 24 horas | | Leitura de 48 horas | |
|---|---------------------|-----------------|---------------------|-----------------|
| | Visual | Leitor de ELISA | Visual | Leitor de ELISA |
| Varição (µg/mL) | 0,125 – 16,0 | 0,125 – 16,0 | 0,125 – ≥64,0 | 0,125 – ≥64,0 |
| CIM 50 ^µ (µg/mL) | 1,0 | 0,5 | 2,0 | 2,0 |
| CIM 90 ^µ (µg/mL) | 8,0 | 4,0 | 8,0 | 8,0 |
| CIM <=8,0µg/mL N (%) | 220 (98,21) | 217 (96,87) | 209 (93,3) | 205 (91,52) |
| CIM 16,0 – 32,0µg/mL N (%) | 04 (1,79) | 07 (3,13) | 09 (4,02) | 13 (5,80) |
| CIM ≥64,0µg/mL N (%) | 00 (0) | 00 (0) | 06 (2,68) | 06 (2,68) |

TABELA 2. Análise comparativa dos valores de CIM de fluconazol, apresentados pelas 224 isolados de *Candida tropicalis* obtidos entre as leituras visuais e espectrofotométricas com incubação de 24 e 48 horas.

| Diferença entre os resultados das leituras visuais e espectrofotométricas expressada em número de diluições* | Result. Espect. menor | | Result. Espect. maior | | I.C. (%) ^b | | | |
|--|-----------------------|-----------|-----------------------|-------------|-----------------------|-----------|------------|-------|
| | -3 | -2 | -1 | 0 | | +1 | +2 | +3 |
| 24 hrs (%) | 06 (2,68) | 10 (4,46) | 66 (29,46) | 126 (56,25) | 02 (0,45) | 02 (0,89) | 13 (5,80) | 96,90 |
| 48 hrs (%) | 02 (0,89) | 08 (3,57) | 53 (23,66) | 130 (58,04) | 02 (0,89) | 04 (1,79) | 25 (11,16) | 98,20 |

*Quantidade expressa em número de concentrações inibitórias mínimas que separam resultados obtidos pela leitura visual comparado aos resultados obtidos pela leitura espectrofotométrica.
^b Índice de concordância entre métodos representando a porcentagem de valores de CIM obtidos pela leitura visual com igual valor ou até 2 diluições diferentes dos valores de CIM obtidos pela leitura espectrofotométrica.

TABELA 4. Detalhamento dos resultados de susceptibilidade das 20 cepas de *C. tropicalis* com valores de CIM ≥16,0µg/mL nas leituras visuais ou espectrofotométrica

| Nº banco | 24 horas de incubação | | 48 horas de incubação | |
|----------|-----------------------|---------------------------|-----------------------|---------------------------|
| | Visual (µg/mL) | Espectrofotômetro (µg/mL) | Visual (µg/mL) | Espectrofotômetro (µg/mL) |
| 1087 | 0,25 | 0,25 | 2,0 | 64,0 |
| 1405 | 8,0 | 2,0 | 64,0 | 64,0 |
| 525 | 4,0 | 4,0 | 64,0 | 64,0 |
| 1033 | 4,0 | 2,0 | ≥64,0 | 64,0 |
| 870 | 8,0 | 8,0 | 8,0 | 16,0 |
| 872 | 8,0 | 16,0 | 32,0 | 32,0 |
| 670 | 0,5 | 2,0 | ≥64,0 | 64,0 |
| 483 | 8,0 | 8,0 | 8,0 | 16,0 |
| 368 | 8,0 | 8,0 | 16,0 | 16,0 |
| 349 | 4,0 | 8,0 | 16,0 | 8,0 |
| 452A | 4,0 | 8,0 | 4,0 | 16,0 |
| 253 | 16,0 | 16,0 | 16,0 | 16,0 |
| 89 | 8,0 | 2,0 | 16,0 | 16,0 |
| 118 | 8,0 | 16,0 | 16,0 | 16,0 |
| 122 | 8,0 | 8,0 | 8,0 | 16,0 |
| 73 | 8,0 | 8,0 | 16,0 | 16,0 |
| 111 | 8,0 | 8,0 | 8,0 | 16,0 |
| 2483A | 16,0 | 16,0 | 32,0 | 32,0 |
| 2483B | 16,0 | 16,0 | ≥64,0 | ≥64,0 |
| 2041A | 16,0 | 16,0 | ≥64,0 | 32,0 |

TABELA 3. Detalhamento dos resultados obtidos avaliando as diferentes intensidades de "trailing" apresentado pelas 224 cepas de *Candida tropicalis* testadas.

| Intensidade de "trailing" | Leitura de 24 horas | Leitura de 48 horas |
|---------------------------|---------------------|---------------------|
| Opticamente limpo | 137 (61,16%) | 106 (47,32%) |
| t* | 78 (34,82%) | 86 (38,40%) |
| tt/itt** | 9 (4,10%) | 32 (14,28%) |
| TOTAL | 224 (100%) | 224 (100%) |

*"trailing" leve: crescimento contínuo, porém reduzido nas diferentes concentrações de droga.
 **"trailing" moderado/alto: crescimento contínuo, porém abundante nas diferentes concentrações de droga.

TABELA 5. Detalhamento da susceptibilidade *in vitro* dos 20 isolados de *C. tropicalis* frente ao fluconazol avaliados pelas duas metodologias.

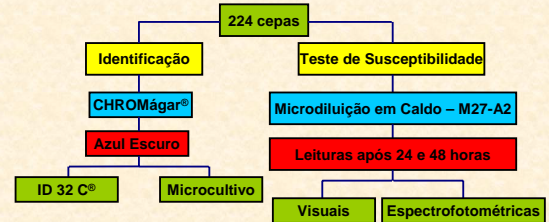
| Nº do Isolado | Microdiluição em Caldo (CSLI, 2002) | | Percentual de ergosterol inibido na presença de diferentes concentrações de fluconazol* | | | | SQM (µg/mL) |
|---------------|-------------------------------------|-------------|---|--------|---------|---------|-------------|
| | 24h (µg/mL) | 48h (µg/mL) | 0µg/mL | 4µg/mL | 16µg/mL | 64µg/mL | |
| 1087 | 0,25 | 2,0 | 0 | 99,76 | 100 | 100 | < 4,0 |
| 1405 | 8,0 | 64,0 | 0 | 100 | 100 | 100 | < 4 |
| 525 | 4,0 | 64,0 | 0 | 99,85 | 100 | 100 | < 4 |
| 1033 | 4,0 | ≥64,0 | 0 | 100 | 100 | 100 | < 4 |
| 870 | 8,0 | 8,0 | 0 | 100 | 100 | 100 | < 4 |
| 872 | 8,0 | 32,0 | 0 | 93,36 | 100 | 100 | < 4 |
| 670 | 0,5 | ≥64,0 | 0 | 86,54 | 100 | 100 | < 4 |
| 483 | 8,0 | 8,0 | 0 | 58,87 | 98,58 | 98,71 | < 4 |
| 368 | 8,0 | 16,0 | 0 | 99,72 | 100 | 100 | < 4 |
| 349 | 4,0 | 8,0 | 0 | 100 | 100 | 100 | < 4 |
| 452A | 4,0 | 4,0 | 0 | 98,11 | 100 | 100 | < 4 |
| 253 | 16,0 | 16,0 | 0 | 61,97 | 100 | 100 | < 4 |
| 89 | 8,0 | 16,0 | 0 | 100 | 100 | 100 | < 4 |
| 118 | 8,0 | 16,0 | 0 | 90,62 | 100 | 100 | < 4 |
| 122 | 8,0 | 8,0 | 0 | 100 | 100 | 100 | < 4 |
| 73 | 8,0 | 16,0 | 0 | 100 | 100 | 100 | < 4 |
| 111 | 8,0 | 8,0 | 0 | 100 | 100 | 100 | < 4 |
| 2483A | 16,0 | 32,0 | 0 | 6,48 | 42,06 | 99,01 | > 64 |
| 2483B | 16,0 | ≥64,0 | 0 | 1,27 | 37,61 | 87,30 | > 64 |
| 2041A | 16,0 | ≥64,0 | 0 | 25,46 | 27,27 | 87,53 | > 64 |

Referências Bibliográficas

- Arthington-Skaggs BA, Jardi H, Desai T, Morrison CJ. Quantitation of ergosterol content: novel method for determination of fluconazole susceptibility of *Candida albicans*. J Clin Microbiol. 1999; 37(10): 3332-7.
- Arthington-Skaggs BA, Warnock DW, Morrison CJ. 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. 2000; 44(8): 2081-5.
- Arthington-Skaggs BA, Lee-Yang W, Ciblak MA, Frade JP, Brandt ME, Hajjeh RA, Harrison LH, Sofair AN, Warnock DW; Candidemia Active Surveillance Group. Comparison of visual and spectrophotometric methods of broth microdilution MIC end point determination and evaluation of sterol quantitation method for *in vitro* susceptibility testing of fluconazole and itraconazole against trailing and nontrailing *Candida* isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2002; 46(8): 2477-81.
- National Committee For Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A2, 2a ed., 2002. Vilanova, Pa.

Material e Métodos

Identificação Fenotípica e Teste de Susceptibilidade ao Fluconazol



Ensaio de Quantificação de Ergosterol

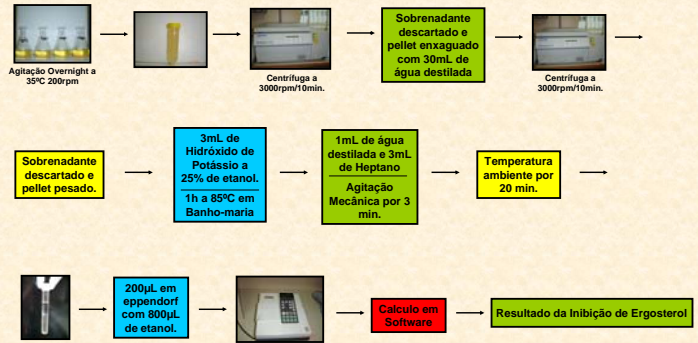


FIGURA 1. Ilustração do perfil de uma cepa considerada resistente pelo método SQM, onde a inibição de 50% de ergosterol das células fúngicas ocorre em uma concentração de aproximadamente 64,0µg/mL de fluconazol.

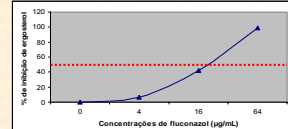
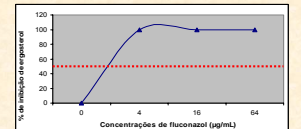


FIGURA 2. Ilustração do perfil de uma cepa considerada susceptível apresenta inibição de 50% de ergosterol em uma concentração abaixo de 16,0µg/mL de fluconazol.



Conclusões

- O fenômeno de "trailing" moderado / intenso é muito frequente com cepas de *Candida tropicalis*, dificultando a interpretação dos resultados;
- As leituras visuais e espectrofotométricas de ensaios com fluconazol apresentam grande semelhança de resultados;
- A grande maioria (85%) das 20 amostras inicialmente identificadas como tendo baixa susceptibilidade nos ensaios de microdiluição em caldo apresentaram redução de ergosterol em suas membranas quando expostas a fluconazol, mostrando tratar-se de "trailing";

4. Estes dados sugerem que a ocorrência de cepas de *Candida tropicalis* verdadeiramente resistentes a fluconazol seja bem menos frequente que o sugerido na literatura.