

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**REGIANE NOGUEIRA SPALANZANI**

**PRINCIPAIS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO LABORATORIAL E DE AVALIAÇÃO  
DA SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA DE *Candida* sp.**

**CURITIBA**

**2018**

**REGIANE NOGUEIRA SPALANZANI**

**PRINCIPAIS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO LABORATORIAL E DE AVALIAÇÃO  
DA SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA DE *Candida* sp.**

Artigo apresentado como requisito parcial para a conclusão do Curso de Pós-graduação em Análises Clínicas, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná.

Professor Orientador: Profa. Dra. Izabella C. R. Santos-Weiss

**CURITIBA**

**2018**

<b>Sumário</b>	
RESUMO	2
1 INTRODUÇÃO	4
2 METODOLOGIA	7
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	8
3.1 MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO	8
3.1.1 Métodos Convencionais	8
3.1.2 Ágar Cromogênico	9
3.1.3 Métodos Semi-Automatizados	10
3.1.4 MALDI-TOF-MS ( <i>Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry</i> )	11
3.1.5 Métodos Automatizados	12
3.2 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA	12
3.2.1 Microdiluição em caldo	13
3.2.2 E-test	13
3.2.3 Sensititre YeastOne	14
3.2.4 Método Automatizado	15
3.3 FLUXOGRAMA	16
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	19
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20

## Principais métodos de diagnóstico laboratorial e de avaliação da susceptibilidade antifúngica de *Candida* sp.

Regiane Nogueira Spalanzani

### RESUMO

Em indivíduos saudáveis, leveduras do gênero *Candida* fazem parte de microbiota gastrointestinal e genitourinária. Entretanto, em condições favoráveis, podem resultar em infecções fúngicas. Devido às diversas manifestações clínicas e dificuldades no diagnóstico e tratamento, as infecções fúngicas representam uma das infecções mais importantes entre pacientes hospitalizados e imunocomprometidos. Apesar de *Candida albicans* ser a principal espécie associada às infecções fúngicas, houve um aumento na incidência de espécies *Candida* não-*albicans*, como *C. glabrata* e *C. krusei*, relatadas como menos sensíveis aos antifúngicos. Visto que o tratamento antifúngico varia de acordo com a espécie identificada, a rápida identificação e a avaliação do perfil de susceptibilidade antifúngica podem auxiliar no manejo clínico do paciente com infecção, além de contribuir para monitoramento de espécies resistentes. O objetivo deste trabalho é descrever os principais métodos de identificação fenotípica e de avaliação da susceptibilidade antifúngica e, apresentar um fluxograma de orientação visando o rápido diagnóstico em casos de suspeita de infecções invasivas por *Candida* sp.. Entre os métodos de identificação fenotípica, destacam-se os métodos convencionais, ágar cromogênicos e os métodos automatizados, como o MALDI-TOF-MS. Apesar das vantagens da realização do teste de susceptibilidade antifúngica, o teste não é realizado com frequência na rotina laboratorial. A partir da padronização da avaliação da susceptibilidade antifúngica publicada pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), diversos métodos foram desenvolvidos para reduzir custos, facilitar e adequar para rotina laboratorial, tais como o E-test, Sensititre YeastOne e Vitek 2.

Palavras-chave: Infecções fúngicas, *Candida* sp., Susceptibilidade antifúngica.

## ABSTRACT

In healthy individuals, yeasts of the genus *Candida* are part of the gastrointestinal and genitourinary microbiota. However, under favorable conditions, it can result in fungal infections. Due to the diverse clinical manifestations and to the difficulties in diagnosis and treatment, fungal infections represent one of the most important infections among hospitalized and immunocompromised patients. Although *Candida albicans* is the main species associated with fungal infections, there was an increase in the incidence of non-*Candida albicans* species, such as *C. glabrata* and *C. krusei*, reported as less sensitive to antifungal agents. Since the antifungal treatment varies according to the identified species, the rapid identification and the antifungal susceptibility profile evaluation can help in the clinical management of the infected patient, besides contributing to the monitoring of resistant species. The objective of this work is to describe the main methods of phenotypic identification and evaluation of antifungal susceptibility and to present an orientation flowchart aimed at the rapid diagnosis in cases of suspected *Candida* sp. invasive infections. Among the main phenotypic identification methods, stand out the conventional methods, chromogenic agar and automated methods, as MALDI-TOF-MS. Despite the advantages of performing the antifungal susceptibility test, it's not often performed in a laboratory routine. After the antifungal susceptibility standardization published by CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), several methods have been developed to reduce costs, facilitate and adapt to laboratory routine, such as the E-test, Sensititre YeastOne and Vitek 2.

*Key-words:* Fungal Infections, *Candida* sp., Antifungal Susceptibility.

## 1 INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas são comumente ocasionadas por fungos oportunistas em função de um aumento na colonização aliado à baixa imunidade local ou geral do indivíduo, que podem levar a infecções graves com alto risco de mortalidade (PAPPAS *et al.*, 2018). Apresentam diversas manifestações clínicas que dificultam o diagnóstico clínico e laboratorial e, conseqüentemente, o tratamento do paciente (GIACOMAZZI *et al.*, 2016).

De acordo com Giacomazzi e colaboradores (2016), no Brasil, as infecções fúngicas podem afetar em torno de 3,8 milhões de indivíduos, incluindo infecções recorrentes e infecções invasivas.

Entre os pacientes hospitalizados, as infecções fúngicas invasivas representam uma das infecções mais importantes, principalmente em pacientes internados em unidades de tratamento intensivo, devido à alta susceptibilidade e complexidade de outras doenças presentes (SINGH *et al.*, 2016).

Os principais fatores de risco associados às infecções fúngicas invasivas são: o uso de antibióticos de amplo espectro e de imunossupressores, cateteres e instrumentos intravasculares, traqueostomia, cateteres urinários, assim como a infecção por HIV (*human immunodeficiency vírus*) e *diabetes mellitus* (DOI *et al.*, 2016; SINGH *et al.*, 2016; ALFOUZAN *et al.*, 2017.).

As infecções fúngicas invasivas são caracterizadas pela obtenção do fungo a partir de cultura de sangue ou outra amostra estéril acompanhada de sinais de infecção (PAPPAS *et al.*, 2018). A maioria destas infecções são ocasionadas por espécies do gênero *Candida* (SINGH *et al.*, 2016; SIQUEIRA *et al.*, 2018).

Leveduras do gênero *Candida* fazem parte da microbiota gastrointestinal e geniturinária de indivíduos saudáveis (ALFOUZAN *et al.*, 2017). Entretanto, as espécies de *Candida* são patógenos oportunistas que em condições favoráveis podem causar infecções fúngicas, principalmente em pacientes imunocomprometidos ou hospitalizados, assim como em pacientes com doenças degenerativas ou neoplásicas (PUIG *et al.*, 2017; SIQUEIRA *et al.*, 2018). No Brasil, estima-se que em torno de 74% das infecções fúngicas são ocasionadas por *Candida* sp. (GIACOMAZZI *et al.*, 2016).

Apesar de *Candida albicans* ser a espécie frequentemente associada a infecções fúngicas, tem sido relatado um aumento na incidência de espécies

*Candida não-albicans* (CNA), tais como *C. glabrata* e *C. krusei*, intrinsecamente menos sensíveis aos azóis (QUINDÓS *et al.*, 2014; SINGH *et al.*, 2016; GONZÁLEZ-LARA *et al.*, 2017; SIQUEIRA *et al.*, 2018).

Em estudo multicêntrico retrospectivo realizado por Doi e colaboradores (2016) em 5 regiões diferentes no Brasil, de 2007 a 2010, as espécies CNA representaram 65,7% do total de espécies de *Candida* isoladas em casos de infecção invasiva.

O aparecimento de espécies CNA com menor susceptibilidade a diversos antifúngicos destaca a importância da rápida identificação da espécie de *Candida* e do estudo do perfil de susceptibilidade em pacientes hospitalizados e imunocomprometidos devido à alta mortalidade associada (PUIG *et al.*, 2017).

A identificação laboratorial de *Candida* sp. pode ser realizada por métodos não-moleculares utilizando métodos convencionais, sorológicos e espectrometria de massa, assim como métodos moleculares tais como RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) e RAPD (*randomly amplified polymorphic DNA*) (ALAM *et al.*, 2014).

Com a emergência de espécies resistentes aos antifúngicos disponíveis, a determinação do perfil de susceptibilidade torna-se cada vez mais importante e, com isso, a partir da padronização do teste de susceptibilidade antifúngica para leveduras pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), novos métodos automatizados e semi-automatizados foram desenvolvidos para simplificar e diminuir custos do procedimento (CUENCA-ESTRELLA *et al.*, 2010).

Métodos de identificação e avaliação da susceptibilidade *in vitro* auxiliam o manejo clínico de pacientes com infecção, como também contribuem para o monitoramento da epidemiologia de espécies resistentes (SIQUEIRA *et al.*, 2018).

Apesar da disponibilidade de diversos antifúngicos, o risco de mortalidade varia de 30 a 70%, sendo a maioria por motivo de diagnóstico tardio (GONZÁLEZ-LARA *et al.*, 2017). Assim, são necessários métodos apropriados e mais rápidos de identificação da espécie de *Candida* e a avaliação da susceptibilidade antifúngica para definir o tratamento antifúngico adequado.

O objetivo do presente trabalho é descrever os principais métodos de identificação e de avaliação da susceptibilidade antifúngica de espécies de *Candida* e ressaltar os métodos mais indicados para estes processos. Além disso, propor um

fluxograma de orientação para o correto e rápido diagnóstico em casos de suspeita de infecção por *Candida* sp.

## 2 METODOLOGIA

O levantamento bibliográfico foi realizado por meio de pesquisa de publicações sobre os principais métodos de identificação de *Candida* sp. e de avaliação da susceptibilidade antifúngica, mediante consulta às bases de dados Medline PubMed (*US. National Library of Medicine National Institutes of Health*), ScienceDirect (Elsevier), SpringerLink (Springer) e SciELO (*Scientific Electronic Library Online*).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO

Após a obtenção de colônias puras de leveduras, sem contaminação bacteriana ou com mais de uma espécie, deve-se realizar o repique em meio de cultura ASD (ágar Sabouraud-Dextrose) para sua identificação. O ASD é comumente utilizado nos laboratórios de micologia por ser relativamente barato e permitir o crescimento e isolamento das leveduras (ANVISA, 2013).

Os testes fenotípicos são comumente utilizados para identificação das diferentes espécies de *Candida* na rotina laboratorial, com base na morfologia, fisiologia e propriedades bioquímicas. Entretanto, os resultados obtidos são presuntivos, sendo necessário mais de um teste para que a identificação seja precisa (NEPPELENBROEK *et al.*, 2014).

Para espécies do gênero *Candida*, os métodos de identificação mais comuns são: pesquisa de tubo germinativo e microcultivo em ágar fubá + tween 80 (ANVISA, 2013), além disso, a ANVISA destaca o uso de ágares cromogênicos para isolamento e identificação presuntiva de *Candida* sp.

##### 3.1.1 Métodos Convencionais

Os testes convencionais de identificação são baseados nas características morfológicas e fisiológicas, e podem levar de 24 a 48h, ou até mais, para completa identificação (ALAM *et al.*, 2014). São incluídos neste grupo os testes: pesquisa de tubo germinativo, microcultivo em ágar fubá + tween 80 e auxanograma (prova de assimilação de açúcares) (LACAZ *et al.*, 2002; DEORUKHKAR *et al.*, 2018).

A pesquisa do tubo germinativo é baseada na detecção de projeções da levedura sem constrição no ponto de inserção da célula, denominada tubo germinativo, produzido por *Candida albicans* ao ser incubado com soro humano por 2h a 37° C (NEPPELENBROEK *et al.*, 2014; DEORUKHKAR *et al.*, 2018). Este teste é considerado simples, econômico, eficiente e permite a rápida diferenciação de *C. albicans* de espécies CNA. Entretanto, este teste nem sempre é preciso visto que em torno de 5% das cepas de *Candida albicans* podem não produzir tubo

germinativo, enquanto espécies como *C. tropicalis* e *C. dubliniensis* também podem produzir (ALAM *et al.*, 2014).

As características morfológicas de hifas e pseudo-hifas, assim como a formação de clamidósporos, podem ser observadas ao inocular a levedura em ágar fubá + tween 80. Por ser um meio de cultura límpido, o ágar fubá permite a visualização das características morfológicas diretamente no microscópio (LACAZ *et al.*, 2002), o que torna possível a diferenciação das espécies de *Candida*. Além disso, a adição de tween 80 (polissorbato) no meio de cultura facilita a formação de clamidósporos, hifas e pseudo-hifas (DEORUKHKAR *et al.*, 2018). Apesar de ser um método relativamente de baixo custo, está em desuso para identificação de espécies de *Candida*, sendo mais utilizado para identificação de fungos filamentosos.

Devido a capacidade de *Candida* sp. assimilar um carboidrato específico como única fonte de carbono, é possível realizar a identificação da espécie por meio da prova de assimilação de carboidratos (DEORUKHKAR *et al.*, 2018). Este teste utiliza um meio de cultura à base de nitrogênio que permite o crescimento de leveduras após a adição e difusão local de açúcar no meio. A assimilação de carboidrato é verificada se houver halo produzido ao redor do local onde o açúcar foi adicionado (NEPPELENBROEK *et al.*, 2014). Apesar da simplicidade, este método é demorado, sendo necessário até 72h de incubação para avaliação dos resultados.

Algumas espécies podem ser facilmente confundidas no momento da identificação. *Candida dubliniensis*, por exemplo, pode ser identificada erroneamente como *C. albicans* devido sua característica de produzir clamidósporos e capacidade de formar tubo germinativo (DEORUKHKAR *et al.*, 2018). O teste de temperatura poderia ser empregado para a sua diferenciação. É um teste fácil e de baixo custo para a identificação de *C. dubliniensis*, que apresenta pouco crescimento ou nenhum crescimento a 42°C, enquanto *C. albicans* apresenta bom crescimento nesta temperatura (ALAM *et al.*, 2014; NEPPELENBROEK *et al.*, 2014).

### 3.1.2 Ágar Cromogênico

Os ágares cromogênicos mais utilizados são: CHROMagar™ *Candida* e CandiSelect-4™. Ambos permitem a diferenciação entre as espécies de *Candida*, tais como *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei*, baseada na ação de enzimas em diversos substratos cromogênicos, que por sua vez produzem

colorações variadas (ZHAO *et al.*, 2016; WOHLMEISTER *et al.*, 2017; DEORUKHKAR *et al.*, 2018).

Este método é considerado simples, apresenta boa especificidade e permite avaliação dos resultados após 24 a 48h de incubação (NEPPELENBROEK *et al.*, 2014). Apesar dos resultados obtidos serem fenotípicos, a identificação é presuntiva, relativamente rápida, e pode favorecer o paciente visto que a terapia inicial pode ser direcionada para a espécie em potencial.

Além disso, o uso de ágar cromogênico é importante para detectar coinfeção por mais de uma espécie de *Candida* ou até mesmo evitar mais de uma espécie na mesma amostra durante a avaliação da susceptibilidade (ROSENVINGE *et al.*, 2012; ZHAO *et al.*, 2016).

### 3.1.3 Métodos Semi-Automatizados

Entre os sistemas semi-automatizados destacam-se os sistema API *Candida* e o sistema AUXACOLOR, ambos relatados como sistemas comerciais simples, de rápida e precisa identificação de espécies de *Candida* (CAMPBELL *et al.*, 1999).

O sistema API *Candida* consiste na utilização de uma tira de plástico descartável que contém 10 poços para a realização de 12 testes bioquímicos e colorimétricos: 5 testes de assimilação de açúcares e 7 testes enzimáticos. A inoculação baseia-se na reidratação dos substratos nos poços com a suspensão da amostra. Após 18 a 24h de incubação, os resultados são lidos e é obtido um perfil numérico com 4 dígitos que variam de acordo com as reações enzimáticas produzidas, e assim, um *software* disponibilizado pelo fabricante realiza a identificação (CAMPBELL *et al.*, 1999).

Quanto ao sistema AUXACOLOR, consiste basicamente de uma microplaca de plástico descartável com 16 poços, sendo um o controle negativo. Os poços restantes são utilizados para realização dos testes bioquímicos colorimétricos. São eles: 13 testes de assimilação de açúcares, um teste de resistência a cicloheximida e um teste para detecção da enzima fenol-oxidase. A inoculação é feita com a reidratação dos substratos com a suspensão da amostra e, em seguida, incubados por 24 a 48h. Os resultados obtidos são lidos de acordo o perfil de dígitos numéricos obtidos comparados com a lista de referência disponibilizada pelo fabricante (CAMPBELL *et al.*, 1999)

Podem ser utilizados na rotina de laboratórios microbiológicos devido a facilidade de realizar o procedimento, fácil leitura e o baixo custo por teste (CAMPBELL *et al.*, 1999)

#### 3.1.4 MALDI-TOF-MS (*Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry*)

Este método é baseado em feixes de *laser* que ionizam partículas previamente inseridas em uma matriz polimérica. As partículas, por sua vez, atravessam um analisador, atingem um detector e criam um espectro de massa, o qual é comparado com um espectro de referência. O tempo de chegada ao detector (*time of flight*) entre as moléculas ionizadas é diferente, isto é colocado em gráfico gerando diversos picos. Para cada espécie, o detector cria um padrão de picos, denominado espectro de massa. O espectro formado é, então, comparado à espectros de referência, resultando na identificação da espécie (PASTERNAK, 2012; ALAM *et al.*, 2014; PUIG *et al.*, 2017). Entre os sistemas comerciais MALDI-TOF-MS, os mais conhecidos e utilizados pelos laboratórios clínicos são: MALDI-Sepsityper, MALDI-Biotyper e Vitek-MS™. No Brasil, apenas o sistema MALDI-Sepsityper não está registrado na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2018) e, portanto, não é liberado para uso.

Em estudo realizado por Puig e colaboradores (2017) referente a identificação de *Candida* sp. por Vitek-MS, o sistema identificou corretamente 89.9% das amostras a nível de espécie e 10.1% apenas a nível de gênero.

De acordo com Tran e colaboradores (2015), apesar do alto custo de investimento para obtenção do equipamento, estima-se uma economia de até 51,5% anualmente, incluindo gastos com reagentes, manutenção do equipamento e pessoal técnico.

Devido à rápida identificação, alta sensibilidade e especificidade, os métodos MALDI-TOF-MS podem ser uma boa alternativa frente aos métodos convencionais (ROSENVINGE *et al.*, 2012). Entretanto, Puig e colaboradores (2017) destacam a necessidade de aprimorar estudos com espécies menos frequentemente encontradas, como *C. lusitanae*, assim como espécies do complexo *C. parapsilosis*. Além disso, erros na identificação de espécies fenotipicamente semelhantes, como

*C. albicans* e *C. dubliniensis*, têm sido relatados na literatura, sendo necessário utilizar outro método para diferenciação (HOF *et al.*, 2012).

Bal e McGill (2018) relacionaram a rápida identificação de espécies de *Candida* com a melhora do tratamento antifúngico, visto que, dependendo da espécie identificada, o perfil de susceptibilidade antifúngica é previsível. Assim, o tratamento adequado é administrado rapidamente, o que leva à redução da mortalidade.

### 3.1.5 Métodos Automatizados

Nos últimos anos, foram desenvolvidos diversos métodos automatizados para utilização em laboratórios microbiológicos, como o sistema Vitek YBC (*Yeast Biochemical Card*), Vitek 2 ID-YST e o sistema BD Phoenix *Yeast ID*, ambos desenvolvidos para acelerar a identificação de leveduras de interesse clínico (MARUCCO *et al.*, 2018). O sistema BD Phoenix *Yeast ID* utiliza painéis que realizam testes bioquímicos de fermentação, oxidação, degradação e hidrólise de vários substratos, incluindo substratos cromogênicos e fluorogênicos, além de substratos que contêm apenas uma fonte de carbono.

De acordo com Posteraro e colaboradores (2013), os resultados do sistema BD Phoenix são disponibilizados entre 4 a 12 horas, enquanto o sistema de identificação Vitek 2 ID-YST leva até 18h para liberação, o que permite economia de tempo de 6 até 14 horas quando o sistema BD Phoenix é utilizado em vez do sistema Vitek 2.

A identificação pelo sistema BD Phoenix é uma alternativa efetiva para laboratórios que não possuem a tecnologia MALDI-TOF-MS por permitir rapidez e confiabilidade na identificação de leveduras na rotina laboratorial (POSTERARO *et al.*, 2013; MARUCCO *et al.*, 2018).

## 3.2 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA

Devido ao aumento das infecções fúngicas e à emergência da resistência a essas drogas, os testes de susceptibilidade antifúngica tem se tornado cada vez mais importante (SIQUEIRA *et al.*, 2018). Apesar da existência de um método padronizado, métodos alternativos de avaliação da susceptibilidade foram

desenvolvidos com o objetivo de diminuir o tempo de procedimento e de liberação dos resultados.

### 3.2.1 Microdiluição em caldo

Entre os diversos métodos disponíveis, a microdiluição em caldo padronizada e publicada pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) em 2008, é o padrão-ouro para avaliação da susceptibilidade antifúngica de *Candida* sp. Este teste permite avaliar o crescimento de espécies de *Candida* em diferentes concentrações de antifúngicos preparadas por diluições seriadas. A menor concentração que inibe ou diminui em até 50% do crescimento fúngico comparado ao controle, sem antifúngico, é determinada de concentração inibitória mínima (CIM).

As etapas são realizadas manualmente, divididas principalmente entre preparação das diluições dos antifúngicos e soluções a serem utilizadas, realização do inóculo, leitura e interpretação da CIM (SIQUEIRA *et al.*, 2018). A leitura da CIM é subjetiva se realizada visualmente, porém, para contornar essa desvantagem, a inibição do crescimento fúngico pode ser avaliada em espectrofotômetro e quantificada em porcentagem em relação ao crescimento controle (PAPPAS *et al.*, 2018).

A microdiluição em caldo é um excelente teste para determinar o perfil de susceptibilidade de *Candida* sp. e, principalmente, para identificar espécies resistentes (PAPPAS *et al.*, 2018). Entretanto, por apresentar custo elevado e por demandar tempo, não é frequentemente utilizado nos laboratórios microbiológicos. Além disso, nem todos os antifúngicos estão disponíveis comercialmente.

A partir da padronização realizada pelo CLSI, métodos comerciais automatizados e semi-automatizados foram desenvolvidos com o objetivo de simplificar a avaliação da susceptibilidade antifúngica, além de diminuir custos e permitir a obtenção de resultados mais rápidos (CUENCA-ESTRELLA *et al.*, 2010). Entre os métodos desenvolvidos, destacam-se os métodos E-test, Vitek 2 e Sensititre YeastOne que serão abordados em sequência.

### 3.2.2 E-test

Apesar da padronização da microdiluição em caldo pelo CLSI, muitos laboratórios não realizam a avaliação da susceptibilidade antifúngica na rotina em função da metodologia ser trabalhosa e demorada. Com princípio similar ao método de difusão em disco, o E-test é um método alternativo que permite avaliar a susceptibilidade antifúngica de maneira prática e menos demorada que o padrão-ouro (ABBES *et al.*, 2012; KUMAR *et al.*, 2015).

O método é baseado no inóculo de uma suspensão da amostra em placa com meio de cultura, seguida da aplicação de uma tira impregnada com concentrações predefinidas e crescentes de um único antifúngico (POSTERARO e SANGUINETTI, 2014). Posteriormente, a placa é incubada a 35°C por 24-48h. O halo formado representa a zona de inibição de crescimento de *Candida* sp. e permite identificar a CIM quando este toca na fita (SONG *et al.*, 2015).

Entre os meios de cultura utilizados, o Agar Casitona é considerado o melhor meio para E-test por apresentar resultados semelhantes ao método de microdiluição em caldo, entretanto, o meio de cultura com melhor reprodutibilidade interlaboratorial e recomendado para esta metodologia é o meio RPMI 1640 (ABBES *et al.*, 2012).

Entre os antifúngicos disponíveis destaca-se posaconazol, anfotericina B, fluconazol, itraconazol, voriconazol e caspofungina (ABBES *et al.*, 2012; KUMAR *et al.*, 2015).

Por apresentar uma metodologia mais simples, rápida de executar e apresentar resultados coerentes com o método de microdiluição em caldo, o E-test pode ser uma alternativa ao padrão-ouro (KOGA-ITO *et al.*, 2008; POSTERARO & SANGUINETTI, 2014; KUMAR *et al.*, 2015; SONG *et al.*, 2015). Entretanto, a subjetividade é inevitável na leitura da CIM obtida e nem todos os antifúngicos estão disponíveis para esta metodologia (PAPPAS *et al.*, 2018).

### 3.2.3 Sensititre YeastOne

Baseado na microdiluição em caldo, o Sensititre YeastOne é um método colorimétrico comercial, que dispõe placas de 96 poços com diversos antifúngicos em diferentes concentrações juntamente com o indicador colorimétrico de crescimento, alamarBlue™ (Thermo Fisher), ambos liofilizados (ABBES *et al.*, 2012; POSTERARO & SANGUINETTI, 2014). As placas são disponibilizadas em

embalagens lacradas e podem ser utilizadas em até 24 meses se armazenadas em temperatura ambiente.

Entre os antifúngicos disponíveis, destaca-se: fluconazol, voriconazol, posaconazol, ravuconazol, anidulafungina, caspofungina e micafungina (PFALLER *et al.*, 2004; PFALLER *et al.*, 2008). Comercialmente, é possível adquirir placa com 8 antifúngicos: 5-flucitosina, anfotericina B, caspofungina, cetoconazol, fluconazol, itraconazol, voriconazol e posaconazol (ABBES *et al.*, 2012). Além desta opção, é disponibilizado também placa com anidulafungina e micafungina.

O procedimento baseia-se na reidratação do liofilizado com a suspensão da levedura a ser identificada. Em seguida, a placa é selada e incubada por 24h a 35°C. A leitura da CIM é feita visualmente ao verificar a alteração da cor azul para rosa, se houver crescimento fúngico nos poços das placas (SIQUEIRA *et al.*, 2018).

Por ser relativamente mais rápido de executar e de alta compatibilidade com o padrão-ouro (PFALLER *et al.*, 2004; PFALLER, *et al.*, 2008), o Sensititre YeastOne pode ser um método alternativo para avaliação da susceptibilidade antifúngica. Entre as desvantagens, destaca-se a subjetividade do analisador na interpretação da CIM e possíveis variações de temperatura no armazenamento, além de poucos antifúngicos disponíveis (PAPPAS *et al.*, 2018).

#### 3.2.4 Método Automatizado

Comumente utilizados nos laboratórios de microbiologia, o Vitek 2 é um sistema comercial automatizado que, por meio da espectrofotometria, detecta crescimento fúngico, realiza a identificação e a determinação da CIM simultaneamente (CUENCA-ESTRELLA *et al.*, 2010). Este método requer pouca manipulação da amostra. A leitura do resultado é automaticamente determinada e interpretada pelo *software* do sistema. Apesar da facilidade de realizar o procedimento, este método permite avaliação de somente três diluições no teste de susceptibilidade antifúngica (SIQUEIRA *et al.*, 2018).

Em estudo sobre comparação da susceptibilidade antifúngica de *Candida* sp., Alfouzan e colaboradores (2017) destacaram que o sistema Vitek 2 pode substituir o E-test, o que permite a avaliação *in vitro* da susceptibilidade antifúngica mais rapidamente.

Segundo González-Lara e colaboradores (2017), os resultados obtidos na avaliação da susceptibilidade antifúngica realizada no Vitek 2 são semelhantes ao método de microdiluição em caldo do CLSI. O mesmo foi destacado por Cuenca-Estrella e colaboradores (2010) ao encontrar alta correlação com o CLSI, estatisticamente significativa ( $p < 0.01$ ).

Além disso, o método direto Vitek 2 identifica com precisão a maioria das espécies de *Candida* e pode reduzir tempo (13h a 18h) de obtenção dos resultados preliminares (GONZÁLEZ-LARA *et al.*, 2017).

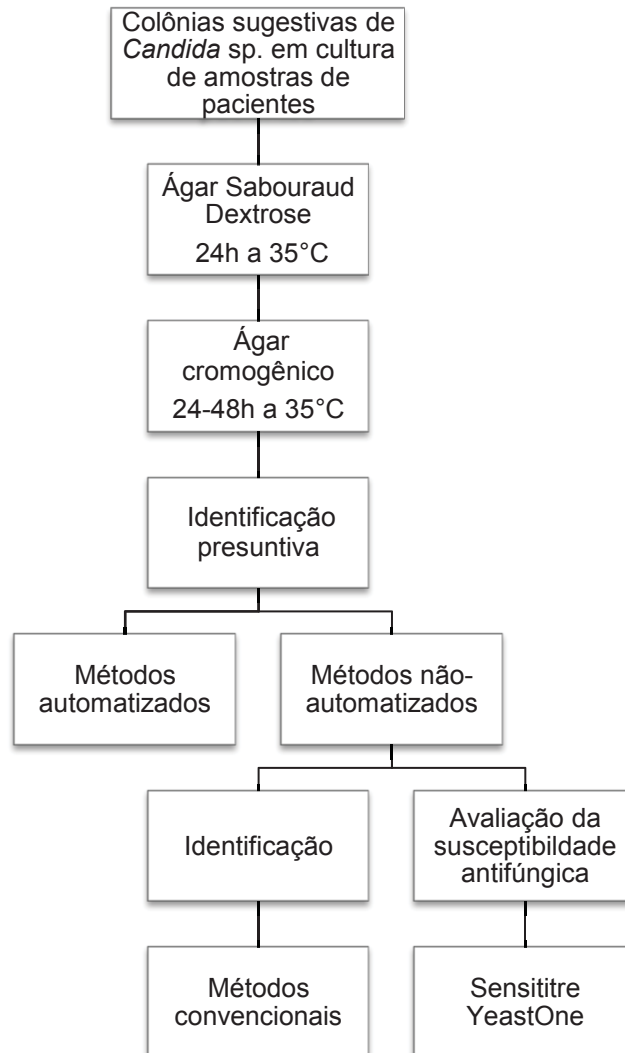
### 3.3 FLUXOGRAMA

Conforme revisão de literatura realizada e o que foi apresentado neste trabalho, propomos um fluxograma para auxiliar e direcionar o profissional do laboratório em casos de suspeita de infecção por *Candida* sp, visando o rápido diagnóstico em infecções invasivas. A partir de colônias isoladas em ágar Sabouraud Dextrose, recomenda-se realizar repique em ágar cromogênico, visto que disponibiliza identificação presuntiva da espécie de *Candida*, e partir para identificação e avaliação da susceptibilidade antifúngica. Os ágares cromogênicos, como o CHROMagar® *Candida*, permitem a visualização de múltiplas espécies em casos de coinfeção e auxiliam no direcionamento do tratamento antifúngico inicial a partir da espécie identificada. A recomendação proposta neste trabalho é apresentada na Figura 1.

Entre os métodos automatizados recomenda-se o Vitek 2, visto que este realiza ambos os testes de identificação fenotípica e avaliação da susceptibilidade antifúngica. Já para metodologias não automatizadas, recomenda-se identificação da espécie por métodos convencionais e, para avaliar a susceptibilidade antifúngica, recomenda-se a utilização do método Sensititre YeastOne, devido maior praticidade e simplicidade para desenvolver o método.

Os métodos convencionais representam um marco na identificação de *Candida* sp. Apesar de demandarem em torno de 72h para obtenção de resultados, estes métodos são comumente utilizados na rotina com o auxílio das novas metodologias para diagnóstico complementar. Em razão das limitações dos testes convencionais, diferentes métodos comerciais foram desenvolvidos para facilitar a identificação de espécies de *Candida*.

FIGURA 1 – FLUXOGRAMA DE RECOMENDAÇÃO PARA DIAGNÓSTICO DE INFECÇÕES INVASIVAS POR ESPÉCIES DE *CANDIDA*



De acordo com a demanda, o método MALDI-TOF-MS é uma excelente alternativa para identificação visto que permite rápida obtenção dos resultados, além de ser de fácil execução e interpretação. O custo para obtenção do equipamento é elevado, entretanto, o valor por teste realizado é bem reduzido, tornando-o um método com melhor custo-benefício. Apesar das vantagens do método, vale ressaltar a importância de realizar ao menos um teste complementar para identificação.

A microdiluição em caldo ainda é o padrão-ouro para avaliação da susceptibilidade antifúngica de *Candida* sp., porém, por ser trabalhoso e de maior custo, não é o método de escolha nos laboratórios microbiológicos. Entre os

diversos métodos existentes para teste de susceptibilidade antifúngica, o método Sensititre YeastOne é uma alternativa simples, prática e de rápida execução para ser utilizada na rotina.

Os métodos automatizados apresentam os melhores resultados em relação à rapidez, precisão e acurácia na obtenção de resultados de identificação e avaliação da susceptibilidade antifúngica. É o método de escolha na maioria dos laboratórios clínicos devido sua praticidade e facilidade de manuseio.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A rápida identificação da espécie de *Candida*, especialmente em hemocultura, pode auxiliar no manejo clínico da infecção e permitir a melhor escolha de tratamento, principalmente em pacientes com elevado risco de desenvolver infecção fúngica invasiva. Entretanto, a identificação precisa ser específica, pois erros de identificação podem resultar em terapia imprópria visto que a susceptibilidade é baseada na espécie identificada.

Devido ao elevado número de infecções por *Candida* sp. em pacientes hospitalizados, aumento na incidência de espécies resistentes aos antifúngicos e o alto risco de mortalidade associado, destaca-se a importância da realização dos testes de susceptibilidade antifúngica. Entretanto, o mesmo não é utilizado na rotina dos laboratórios de micologia devido ao alto custo e tempo de procedimento. Assim, é ressaltada a importância dos estudos de vigilância para acompanhar a incidência de espécies resistentes em casos de infecções por *Candida* sp., além da elaboração de novas estratégias para a rápida e correta identificação da espécie com o objetivo de adequar o tratamento antifúngico e reduzir o risco de mortalidade em pacientes susceptíveis.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBES, S.; TRABELSI, H.; AMOURI, I.; SALLEMI, H.; NEJ, S.; FATMA, C.; MAKNI, F.; AYADI, A. Méthodes d'étude de La sensibilité *in vitro* de *Candida* spp. aux antifongiques. **Annales de Biologie Clinique**. v. 70, n. 6, p. 635-642, 2012.

ALAM, M. Z.; ALAM, Q.; JIMAN-FATANI, A.; KAMAL, M. A.; ABUZENADAH, A. M.; CHAUDHARY, A. G.; AKRAM, M.; HAQUE, A. *Candida* identification: a journey from conventional method to molecular methods in medical mycology. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 30, n. 5, p. 1437-1451, 2014.

ALFOUZAN, W.; AL-ENEZI, T.; ALROOMI, E.; SANDHYA, V.; CHANDY, R.; KHAN, Z. U. Comparison of the Vitek 2 antifungal susceptibility system with Etest using clinical isolates of *Candida* species. **Revista Iberoamericana de Micología**. v. 34, n. 3, p. 171-174, 2017.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consultas. Disponível em: <<https://consultas.anvisa.gov.br/#/saude/>>. Acesso em: 20 set. 2018.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 8: Detecção e identificação de fungos de importância médica – Brasília: Anvisa, 2013.

BAL, A. M. & MCGILL, M. Rapid species identification of *Candida* directly from blood culture broths by Sepsityper-MALDI-TOF mass spectrometry: impact on antifungal therapy. **Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh**. v. 48, n. 2, p. 114-119, 2018.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing Yeasts. Approved standard-M27-A3. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2008.

CAMPBELL, C. K.; DAVEY, K. G.; HOLMES, A. D.; SZEKELY, A.; WARNOCK, D W. Comparison of the API *Candida* System with the AUXACOLOR System for Identification of Common Yeast Pathogens. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 37, n. 3, p. 821-823, 1999.

CUENCA-ESTRELLA, M.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A.; BERNAL-MARTINEZ, L.; CUESTA, M.; BUITRAGO, M. J.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L. Comparison of the Vitek 2 Antifungal Susceptibility System with the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Broth Microdilution Reference Methods and with the Sensititre YeastOne and Etest Techniques for *In Vitro* Detection of Antifungal Resistance in Yeast Isolates. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 48, n. 5, p. 1782-1786, 2010.

DEORUKHKAR, S. C. & ROUSHANI, S. Identification of *Candida* Species: Conventional Methods in the Era of Molecular Diagnosis. **Annals of Microbiology and Immunology**. v. 1, n. 1:1002, 2018.

DOI, A. M.; PIGNATARI, A. C. C.; EDMOND, M. B.; MARRA, A. R.; CAMARGO, L. F. A.; SIQUEIRA, R. A.; MOTA, V. P. da; COLOMBO, A. L. Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. **PLoS ONE**: e0146909, v. 11, n. 1, p.1-9, 2016.

GIACOMAZZI, J.; BEATHGEN, L.; CARNEIRO, L. C.; MILLINGTON, M. A.; DENNING, D. W.; COLOMBO, A. L.; PASQUALOTTO, A. C. The burden of serious human fungal infections in Brazil. **Mycoses**. v. 59, n. 3, p. 145-150, 2016.

GONZÁLEZ-LARA M. F.; TORRES-GONZÁLES, P.; RANGEL-CORDER, A.; SIFUENTES-OSORNIO, J.; PONCE-DE-LEÓN, A.; MARTÍNEZ-GAMBOA, A. Identification and Susceptibility Testing of *Candida spp.* Directly from yeast-positive blood cultures with Vitek-2. **Diagnostic Microbiology & Infectious Disease**, v. 89, n. 3, p. 202-204, 2017.

HOF, H; EIGNER, U.; MAIER, T.; STAIB, P. Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* by means of MALDI-TOF mass spectrometry. **Clinical Laboratory**. v. 58, n. 9, p. 927-931, 2012.

KOGA-ITO, C. Y.; LYON, J. P.; RESENDE, M. A. Comparison between E-test and CLSI Broth Microdilution Method for antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* oral isolates. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**. v. 50, n. 1, p. 7-10, 2008.

KUMAR, D.; BHATTACHARYYA, S.; GUPTA, P.; BANERJEE, G.; SINGH, M. Comparative analysis of disc diffusion and E-test with broth micro-dilution for susceptibility testing of clinical *Candida* isolates against amphotericin B, fluconazole, voriconazole and caspofungin. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**. v. 9, n. 11, p. 1-4, 2015.

LACAZ, C. S.; PORTO, E. MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. Tratado de Micologia Médica. 9ª ed., São Paulo: **Sarvier**, 2002.

MARUCCO, A. P.; MINERVINI, P.; SNITMAN, G. V.; SORGE, A.; GUELFAND, L. I.; MORAL, L. L.; INTEGRANTES DE LA RED DE MICOLOGIA CABA. Comparison of the identification results of *Candida* species obtained by BD Phoenix™ and Maldi-TOF (Bruker Microflex LT Biotyper 3.1). **Revista Argentina de Microbiología**. v. 50, n. 4, p. 337-340, 2018.

NEPPELENBROEK, K. H.; SEÓ, R. S.; URBAN, V. M.; SILVA, S.; DOVIGO, L. N.; JORGE, J. H.; CAMPANHA, N. H. Identification of *Candida* species in the clinical laboratory: a review of conventional, commercial, and molecular techniques. **Oral Diseases**. v. 20, n. 4, p.329-344, 2014.

PAPPAS, P. G.; LIONAKIS, M. S.; ARENDRUP, M. C.; OSTRYSKY-ZEICHNER, L.; KULLBERG B. J. Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers**. v. 4:18026, 2018.

PASTERNAK, J. Novas metodologias de identificação de micro-organismos: MALDI-TOF. **Einstein (São Paulo)**, São Paulo, v. 10, n. 1, p. 118-119, 2012.

PFALLER, M. A.; CHATURVEDI, V.; DIEKEMA, D. J.; GHANNOUM, M. A.; HOLLIDAY, N. M.; KILLIAN, S. B.; KNAPP, C. C.; MESSER, S. A.; MISKOV, A.; RAMANI, R. Clinical Evaluation of the Sensititre YeastOne Colorimetric Antifungal Panel for Antifungal Susceptibility Testing of the Echinocandins Anidulafungin, Caspofungin, and Micafungin. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 46, n. 7, p 2155-2159, 2008.

PFALLER, M. A.; ESPINEL-INGROFF, A.; JONES, R. N. Clinical Evaluation of the Sensititre YeastOne Colorimetric Antifungal Panel for Antifungal Susceptibility Testing of the New Triazoles Voriconazole, Posaconazole, and Ravuconazole. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 42, n. 10, p 4577-4580, 2004.

POSTERARO, B. & SANGUINETTI, M. The future of fungal susceptibility testing. **Future Microbiology**. v. 9, n. 8, p. 947-967, 2014.

PUIG, C. R. de A.; AGÜERO-BALBÍN, J.; FERNÁNDEZ-MAZARRASA, C.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L. Evaluation of the Vitek-MS™ system in the identification of *Candida* isolates from bloodstream infections. **Revista Iberoamericana de Micología**., 2018, no prelo.

POSTERARO, B.; RUGGERI, A.; DE CAROLIS, E.; TORELLI, R.; VELLA, A.; DE MAIO, F.; RICCIARDI, W.; POSTERARO, P.; SANGUINETTI, M. Comparative Evaluation of BD Phoenix and Vitek 2 Systems for Species Identification of Common and Uncommon Pathogenic Yeasts. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 51, v. 11, p. 3841-3845, 2013.

QUINDÓS, G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. **Revista Iberoamericana de Micología**. v. 31, n. 1, p. 42-48, 2014.

ROSENVINGE, F.; DZAJIC, E.; KNUDSEN, E.; MALIG, S.; ANDERSEN, L. B.; LOVIG, A.; ARENDRUP, M.; JENSEN, T.; GAHRN-HANSEN, B.; KEMP, M. Performance of matrix-assisted laser desorption-time of flight mass spectrometry for identification of clinical yeast isolates. **Mycoses**. v. 56, n. 3, p. 229-235, 2012.

SINGH, G.; PITOYO, C. W.; ADITIANINGSIH, D.; RUMEND, C. M. Risk factors for early invasive fungal disease in critically ill patients. **Indian Journal of Critical Care Medicine**, v. 20, n. 11, p. 633-639, 2016.

SIQUEIRA, R. A.; DOI, A. M.; CROSSARA, P. P. P.; KOGA, P. C. M.; MARQUES, A. G.; NUNES, F. G.; PASTERNAK, J.; MARTINO, M. D. V. Evaluation of two commercial methods for the susceptibility testing of *Candida* species: Vitek 2® and Sensititre YeastOne®. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 35, n. 2, p. 83-87, 2018.

SONG, Y. B.; SUH, M. K.; HA, G. Y.; KIM, H. Antifungal susceptibility Testing with Etest for *Candida* species Isolated from Patients with Oral Candidiasis. **Annals of Dermatology**. v. 27, n. 6; p. 715-720, 2015.

TRAN, A.; ALBIN, K.; KERR, A.; JONES, M.; GILLIGAN, P. H. Cost savings incurred by implementation of routine microbiological identification by matrix-assisted laser

desorption/ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 52, n. 8, p. 2473-2479, 2015.

WOHLMEISTER, D.; VIANNA, D. R. B.; HELFER, V. E.; CALIL, L. N.; BUFFON, A.; FUENTEFRIA, A. M.; CORBELLINI, V. A.; PILGER, D. A. Differentiation of *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida krusei* by FT-IR and chemometrics by CHROMagar™ *Candida*. **Journal of Microbiological Methods**. v. 141, p. 121-125, 2017.

ZHAO, L.; DE HOOG, G. S.; CORNELISSEN, A.; LYU, Q.; MOU, L.; LIU, T.; VATANSHENASSAN, M.; KANG, Y. Prospective evaluation of the chromogenic medium CandiSelect 4 for differentiation and presumptive identification of non-*Candida albicans* *Candida* species. **Fungal Biology**. v. 120, p. 173-178, 2016.