

Desenvolvimento de Protocolo para Vigilância e Detecção de Resistência Antifúngica

Maria Luiza Mattiuzzo de Carvalho

Luana Rossato

Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados – HU-UFGD

Dourados, agosto de 2024

Introdução

A resistência antifúngica, destacada na medicina moderna por seu impacto na gestão de infecções, é impulsionada pelo uso indiscriminado de antifúngicos e pela capacidade dos fungos de desenvolver resistência, dificultando o tratamento e controle em ambientes hospitalares (Araujo, 2021).

Candida spp. são exemplos dessa ameaça, com resistência a múltiplas classes de antifúngicos, agravada pela escassez de novos medicamentos, o que reforça a necessidade de monitoramento contínuo e estratégias eficazes (Lockhart, 2020).

A ausência de protocolos adequados para detecção e monitoramento da resistência antifúngica em hospitais pode levar a desfechos clínicos negativos (Hendrickson, 2019).

O estudo desenvolvido buscou preencher essa lacuna ao criar um protocolo que aprimora a identificação de cepas resistentes e permite a reavaliação das terapias. Utilizando metodologias como o método *Eucast*, o objetivo foi aumentar a precisão das prescrições e elevar a qualidade do cuidado oferecido aos pacientes.

Metodologia

Foi desenvolvido um protocolo utilizando o meio de cultura CHROMagar™ *Candida* e CHROMagar™ *Candida* suplementado com Fluconazol 8 µg/ml, conforme Ruiz-Gaitán (2023), visando um teste rápido e eficiente para detecção de resistência antifúngica, especialmente em *Candida auris*. Os experimentos iniciais foram conduzidos com cepas clínicas padrão de *C. auris*, repicadas em placas de Petri contendo ambos os meios. As placas foram incubadas a 35°C e analisadas após 48 e 72 horas.

Posteriormente, outras espécies de *Candida* (como *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae*, *C. glabrata*, e *C. krusei*) foram inoculadas seguindo o mesmo protocolo. A fase seguinte envolveu a aplicação do método Eucast, utilizando o meio RPMI com 2% de glicose, para otimizar os testes de sensibilidade antifúngica (como mostra a tabela 1).

Placas de 96 poços foram preparadas com o meio e o fármaco, seguindo os cálculos do *Eucast*. Cepas de hemocultura foram reativadas em meio BHI, incubadas em shaker por 48 horas e depois transferidas para placas de Petri com meio YPD. Após o crescimento, as cepas foram inoculadas de acordo com o protocolo *Eucast*, com leitura espectrofotométrica em salina. Finalmente, as placas foram incubadas a 37°C e analisadas após 24 e 48 horas.

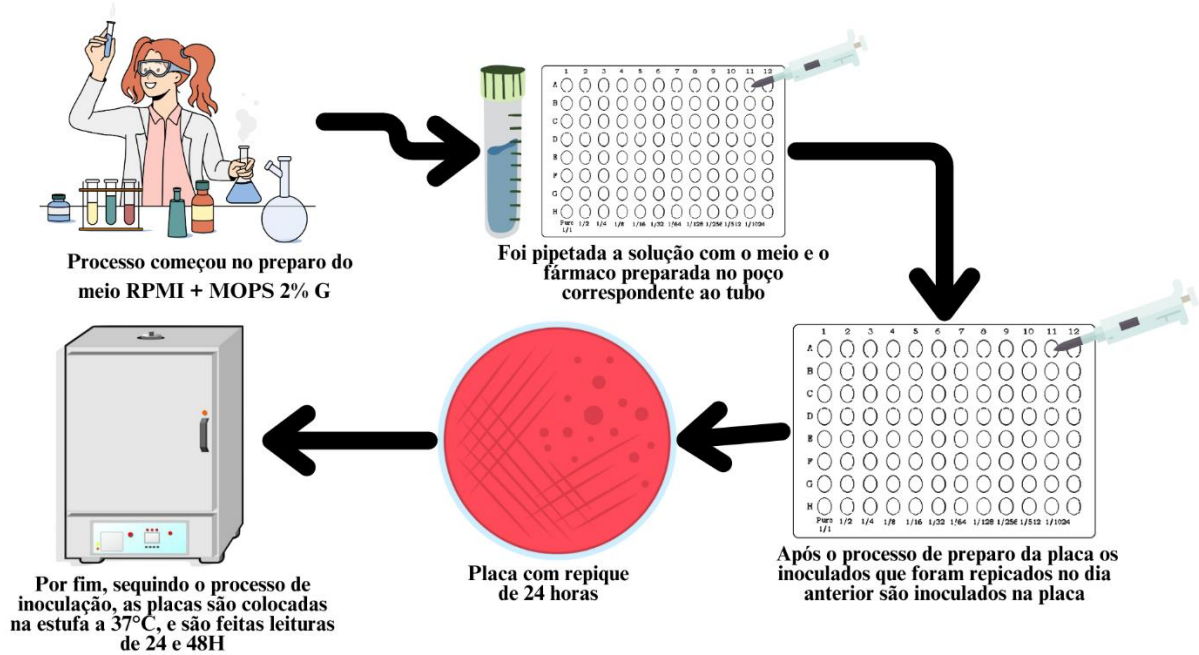


Figura 1: Metodologia utilizada na segunda parte dos experimentos.

Fonte: Autoral (2024).

Resultados

Nas etapas iniciais da pesquisa, foi utilizado o meio de cultura CHROMagar™ *Candida* suplementado com Fluconazol para avaliar a susceptibilidade dos patógenos ao antifúngico triazólico. Inicialmente, foram utilizadas espécies de *Candida auris* e posteriormente outras espécies de *Candida*. Até o atual momento, foram testados no total cinquenta e seis isolados, sendo eles: 44 *Candida auris*; 4 *Candida albicans*; 2 *Candida tropicalis*; 2 *Candida parapsilosis*; 2 *Candida lusitanae*; 1 *Candida krusei* e 1 *Candida glabrata*.

Após análise, os resultados encontrados demonstram a elevada prevalência de crescimento na placa que continha Fluconazol nas espécies de *Candida*. Com isso, os resultados encontrados até o momento apontam que outro teste também deverá ser feito seguindo uma outra metodologia, mostrando algumas inconsistências no resultado obtido com os dados já fornecidos.

Já os resultados obtidos na segunda etapa do desenvolvimento do protocolo foram mais promissores (que podem ser analisados na tabela 1, 2 e 3), pois em relação aos testes que já foram feitos seguindo esse método, os resultados foram semelhantes, mostrando assim que o método Eucast é o melhor e mais adequado para o teste de resistência antifúngica. Os pontos de corte foram definidos com base no Eucast, classificando os fungos em

sensíveis (S), sensíveis com exposição aumentada (SIE), e resistentes (R). Para as espécies sem ponto de corte estabelecido pelo Eucast, foi utilizada a Concentração Inibitória Mínima (CIM), que representa a menor concentração de antifúngico capaz de inibir o crescimento do fungo, sendo CIM 90 a concentração que inibe 90% dos isolados e CIM 50 a que inibe 50% dos isolados.

Tabela 1: Teste de susceptibilidade antimicrobiana para Anfotericina B

Espécies	Total de isolados	CIM		
		Faixa de concentração de CIM	CIM 90	CIM 50
<i>C. parapsilosis</i>	9	0,031-16	-	-
<i>C. albicans</i>	5	0,125	-	-
<i>C. tropicalis</i>	5	0,125	-	-
<i>Cryptococcus neoformans</i>	1	0,125	-	-
<i>Cryptococcus</i> spp.	3	0,031-0,5	-	-
<i>C. lusitaniae</i>	2	0,25-0,5	0,5	0,25
<i>C. auris</i>	8	0,031-0,0625	-	-

Os pontos de corte foram definidos com base no *Eucast*, classificando os fungos em sensíveis (S), sensíveis com exposição aumentada (SIE), e resistentes (R). Para *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, e *C. neoformans*, o ponto de corte é $S \leq 1$ mg/L e $R > 1$ mg/L.

Tabela 2: Teste de susceptibilidade antimicrobiana para Fluconazol

Espécies	Total de isolados	CIM		
		Faixa de concentração de CIM	CIM 90	CIM 50
<i>C. parapsilosis</i>	9	0,125-64	-	-
<i>C. albicans</i>	5	0,125-1	-	-
<i>C. tropicalis</i>	5	0,125-64	-	-
<i>Cryptococcus neoformans</i>	1	64	-	-
<i>Cryptococcus</i> spp.	3	0,125	0,125	-
<i>C. lusitaniae</i>	2	0,125-1	-	-
<i>C. auris</i>	8	0,25-16	-	-

Os pontos de corte foram definidos com base no *Eucast*, classificando os fungos em sensíveis (S), sensíveis com exposição aumentada (SIE), e resistentes (R). Para *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, e *C. neoformans* o ponto de corte é $S \leq 2$ mg/L e $R > 4$ mg/L. CIM: Concentração Inibitória Mínima. CIM: Concentração Inibitória Mínima.

Tabela 3: Teste de susceptibilidade antimicrobiana para Micafungina

Espécies	Total de isolados	CIM		
		Faixa de concentração de CIM	CIM 90	CIM 50
<i>C. parapsilosis</i>	9	0,031-1	-	-
<i>C. albicans</i>	5	0,016-0,5	-	-
<i>C. tropicalis</i>	5	0,016	-	-
<i>Cryptococcus neoformans</i>	1	0,016	0,016	-
<i>Cryptococcus spp.</i>	3	0,016	0,016	-
<i>C. lusitaniae</i>	2	0,031-0,5	-	-
<i>C. auris</i>	8	0,25-8	-	-

Os pontos de corte foram definidos com base no Eucast, que classifica os fungos como sensíveis (S), sensíveis com exposição aumentada (SIE), e resistentes (R). Para *C. albicans*, o ponto de corte é $S \leq 0,016$ mg/L e $R > 0,016$ mg/L; para *C. parapsilosis*, $S \leq 2$ mg/L e $R > 2$ mg/L; e para *C. tropicalis*, $SIE \leq 5$ mg/L e $R > 5$ mg/L. *C. neoformans* não possui ponto de corte estabelecido. CIM: Concentração Inibitória Mínima.

Discussão

O estudo, voltado para a criação de um protocolo de vigilância e detecção de resistência antifúngica, destaca-se pela aplicação de metodologias como CHROMagar™ *Candida* e o método *Eucast*, visando melhorar a identificação de cepas resistentes e assegurar tratamentos mais eficazes, especialmente em ambientes hospitalares onde a resistência é uma crescente ameaça.

O uso de CHROMagar™ *Candida* suplementado com Fluconazol diferencia-se de outras abordagens mais padronizadas, enquanto o método *Eucast*, alinhado com práticas internacionais (Espinell-Ingroff, 2022), valida a eficácia na classificação da sensibilidade antifúngica.

As infecções hospitalares por *Candida spp.*, conforme Karth (2020), representam um grande desafio, especialmente em unidades de terapia intensiva, reforçando a necessidade de métodos precisos como os empregados no estudo (Barbosa, 2024).

Apesar das limitações em termos de escala e dependência de cepas locais, a especificidade do protocolo para o ambiente hospitalar local é uma vantagem, atendendo diretamente às necessidades práticas do hospital, ao contrário de estudos multinacionais que oferecem soluções mais gerais.

Conclusão

Portanto, é possível afirmar que o método *Eucast/Brcast* utilizado para o teste das cepas mostrou-se muito eficaz. Tendo em vista que o hospital não possui um teste pré-estabelecido. O protocolo foi elaborado com base nos resultados obtidos pelo *Eucast/Brcast*, sendo uma maneira mais eficiente para o teste de sensibilidade aos antifúngicos.

Referências

- ARAUJO, G. R.; et al. Challenges of Antifungal Resistance in *Candida* spp.: A Systematic Review. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 2, p. 139, 2021.
- ARENDUP, M. C.; PAPPAS, P. G. Method of antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. and *Aspergillus* spp. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 39, n. 9, p. 1625-1635, 2020
- BARBOSA, Amanda Dias et al. Antifungal activity of propafenone on *Candida* spp. strains: interaction with antifungals and possible mechanism of action. **Journal of Medical Microbiology**, v. 73, n. 7, p. 001850, 2024.
- HENDRICKSON, Joshua A. et al. Antifungal resistance: a concerning trend for the present and future. **Current Infectious Disease Reports**, v. 21, p. 1-8, 2019.
- ESPINEL-INGROFF, A.; CANTÓN, R. Performance of CHROMagar™ *Candida* with and without Fluconazole Supplementation for Identification and Susceptibility Testing of *Candida* species: a comparative study with EUCAST and CLSI methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 60, n. 7, e00745-22, 2022.
- KARTHI, Sengodan et al. Target activity of *Isaria tenuipes* (Hypocreales: Clavicipitaceae) fungal strains against dengue vector *Aedes aegypti* (Linn.) and its non-target activity against aquatic predators. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 4, p. 196, 2020.
- LOCKHART, S. R. et al. *Candida auris*: A New Fungal Pathogen. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 2, p. 123-138, 2020.
- RUIZ-GAITÁN, Alba et al. Usefulness of Chromogenic Media with Fluconazole Supplementation for Presumptive Identification of *Candida auris*. **Diagnostics**, v. 13, n. 2, p. 231, 2023.