

MARIA FÁTIMA SUGIZAKI

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DO ISOLAMENTO DE *Paracoccidioides*
brasiliensis: AVALIAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA E INFLUÊNCIA
DA TEMPERATURA E DA NISTATINA NA DESCONTAMINAÇÃO**

*Está anexa
de Tese
conforme
conferência
de PG / 036 / 83
Piracicaba, 25/09/86
Faculdade de Odontologia*

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do grau de Mestre em Biologia e Patologia Buco-Dental.

PIRACICABA
ESTADO DE SÃO PAULO - BRASIL
1986

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Aos meus Pais

Irmãos

e

Sobrinhos

Mata Sugizaki
(in memoriam)

e

Laurentina K. Sugizaki

Mateus

Lúcia

Olga

e

e

e

Clara

João Alberto

Hatiro

Cristina

Eduardo Alberto

Eliane

Mário Mateus

Mário Alberto

Gisele

Alexandre

Paula Regina

Ciro

Daniela

Cássio

"É em grande parte, no seio das famílias,
que se prepara o destino das nações"

Leão XIII

H O M E N A G E M

Ao meu PAI,

*É triste perder um ente querido,
porém a presença de sua força
espiritual continua a iluminar a
orientar os caminhos a serem
seguidos, para integrar-nos na
essência da vida.*

HOMENAGEM E GRATIDÃO

À minha MÃE e irmãos MATEUS, LÚCIA e OLGA,

Quando iniciamos a nossa jornada pela breve vida, pelos longos caminhos, a nossa cabeça apresentava-se cheia de sonhos, esperanças; objetivos indefinidos, ideais quase irrealizáveis pela falta de experiência e entendimento. Mas não importa. A vida exige que se caminhe. É através desses encontros e desencontros, dessa multidão de opiniões divergentes, que se originam os conflitos. Para saná-los existe a força da lei que acalma as empolgantes paixões, origens dos desentendimentos. Diante dos obstáculos procuramos não exmorecer e caminhar, pois a vida não para, e quem para morre para a vida.

Agradeço à vocês, por tudo aquilo que deram de si para a minha formação moral e intelectual, e que alcançasse muitos dos objetivos de minha vida.

O R I E N T A D O R

Ao Prof. Dr. PEDRO BERTOLINI, agradeço a orientação deste trabalho, e também a sua amizade e compreensão em todos os momentos que juntos passamos, ensinando-me que:

BENFEITOR - é o que ajuda e passa.

AMIGO - é o que ampara em silêncio.

COMPANHEIRO - é o que colabora sem constranger.

RENOVADOR - é o que se renova para o bem.

FORTE - é o que sabe esperar no trabalho pacífico.

ESCLARECIDO - é o que se conhece.

CORAJOSO - é o que nada teme de si mesmo.

DEFENSOR - é o que coopera sem perturbar.

EFICIENTE - é o que age em benefício de todos.

VENCEDOR - é o que vence a si mesmo.

André Luiz/Chico Xavier

A G R A D E C I M E N T O S

À Profa. Dra. *Terue Sadatsune*, cujo companheirismo e dedicação muito auxiliou na minha formação científica e também na realização deste trabalho, incentivando e apresentando valiosas sugestões, a nossa gratidão.

Ao Prof. Dr. *Gilberti Moreno*, que nos incentivou a iniciar a pesquisa na área de Micologia.

À Profa. Dra. *Olga Fischman Gompertz*, à quem devo a minha formação na área de Micologia.

Ao Prof. Dr. *Mateus Sugizaki*, pelo apoio, sugestões apresentadas e revisão de texto.

Aos Docentes do Departamento de Microbiologia e Imunologia, pelo apoio e estímulo constante.

Aos Funcionários da Disciplina de Microbiologia, que muito contribuíram na realização deste trabalho.

À Profa. Dra. *Galba Maria de Campos-Takaki*, pela amizade e colaboração.

À *Clara Tizuko Fujita Sugizaki*, por todos estes anos de convivência e compreensão, a minha gratidão.

Aos amigos, que mesmo distantes, souberam dar através da amizade, a sua colaboração.

Ao Sr. *Antonio Aparecido Martins*, pela confecção dos gráficos apresentados neste trabalho.

A Sra. *Ivonete Aparecida Dorini de Aguiar e Silva*, que executou o trabalho de datilografia.

A Sra. *Enilze de Souza Nogueira Volpato*, pela revisão da bibliografia.

Ao Sr. *José Carlos Costa Carreira*, pela impressão e encadernação deste trabalho.

A todos que nos auxiliaram, mestres e amigos do passado e do presente, nossos agradecimentos.

C O N T E Ú D O

INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	5
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
MATERIAIS E MÉTODOS	20
RESULTADOS	41
DISCUSSÃO	55
SUMÁRIO E CONCLUSÕES	64
SUMMARY	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
APÊNDICE	80

A B R E V I A Ç Õ E S

CIM	=	Concentração inibitória mínima
FN	=	Meio de Fava Netto
FN+N	=	Meio de Fava Netto + 20 Unidades de nistatina/ml
GPY	=	Glucose Peptone Yeast Extract
GPY+N	=	Glucose Peptone Yeast Extract + 20 Unidades de nistatina/ml
MY	=	Mycosel Agar
MY+N	=	Mycosel Agar + 20 Unidades de nistatina/ml
MY+S	=	Mycosel Agar adicionado de sangue
MY+S+N	=	Mycosel Agar adicionado de sangue e de 20 Unidades de nistatina/ml
PBS	=	Solução Tampão Fosfato
SA	=	Sabhi Agar
SA+N	=	Sabhi Agar + 20 Unidades de nistatina/ml
SAB	=	Sabouraud Dextrose Agar
SAB+N	=	Sabouraud Dextrose Agar + 20 Unidades de nistatina/ml
YEA	=	Yeast Extract Agar
YEA+N	=	Yeast Extract Agar + 20 Unidades de nistatina/ml
YEPM	=	Yeast Extract Phosphate Medium
YEPM+N	=	Yeast Extract Phosphate Medium + 20 Unidades de nistatina/ml

I N T R O D U Ç Ã O

O *Paracoccidioides brasiliensis* é um fungo patogênico que causa a paracoccidioidomicose ou blastomicose sul-americana no homem. Essa moléstia é uma micose sistêmica, de distribuição geográfica restrita ao continente americano, onde está circunscrita aos países latino-americanos. Casos autóctones da micose foram verificadas em países situados desde o México até a Argentina (MACKINNON, 1972; GREER & RESTREPO, 1977; LONDERO, 1978).

Essa micose é considerada endêmica no Estado de São Paulo, parecendo atingir mais o interior e principalmente a zona rural (FAVA NETTO & RAPHAEL, 1961). Recentemente, MARQUES e cols. (1983), estudaram o perfil epidemiológico da paracoccidioidomicose na área endêmica de Botucatu, onde 80% dos pacientes são originados da região centro-sudeste do Estado de São Paulo, especialmente de Botucatu (Figura 1).

A paracoccidioidomicose é uma infecção granulomatosa, de evolução crônica, com grande polimorfismo clínico, onde predominam as formas pulmonares e cutâneo-mucosas, seguindo-se a de outros órgãos, como gânglios linfáticos, supra renal, baço, fígado, intestino, ossos, sistema nervoso central, etc.. Em cerca de 70 a 80% dos casos, os pulmões estão comprometidos e em geral tal localização é acompanhada de lesões em outros órgãos.



FIGURA 1 - Área endêmica de Botucatu (área hachureada) que inclui todas as cidades de origem de 80% dos 176 pacientes com paracoccidioidomicose. Estão assinaladas as nove cidades com três ou mais doentes (MARQUES e cols., 1983).

O isolamento do *Paracoccidioides brasiliensis* foi realizado pela primeira vez por LUTZ (1908) e logo a seguir por SPLENDORE (1910), utilizando ágar Sabouraud, à temperatura ambiente. O *Paracoccidioides brasiliensis* é um fungo dimórfico que, em meios de cultura à temperatura ambiente, cresce sob a forma de colônias brancas, aderentes ao meio. Nessa temperatura o crescimento do fungo é lento, iniciando-se o desenvolvimento após 20 a 30 dias de incubação (MIRANDA & MACHADO

FILHO, 1959; DEL NEGRO e cols., 1982) quando as colônias são denominadas de forma M (micelial). À 37^oC, principalmente em meios enriquecidos com determinados nutrientes, o *P. brasiliensis* apresenta maior velocidade de crescimento e produz colônias chamadas cerebriformes ou leveduriformes, constituindo a variante conhecida por Y (yeast) ou L (levedurifome).

Segundo SAN BLAS e cols. (1980), a temperatura parece ser o único fator que interfere no dimorfismo do *P. brasiliensis*. Este processo é reversível, mas o mecanismo pelo qual as células leveduriformes são convertidas em forma miceliana e vice-versa ainda permanece desconhecido.

Desde a descoberta do agente da paracoccidioidomicose, várias técnicas e meios de cultura têm sido testados para se obter o seu isolamento (LACAZ e cols., 1945; LITTMAN, 1948; MIRANDA & MACHADO-FILHO, 1959; RESTREPO & CORREA, 1972; RESTREPO & CANO, 1981). O isolamento do *P. brasiliensis* é relativamente fácil de se conseguir, quando o material semeado apresenta elevado número desse fungo e não esteja contaminado com outros microrganismos (caso de pus ganglionar). Em materiais como escarro, lesões orofaríngeas e lesões de pele, o crescimento é lento e dificultado pela presença de bactérias e fungos saprófitas, pois mesmo adicionando-se antibióticos antitibacterianos ou antibolores (GEORG e cols., 1954; DEL NEGRO e cols., 1982) os resultados nem sempre são animadores.

Nos casos de micoses pulmonares, o escarro é a

amostra clínica mais frequentemente examinada, a qual normalmente, apresenta uma certa concentração de bactérias (COMSTOCK e cols., 1974) e de leveduras do gênero *Candida* (ARMSTRONG & HALL, 1956; HELMS, 1956; COMSTOCK e cols., 1974). A taxa de crescimento desses organismos contaminantes geralmente é maior do que a de muitos fungos patogênicos, que requerem um período, em torno de 10 dias, para produzir colônias detectáveis. Alguns autores observaram que amostras de escarro, consideradas escassamente positivas para leveduras em exame direto, podem conter em torno de 10^3 células/ml (KAPICA & CLIFFORD, 1968). A adição de substâncias antibacterianas e inibidoras do crescimento de fungos resultam em uma melhor taxa de recuperação, entretanto, o isolamento do agente etiológico ainda representa um problema, o qual pode estar relacionado com o fato de que poucas colônias de *Candida albicans* inibam completamente o crescimento de outros fungos patogênicos no meio de Sabouraud dextrose ágar, como ocorre com o *Histoplasma capsulatum* (BURNS & LARSH, 1962; KAPICA e cols., 1968). Por isso, recomenda-se a realização de cultivos de amostras tomadas em diferentes períodos, semeadas em meios seletivos e não seletivos, para se obter altas taxas de isolamento (THOMPSON e cols., 1977).

SANFORD e cols. (1965) e REEP & KAPLAN (1972a), mostraram que o processo de digestão-descontaminação pode melhorar o isolamento do fungo, obtendo-se conseqüentemente, maior porcentagem de culturas positivas.

O B J E T I V O S

Considerando a importância da paracoccidioidomycose e as dificuldades de isolamento do seu agente etiológico, o *Paracoccidioides brasiliensis*, o presente estudo teve por objetivos:

1. Verificar a ocorrência das principais leveduras no escarro;
2. Estabelecer a concentração inibitória mínima de nistatina para as leveduras e para o *Paracoccidioides brasiliensis*;
3. Avaliar o crescimento das leveduras e de *Paracoccidioides brasiliensis* em diferentes meios de cultura na presença e na ausência de nistatina, às temperaturas de 34°C e 25°C;
4. Estudar a associação do cloranfenicol e nistatina como descontaminante, a fim de obter uma melhor relação entre o isolamento de *Paracoccidioides brasiliensis* e a ausência de leveduras.

R E V I S Ã O B I B L I O G R Á F I C A

1 - ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS

O termo levedura é aplicado arbitrariamente a todos os fungos hialinos ou de cor creme que, ao menos em uma das fases de seu crescimento, se reproduzem por blastosporos, e não produzem micélio aéreo abundante. As leveduras que vivem ou como saprófitas ou como parasitas, têm sido isoladas de plantas, do homem e de outros animais, do solo, águas de rios, mares, lagos, etc.. Na literatura, são descritas, aproximadamente 600 espécies, das quais 25 são consideradas patogênicas para o homem (AHEARN, 1978).

Infecções no homem, causadas por leveduras ou fungos leveduriformes, têm sido relatadas há, aproximadamente, 140 anos. Geralmente, tais infecções envolvem as membranas mucocutâneas e são de menor significado clínico, porém várias das infecções sistêmicas têm sido associadas aos processos de desnutrição, diabete, carcinomas, antibioticoterapia, terapia com corticóides, etc.. (SMITS e cols., 1966; AHEARN, 1978).

Considerando a flora microbiana do homem e de outros animais, verifica-se que as leveduras do gênero *Candida*, especialmente a *Candida albicans* sobrevivem normalmente na orofaringe (SMITS e cols., 1966), pele (LACAZ, 1980), em cáries

dentárias (SOUZA e cols., 1980), na secreção brônquica (NEGRONI & DAGLIO, 1948; HELMS, 1956; ARMSTRONG & HALL, 1956; KAPICA & CLIFFORD, 1968), na vagina (SEELIG, 1966; LACAZ, 1980), na urina e nas fezes (MURAHOVSKI e cols., 1970; LACAZ, 1980; BAPTISTA, 1981).

ODDS (1979) dando ênfase para o isolamento, de 74 espécies de leveduras de 14 gêneros registrados por LODDER (1970), encontrados principalmente no escarro, observou que a maioria dos isolamentos era, sem dúvida, contaminantes transi-tórios. No entanto, algumas dessas leveduras podem ser consi-deradas como flora normal do homem e, portanto, representam agentes patogênicos oportunistas em potencial. O escarro dos portadores de neoplasias, abscessos pulmonares e tuberculose po-de transportar rica flora bacteriana e fúngica, incluindo nes-te último caso, leveduras do gênero *Candida*, tais como *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, etc. (LACAZ, 1980).

A *Candida albicans* é, indubitavelmente, o fungo patogênico mais frequentemente isolado, em geral, afetando pri-mariamente as mucosas do trato gastrointestinal e respiratório (KAPICA & CLIFFORD, 1968). Embora ela tenha sido isolada do escarro e detectada nos pulmões em necrópsias, seu papel como um patógeno em doenças pulmonares não tem sido aceita por to-dos os pesquisadores. Pois, segundo a revisão feita por SEELIG (1966), ainda que a *C. albicans* seja um patógeno limita-do quando presente em grande número sua patogenicidade pode

ser acentuada em pacientes com mecanismos de defesa deprimidos. Além disso, nos últimos anos, tem-se demonstrado que a elevada incidência de candidíase pode estar relacionada com o crescente uso de antibióticos de largo espectro de ação, combinado ou não ao tratamento com corticóides, principalmente, a da *C. albicans* encontrada nos escarros de indivíduos com pneumonia e doença brônquica crônica.

2 - SENSIBILIDADE DAS LEVEDURAS E *Paracoccidioides brasiliensis* ÀS DROGAS

Dois antibióticos polienos, a nistatina e a anfotericina B, são as substâncias mais utilizadas no tratamento das infecções causadas por leveduras. A nistatina é produzida pelo *Streptomyces noursei* e foi descoberta por HAZEN & BROWN (1951) apresentando propriedades fungistáticas e fungicidas, aparentemente sem atividade antibacteriana. Ela é uma das drogas com maior eficiência contra a *Candida albicans*, e tem sido empregada há quase vinte anos na prática médica, sem evidências da ocorrência natural de amostras resistentes. Entretanto, algumas referências são feitas à indução de resistência "in vitro" por subculturas na presença da droga (ATAR & WINNER, 1971) ou por agentes mutagênicos (CAMPOS, 1973).

HAZEN & BROWN em 1951, verificaram que quantidades entre 1,56 e 6,25 µg* de nistatina/ml foram capazes de inibir o crescimento de *Candida albicans*.

* 1 µg de nistatina = 2,8 Unidades de nistatina.

bir o desenvolvimento ou levar à morte muitos fungos saprófitas e patogênicos, incluindo: *C. albicans*, *C. neoformans*, *H. capsulatum*, *B. dermatitidis*, *P. brasiliensis*, espécies de *Trichophyton*, *A. fumigatus*, *Penicillium notatum*, etc..

PANIKER e cols. (1963), pesquisando a sensibilidade para a nistatina, pelo método da diluição em meio líquido, de 218 amostras de *Candida* isoladas de candidíase vaginal, constataram que todas foram inibidas em concentrações de 40 U/ml ou menos. A maior parte (64,2%) foi inibida com 5 U/ml e somente 10,1% exigiram concentrações de 20 U/ml ou mais.

Por outro lado, ATHAR & WINNER (1971), utilizando o método da diluição em ágar, verificaram que a concentração inibitória mínima (CIM) de nistatina estava compreendida entre 7,5 e 25 U/ml para 1389 amostras de *Candida*. Destas, 45,9% foram sensíveis à 12,5 U/ml, 26,1% à 15 U/ml, 25,1% à 25 U/ml e apenas 2,9% à 7,5 U/ml.

CAMPOS (1973), estudando o nível de resistência das diferentes linhagens de *C. albicans*, isoladas de diversos materiais, observou que as amostras apresentaram níveis de resistência para nistatina compreendidos entre 0 e 50 µg/ml, sendo que mais de 50% apresentou níveis de resistência para 10 µg/ml.

SMITH e cols. (1975), pesquisando a incidência, distribuição e os tipos de leveduras em uma população de crianças hospitalizadas para tratamento de queimaduras, observou

que a maioria das amostras de *Candida albicans* (78,3%) foi inibida por 6,2 e 12,5 U de nistatina/ml de um total de 295 amostras isoladas. Uma maior variação na sensibilidade à nistatina foi observada entre outras espécies de leveduras, mas nenhuma apresentou resistência à concentração superior a 200 U de nistatina/ml.

SEGUELA e cols. (1980), realizando estudos com o intuito de padronizar os testes de sensibilidade para antibióticos antifúngicos, compararam o tradicional método da diluição em meio sólido com a técnica utilizando um aparelho semi-automático, o Autobac 1. As concentrações inibitórias mínimas pelo método da diluição em ágar variaram de 1,56 a 12,5 µg de nistatina/ml quando testadas para as várias espécies de *Candida*. Não observaram qualquer discrepância entre o método automático e o tradicional quanto aos resultados obtidos para a nistatina.

NOBRE e cols. (1981), empregando o método da diluição em ágar, para testes de sensibilidade à nistatina, em amostras de *C. albicans* e outras leveduras isoladas de materiais clínicos, obtiveram concentrações inibitórias mínimas para a nistatina de 10 a 50 U/ml. A maioria das amostras apresentou CIM de 15 U de nistatina/ml e apenas uma abaixo de 10 U de nistatina/ml.

POLONELLI & MORACE (1984), utilizando um sistema microautomático, na tentativa de padronizar e obter resultados

quantitativos mais precisos, na determinação das concentrações inibitórias mínimas e fungicidas, testaram 204 amostras de leveduras de 6 espécies diferentes frente a diversos antibióticos antifúngicos: 5-fluorocitosina, anfotericina B, nistatina, econazol, miconazol, ketoconazol e clotrimazol. Pelo método em estudo, a CIM para a nistatina mostrou haver uma clara sensibilidade das amostras de *C. pseudotropicalis*. As concentrações fungicidas coincidiram com as concentrações inibitórias mínimas em 47,5% de todas as leveduras testadas.

A sensibilidade do *Paracoccidioides brasiliensis*, aos antibióticos é muito pequena. A anfotericina B, embora altamente tóxica, tem sido a droga de escolha no tratamento das infecções fúngicas sistêmicas e oportunistas, e consequentemente para o tratamento da paracoccidioidomicose.

ILUKEWITSCH (1955), averiguou o poder fungistático de 71 produtos químicos contra os fungos *Histoplasma capsulatum* e *Paracoccidioides brasiliensis* e, entre as substâncias testadas, a sulfadiazina apresentou atividade contra o *P. brasiliensis* em concentrações de 500 e 1000 µg/ml, sendo menos eficiente sobre o *H. capsulatum*.

SAMPAIO e cols. (1955), estudando a ação do sulfisoxazol sobre o *P. brasiliensis* "in vitro", demonstraram ação fungistática, na concentração de 50 µg/ml e com nítida inibição a partir de 100 µg/ml, em 3 (três) cepas testadas.

LACAZ & MINAMI (1963), testando 10 cepas de *P.*

brasiliensis frente a um preparado sulfamídico, RO 4-4393, verificaram pequenas variações no comportamento das amostras, mas regra geral, observaram efeito inibitório em concentrações de 6,25 a 12,5 µg/ml.

Pela importância que a anfotericina B representa no tratamento da blastomicose sul-americana, CASTRILLON & MINAMI (1971), estudaram o desenvolvimento da resistência do *P. brasiliensis* à referida droga. Nesse estudo, 4 amostras do fungo foram testadas por sucessivas passagens em concentrações crescentes do antibiótico, obtendo-se culturas resistentes à 2000 µg de anfotericina B/ml de meio.

NEGRONI & RODRIGUEZ (1973), estudando a ação fungistática e fungicida do miconazol, verificaram que esta é uma droga de amplo espectro de ação, inibindo "in vitro" fungos filamentosos, leveduriformes e actinomicetos. Em relação aos agentes de micoses profundas, *H. capsulatum*, *P. brasiliensis*, *B. dermatitidis* e *S. schenckii*, a inibição pelo antibiótico foi parcial nas concentrações de 1,0 µg/ml e total para 10 µg/ml.

RESTREPO & ARANGO (1980) pesquisaram "in vitro" a sensibilidade de 60 amostras de *P. brasiliensis* à sulfadiazina e sulfadimetoxina pela técnica da diluição em ágar e constataram que 51,6% das amostras apresentaram concentrações inibitórias mínimas de 50 µg/ml para qualquer uma das drogas testadas. Concentrações mais elevadas inibiram em torno de 75% das amostras, no entanto, 6,7% de tais cepas permaneceram resistentes à sulfadiazina e 8,4% à sulfadimetoxina, nas concentrações

de 200 µg/ml de cada droga.

STEVENS & PHUOC (1982) estudaram "in vitro" a interação do trimetoprim e sulfametoxazol sobre 4 (quatro) amostras de *P. brasiliensis* isoladas de pacientes. Esses autores verificaram que todas as amostras do fungo foram resistentes ao trimetoprim e três delas apresentaram concentrações inibitórias mínimas que indicaram resistência ao sulfametoxazol (>2000 µg/ml).

3 - MEIOS DE CULTURA E MÉTODOS PARA ISOLAMENTO DE FUNGOS PATO GÊNICOS

O isolamento de fungos patogênicos de materiais clínicos é frequentemente impedido ou impossibilitado pelo crescimento abundante de bactérias contaminantes e fungos saprófitas nos meios de cultura. Particularmente, o escarro, exsudato de lesões abertas e raspados de pele ou unhas, são os materiais que, normalmente, estão aptos a serem contaminados por tais microrganismos.

Vários métodos têm sido utilizados para controlar a contaminação bacteriana, tais como: diminuição do pH do meio de cultura a níveis desfavoráveis ao crescimento de bactérias; adição de antibióticos antibacterianos (AJELLO, 1957) e adição de corantes antibacterianos (LITTMAN, 1948).

Com a descoberta do antibiótico cicloheximide, diversos estudos foram realizados demonstrando a sua atividade antifúngica, principalmente sobre fungos saprófitas. GEORG e cols. (1954), realizaram testes para determinar a sensibilidade ao cicloheximide dos fungos que causam micoses subcutâneas ou sistêmicas: *A. fumigatus*, *B. dermatitidis*, *C. albicans*, *P. brasiliensis*, *Coccidioides immitis*, *C. neoformans*, *S. schenckii*, *Phialophora compactum*, *P. pedrosoi*, *P. verrucosa*. O *P. brasiliensis* (forma Y) apresentou resistência à droga até a concentração de 5000 µg/ml, no meio de Sabouraud dextrose caldo. À exceção do *C. neoformans* e *A. fumigatus* cujos crescimentos são inibidos às baixas concentrações da droga, todos os demais fungos, também apresentaram sensibilidade somente em concentrações superiores à 5000 µg/ml.

Utilizando corantes com atividade antibacteriana, LITTMAN (1947) e LITTMAN (1948) estudaram um novo meio para o isolamento de fungos patogênicos de vários tipos de amostras clínicas. Nesse meio, o cristal violeta e a estreptomicina foram usados como agentes bacteriostáticos, e o oxgall (bile de boi) para restringir a expansão das colônias de fungos.

BRILLIAND e cols. (1979), também verificaram a eficácia de diversos corantes em meios de cultura, para o isolamento primário de fungos patogênicos. Dentre os corantes testados para *C. neoformans*, *C. albicans* e as fases dimórficas de *H. capsulatum* e *B. dermatitidis*, o vermelho de metil mostrou-se como o melhor para selecionamento dos fungos.

Para obtenção do *P. brasiliensis* que afeta as vias respiratórias, utiliza-se o escarro como a principal amostra clínica, portanto, deve-se considerar a elevada contaminação por bactérias e leveduras (ARMSTRONG & HALL, 1956; HELMS, 1956; SEELIG, 1966; COMSTOCK e cols., 1974; LACAZ, 1980). Diante desse fato, vários estudos têm sido realizados para aprimorar as técnicas de isolamento dos fungos patogênicos, não somente de escarro, mas também a partir de outros materiais contaminados.

OMIECZYNSKI e cols. (1965), desenvolveram um método para suprimir o crescimento exagerado de *C. albicans* e que permitisse a esporulação de *Coccidioides immitis*. Esse método consistindo da técnica de "pour plate" simples ou dupla usando o ágar extrato de levedura, mostrou-se superior quando comparado ao método da sementeira em estrias sobre a superfície do meio, no isolamento de *C. immitis* de escarro.

Segundo NEIMESTER e cols. (1971), fungos patogênicos como *Allescheria boydii*, *Aspergillus fumigatus* e *Nocardia asteroides*, podem ser isolados utilizando-se um método de digestão com hidróxido de sódio. Isto pôde ser observado em amostras submetidas à bacteriologia da tuberculose, no período de 1966 a 1969, e que foram processadas por essa técnica.

RESTREPO & CORREA (1972), realizaram estudos sobre dois meios de cultura para o isolamento primário de *Paracoccidioides brasiliensis* de amostras de escarro. Verificaram que o ágar extrato de levedura apresentou resultados

periores ao ágar Sabouraud modificado, com taxas de recuperação de 96,8% para o primeiro e 65,6% para o último. Para esses autores, a eficiência, provavelmente não foi devido a natureza intrínseca do meio de cultura, mas ao crescimento irrelevante das espécies de *Candida* sobre o ágar extrato de levedura.

No que se refere ao desenvolvimento de meios de cultura seletivos e diferenciais para o isolamento de fungos patogênicos, SMITH & RODHE (1972) apresentaram uma nova técnica para ser utilizada em micologia médica. Essa técnica envolve o uso de papel impregnado com cicloheximide e cloranfenicol em concentrações adequadas. O papel, assim preparado, quando colocado sobre a superfície de um meio sólido e inoculado com material contendo flora mista, favorece o isolamento de um amplo espectro de fungos patogênicos e oportunistas. Para a avaliação da técnica, os autores utilizaram misturas artificiais de bactérias e fungos, materiais clínicos isolados e "pool" de materiais clínicos, artificialmente semeados com fungos, demonstrando duas vantagens em relação aos meios de cultura preparados com antibióticos: 1) o gradiente de difusão da cicloheximide permitiu um crescimento seletivo dos fungos patogênicos resistentes, por toda a zona de inibição bacteriana e, os fungos mais sensíveis puderam crescer nos seus níveis de tolerância do antibiótico; e 2) o sistema é vantajoso economicamente.

Em 1975, SMITH & GOODMAN avaliando um método para o isolamento seletivo de *Histoplasma capsulatum* e *Blastomyces*

dermatitidis, a partir de materiais contaminados, adicionaram hidróxido de amônio (NH_4OH) concentrado sobre a superfície do meio sólido e obtiveram inibição do crescimento de muitas bactérias, leveduras e fungos saprófitas, normalmente encontrados em tecidos animais e escarro. Nesse estudo, os autores conseguiram obter em culturas de *B. dermatitidis*, de tecidos de cães, 24% a mais de isolamentos em um meio usando NH_4OH , bem como aumentos de 20 a 32% nos isolamentos de *H. capsulatum* de escarro.

O *P. brasiliensis*, geralmente tem sido isolado em uma variedade de meios sólidos, incubados sob condições de aerobiose, a 37°C ou a temperatura ambiente. O isolamento primário raramente é feito em meios líquidos, no entanto, alguns estudos sobre a utilização de meios líquidos para o isolamento de *P. brasiliensis*, na forma leveduriforme foram relatados por PEDROSO (1964) e RESTREPO e cols. (1981).

Além dos meios de cultura seletivos e métodos de isolamento primário dos fungos patogênicos, vários estudos sobre processos de digestão - descontaminação do escarro, também foram descritos.

LOPES (1955), utilizando uma técnica de concentração do escarro (Método de Petroff) realizou estudos para visualizar o *P. brasiliensis* em exame direto. Tal método é indicado nos casos em que a quantidade de fungos presente na amostra é baixa dificultando a manipulação.

SANFORD e cols. (1965), liquefazendo o escarro

com pancreatina seguido por centrifugação, para concentrar o material, verificaram que a enzima além de não ter efeito deletério sobre os fungos, *C. neoformans*, *B. dermatitidis* e espécies de *Apergillus*, possibilita aumentar a sua recuperação.

REEP & KAPLAN (1972b) analisaram a possibilidade de utilizar agentes mucolíticos associados a substâncias descontaminantes no tratamento rápido dos escarros, em exames micológicos. Os processos de digestão - descontaminação utilizados por esses autores foram: 1) N-acetil-l-cisteína-hidróxido de sódio; 2) ditiotreitól-hidróxido de sódio e 3) fosfato trisódico-zefiran. Esses processos foram testados em diversas amostras de escarros semeadas artificialmente, cada uma com duas das 10 espécies de fungos em estudo, incluindo o *P. brasiliensis*. A recuperação deste fungo foi consideravelmente baixa com os dois primeiros agentes mucolíticos e maior com o terceiro.

GERVASI & MILLER (1975), também pesquisaram a atuação de agentes mucolíticos de escarro (N-acetil-l-cisteína, ditiotreitól e pancreatina-tripsina) no isolamento de *Cryptococcus neoformans*. Os autores demonstraram que esse microrganismo, quando presente em concentrações tão baixas quanto 10 leveduras/ml de escarro, podem ser isoladas com frequências mais elevadas do que quando o processo de digestão não foi realizado.

RESTREPO & CANO (1981) investigaram o efeito

dos processos de digestão e de vários meios de cultura sobre o isolamento de fungos causadores de micoses respiratórias de es carros semeados artificialmente. Os agentes mucolíticos N-acetil-l-cisteína e pancreatina, não afetaram a viabilidade dos microrganismos estudados. Entre os vários meios de cultura usados, 4 parecem constituir uma bateria conveniente: Sabhi, Sabouraud modificado, ágar extrato de levedura e Littman alpis te. Apesar da alta taxa de contaminação, o Sabhi foi eficiente para todos os fungos testados, exceto para o *P. brasiliensis*. Os meios de Sabouraud modificado e ágar extrato de levedura per mitiram crescimento adequado de *H. capsulatum*, *P. brasiliensis*, *N. asteroides*, *A. fumigatus* e *S. schenckii*. O ágar extrato de levedura apresentou menor contaminação que o Sabouraud modificado, enquanto que o Littman alpiste ágar permitiu o pronto reconhecimento de colônias pigmentadas de *C. neoformans*.

M A T E R I A I S E M É T O D O S

1 - MICRORGANISMOS

1.1 - LEVEDURAS

Cinqüenta e sete amostras de leveduras foram isoladas de escarro, provenientes de pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina (UNESP). Para cada amostra foi feita sua identificação e determinada a concentração inibitória mínima frente à nistatina.

1.2 - *Paracoccidíoides brasiliensis*

Onze cepas de *P. brasiliensis* foram obtidas de pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, provenientes dos seguintes materiais: gânglio (seis amostras), escarro (três amostras), biópsia de pele (uma amostra) e lesão de mucosa (uma amostra). Essas cepas isoladas foram estudadas quanto à concentração inibitória mínima frente à nistatina.

2 - MEIOS DE CULTURA

2.1 - PARA ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS

Os meios de cultura relacionados a seguir foram utilizados para o isolamento de leveduras, provas de assimilação e fermentação, produção de clamidosporos e filamentação.

2.1.1 - Ágar Sabouraud Dextrose (Merck).

Glicose	40 g
Peptona	10 g
Ágar	15 g
Água destilada	1000 ml

$$\text{pH} = 5,6 \pm 0,1$$

Adicionar 65 g de meio desidratado a 1000 ml de água destilada e aquecer até completa dissolução. Distribuir em tubos de ensaio e esterilizar em autoclave a 120°C durante 15 minutos. Solidificar em posição inclinada.

2.1.2 - Ágar Sabouraud Dextrose (Merck) adicionado de cloranfenicol

Ágar Sabouraud Dextrose	65 g
Cloranfenicol	0,05 g
Água destilada	1000 ml

Adicionar cloranfenicol, previamente dissolvido em álcool metílico e solução tampão fosfato pH = 6,0 ao ágar Sabouraud dextrose dissolvido em água destilada. Autoclavar à 120°C por 15 minutos e distribuir em placas de Petri.

2.1.3 - Ágar Sabouraud Dextrose (Merck) adicionado de extrato de levedura

Ágar Sabouraud Dextrose	65 g
Extrato de Levedura	5 g
Água destilada	1000 ml

Adicionar o extrato de levedura ao ágar Sabouraud dextrose dissolvido em água destilada. Aquecer até completa dissolução e distribuir em tubos de ensaio. Esterilizar em autoclave à 120°C durante 15 minutos. Solidificar em posição inclinada.

2.1.4 - Ágar Farinha de Milho com Tween 80 (BERNHARDT, 1946) modificado

Farinha de Milho amarela	12,5 g
Água destilada	300 ml
Ágar	3,8 g
Tween 80	3,0 ml

Adicionar farinha de milho amarela à 300 ml de água destilada e aquecer em banho maria à 60°C durante uma hora. Filtrar em papel de filtro, completar para 300 ml o volu-

me filtrado, adicionar ágar e aquecer até completa dissolução. Acrescentar Tween 80, homogeneizar, distribuir em tubos de ensaio e esterilizar em autoclave a 120°C durante 15 minutos.

2.1.5 - Prova de Assimilação de Carbono (LODDER & KREJER-VAN RIJ, 1952)

Sulfato de amônio	5 g
Fosfato de potássio monobásico	1 g
Sulfato de magnésio heptaidratado ..	0,5 g
Ágar	20 g
Água destilada	1000 ml

Dissolver o ágar em água destilada, acrescentar os sais, agitar e distribuir alíquotas de 16 ml em tubos de ensaio de 18 x 180 mm. Esterilizar em autoclave a 120°C por 15 minutos.

2.1.6 - Prova de Assimilação de Nitrogênio (LODDER & KREJER-VAN RIJ, 1952)

Dextrose	20 g
Fosfato de potássio monobásico	1 g
Sulfato de magnésio heptaidratado .	0,5 g
Ágar	20 g
Água destilada	1000 ml

Dissolver o ágar em água destilada, acrescentar a dextrose e os sais, agitar e distribuir alíquotas de 16 ml em

tubos de ensaio 18 x 180 mm. Esterilizar em autoclave a 120°C por 15 minutos.

2.1.7 - Prova de Fermentação de Carboidratos

Peptona	10 g
Extrato de Levedura	5 g
Azul de bromotimol	8 ml
Água destilada	1000 ml

Dissolver peptona e extrato de levedura em balão com 1000 ml de água destilada. Ajustar o pH a 7,2. Adicionar indicador, homogeneizar e distribuir em 5 balões. Adicionar a cada balão separadamente, 2% dos açúcares: dextrose, sacarose, lactose, maltose e galactose. Agitar até completa dissolução e distribuir 5 ml do meio em tubos 12 x 120 mm, com tubos de Durham. Esterilizar a 110°C durante 10 minutos.

2.2 - PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

O Antibiotic Medium 20 líquido foi empregado para determinar a concentração inibitória mínima das amostras de leveduras e o meio sólido para as amostras de *Paracoccidioides brasiliensis*.

2.2.1 - Antibiotic Medium 20 (M-20)

Extrato de levedura	6,5 g
Extrato de carne	1,5 g
Peptona	5 g
Triptona (pancreatic digest of casein)	10 g
Dextrose	11 g
Cloreto de sódio	3,5 g
Fosfato dipotássico	1,32 g
Água	1000 ml

pH = 6,6

Dissolver os componentes em 1000 ml de água des
tilada aquecendo e esterilizar em autoclave a 121°C durante
15 minutos.

2.3 - PARA O ISOLAMENTO DE *Paracoccidioides brasiliensis*

Os seguintes meios foram utilizados para ava
liar o crescimento de *Paracoccidioides brasiliensis* em isolamen
to primário:

2.3.1 - Mycosel Ágar (BBL)

Peptona	10 g
D(+)glicose	10 g
Ágar	15,5 g
Cicloheximide	0,4 g
Cloranfenicol	0,05g

pH = 6,9 ± 0,2

Suspender 36 g do meio desidratado em 1000 ml de água destilada. Aquecer até dissolver completamente. Autoclavar a 120°C durante 15 minutos e distribuir 30 ml do meio por placa.

2.3.2 - Mycosel Ágar (BBL) adicionado de Sangue de Carneiro

Mycosel Ágar	36 g
Água destilada	1000 ml

Suspender 36 g do meio desidratado em 1000 ml de água destilada. Aquecer até dissolver completamente e autoclavar a 120°C durante 15 minutos. Esfriar o meio a aproximadamente 45 - 50°C e adicionar sangue desfibrinado de carneiro (10%). Distribuir 30 ml do meio por placa.

2.3.3 - Glucose - Peptone - Yeast Extract

Peptona	5 g
Extrato de levedura	5 g
Solução de glicose a 50% ..	20 ml
Ágar	12 g
Água destilada	1000 ml

pH = 7,0

Dissolver peptona, extrato de levedura e ágar em 1000 ml de água destilada. Autoclavar à 120°C durante 15 minutos. Esfriar o meio à 45 - 50°C e adicionar 20 ml de uma solução de glicose à 50% esterilizada por filtração. Distribuir 30 ml do meio por placa de Petri.

2.3.4 - Meio de Fava Netto

Peptona	10 g
Proteose peptona	3 g
Extrato de carne	5 g
Cloreto de sódio	5 g
Dextrose	40 g
Ágar	18 g
Complexo vitamínico*	5 ml
Água destilada	1000 ml

pH = 7,2 ± 0,2

* Complexo vitamínico: cloridrato de tiamina, 1 mg; niacina, 1 mg; pantotenato de cálcio, 1 mg; riboflavina, 0,5 mg e inositol 5 mg.

Aquecer a água e acrescentar o ágar até dissolução completa e depois dissolver os demais componentes. Autoclavar a 120°C durante 15 minutos. Distribuir 30 ml do meio por placa de Petri.

2.3.5 - Yeast Extract Agar (RESTREPO, 1972)

Solução de extrato de levedura a 15%	6 ml
Ágar	20 g
Água destilada	1000 ml

pH = 6,5

Dissolver o ágar em 1000 ml de água destilada e autoclavar a 120°C durante 20 minutos. Esfriar o meio a 50°C e adicionar a solução de extrato de levedura, previamente esterilizada por filtração. Distribuir 30 ml do meio por placa de Petri.

2.3.6 - Yeast Extract Phosphate Medium (SMITH &
GOODMAN, 1975)

Extrato de levedura	1 g
Solução concentrada de fosfato*	2 ml
Ágar	20 g
Água destilada	1000 ml

pH = 6,8

Dissolver o ágar e extrato de levedura, misturar com a solução de fosfato. Autoclavar à 120°C durante 20 minutos. Distribuir 30 ml do meio por placa de Petri.

* Solução concentrada de fosfato:

Dissolver 40 g de fosfato de sódio dibásico em 300 ml de água destilada. Adicionar 60 g de fosfato monobásico e acertar o pH à 6,0. Ajustar o volume com água destilada para 40 ml.

2.3.7 - Sabhi Agar

Infusão de cérebro	100 g
Infusão de coração	125 g
Proteose peptona	5 g
Neopeptona	5 g
Dextrose	20 g
Cloreto de sódio	2,5 g
Fosfato de sódio dibásico	1,25g
Ágar	15 g
Água destilada	1000 ml

$$\text{pH} = 7,0 \pm 0,2$$

Hidratar o meio suspendendo 59 g em 1000 ml de água destilada e aquecer até dissolver completamente. Esterilizar em autoclave à 121°C por 15 minutos. Distribuir 30 ml do meio por placa de Petri.

3 - ISOLAMENTO DAS AMOSTRAS DE LEVEDURAS

Amostras de escarros foram semeadas em estrias, com alça de platina, em placas de ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol e, incubadas a 37°C por 96 horas. Foram realizadas observações diárias e as colônias suspeitas de leveduras eram coradas pelo método de Gram, examinadas microscopicamente e repicadas para tubos com ágar Sabouraud dextrose para estudo posterior.

4 - IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS ISOLADAS

As amostras de leveduras isoladas de escarro, foram estudadas quanto às suas características micromorfológicas e fisiológicas, de acordo com as técnicas preconizadas por LODDER (1970).

4.1 - CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

As características de reprodução vegetativa, morfologia das células, formação de pseudo-micélio, micélio verdadeiro e clamidosporos, foram observadas utilizando-se a técnica de cultura em lâmina.

Culturas de leveduras crescidas em ágar Sabouraud dextrose adicionado de extrato de levedura, a 37°C durante 24

horas foram semeadas em ágar farinha de milho com Tween 80 e observadas ao microscópio após 1 a 5 dias de incubação a 25°C.

4.1.1 - Técnica de cultivo em lâmina

- a - Colocar uma lâmina de microscopia sobre um bastão de vidro em forma de U, em uma placa de Petri e esterilizar;
- b - distribuir o meio liquefeito, ágar farinha de milho com Tween 80, sobre a lâmina de vidro, de modo a formar uma película, evitando-se a formação de bolhas. Deixar solidificar;
- c - semear a levedura em estudo em finas estrias paralelas sobre a superfície do meio;
- d - embeber pequena porção de algodão hidrófilo com água esterilizada, para se obter a umidade necessária para o crescimento da levedura;
- e - incubar a 25°C durante 1 a 5 dias;
- f - colocar lamínula sobre as estrias, no momento de observar ao microscópio.

4.2 - CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS

Os testes de assimilação de fontes carbonadas e nitrogenadas, e de fermentação de carboidratos foram realizadas

das utilizando-se suspensões de leveduras obtidas pela adição de 6 ml de solução fisiológica a uma cultura crescida em tubos de ágar Sabouraud dextrose com extrato de levedura e incubadas a 37°C durante 24 horas.

4.2.1 - Testes de Assimilação de fontes carbonadas e nitrogenadas

Os testes foram realizados segundo a técnica descrita por BEIJERINCK, 1889 (VAN DER WALT, 1970), utilizando meio de cultura sólido, contendo ágar, sulfato de amônio, fosfato de potássio monobásico, sulfato de magnésio heptaidratado. A prova foi executada da seguinte forma:

- a - fundir em banho maria o meio base, contidos em tubos de ensaio em alíquotas de 16 ml e resfriar a temperatura de 45 a 50°C;
- b - adicionar ao meio base 2 ml da suspensão de levedura e agitar até completa homogeneização;
- c - verter a mistura para placa de Petri de 100 x 20 mm, deixar solidificar;
- d - no fundo da placa, assinalar em pontos equidistantes as substâncias a serem utilizadas no teste;
- e - com uma espátula esterilizada, colocar pequenas quantidades das substâncias testes na superfície do meio, nas respectivas

vas marcas assinaladas na placa;

- f - incubar as placas à temperatura de 25°C até 72 horas;
- g - na prova positiva há formação de um halo de crescimento ao redor da substância assimilada e na negativa, tal halo assimilativo não é verificado.

Como fontes de carbono, foram empregados os seguintes carboidratos: dextrose, lactose, galactose, sacarose, maltose e rafinose. Como fontes de nitrogênio foram utilizados: nitrato de potássio, sulfato de amônia, peptona e uréia.

4.2.2 - Fermentação de Carboidratos

As provas de fermentação foram realizadas com os seguintes carboidratos: dextrose, lactose, maltose, sacarose e galactose, utilizando a seguinte técnica:

- a - inocular 0,1 ml da suspensão de levedura em tubos de ensaio de 12 x 120 mm, com tubos de Durham, contendo 5 ml de meio para fermentação com indicador azul de bromotimol;
- b - agitar para homogeneizar e incubar à 37°C;
- c - na prova positiva há formação de bolhas de gás no tubo de Durham e acidificação do meio com aparecimento de cor amarela;
- d - incubação até 30 dias, com leituras diárias.

4.3 - FORMAÇÃO DE TUBOS GERMINATIVOS PELA *Candida albicans*

Dentre as várias espécies do gênero *Candida*, a *C. albicans* e *C. stellatoidea* são as únicas capazes de produzir tubo germinativo, em presença de soro, à 37°C. Para verificar a formação de tubos germinativos utilizou-se a técnica descrita por TASCHDJIAN e cols., 1960; que consiste em:

- a - pipetar 1,0 ml de soro de coelho para tubos de ensaio 12 x 120 mm;
- b - repicar pequeno inóculo de uma cultura de 24 horas para o tubo contendo soro;
- c - incubar à 37°C por um período máximo de 4 horas;
- d - após incubação, homogeneizar e depositar uma gota da suspensão sobre uma lâmina de microscopia e cobrir com lamínula;
- e - observar ao microscópio.

5 - INÓCULO UTILIZADO PARA SEMEAR OS MEIOS DE CULTURA EM ESTUDO

5.1 - INÓCULO DE LEVEDURAS

A partir de uma cultura de 24 horas, em ágar Sa

Sabouraud dextrose adicionado de extrato de levedura e incubada a 37°C , preparou-se uma suspensão das leveduras em solução tampão fosfato (PBS) pH = 7,2, contendo 10^4 células/ml e inoculou-se em cada placa 0,1 ml desta suspensão.

5.2 - INÓCULO DE *Paracoccidioides brasiliensis*

Culturas de 5 dias, crescidas em ágar Sabouraud dextrose adicionado de extrato de levedura e incubadas a 37°C , foram utilizadas para preparar suspensões do fungo em PBS pH = 7,2, contendo de 10^6 a 10^7 células/ml.

6 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DE NISTATINA

A concentração inibitória mínima foi realizada com nistatina (Squibb) micropulverizada, contendo 5.622 unidades/mg e dissolvida em propilenoglicol e água destilada (pH = 7,0). As soluções da droga foram preparadas no dia do uso.

6.1 - PARA LEVEDURAS

Determinou-se a concentração inibitória mínima de nistatina para as cinquenta e sete amostras de leveduras iso

ladas de escarro, pelo método da diluição em meio líquido (SHADOMY & ESPINEL-INGROFF, 1982).

As amostras de leveduras foram semeadas em 1,0 ml de Antibiotic Medium 20 (M-20) e incubadas a 37°C durante 24 horas. A seguir, as amostras foram diluídas a 1:1000 no próprio meio de cultura.

Para cada amostra foram preparados 20 tubos contendo concentrações de nistatina que variaram de 1 a 350 Unidades/ml de meio de cultura (Tabela I) e um tubo controle contendo apenas meio de cultura. Em cada tubo foi semeado 0,1 ml da amostra diluída e, a seguir, os tubos foram incubados a 30°C, por 48 horas. As leituras foram realizadas pela presença de turvação do meio, após o período de incubação.

A concentração inibitória mínima foi definida como a mais baixa concentração da droga que não permitiu visualização de crescimento.

6.2 - PARA *Paracoccidioides brasiliensis*

A concentração inibitória mínima de nistatina para as amostras de *P. brasiliensis* foi determinada pelo método da diluição da droga em meio sólido, utilizando Antibiotic Medium 20 (SHADOMY & ESPINEL-INGROFF, 1982). As concentrações de nistatina preparadas para esse fim encontram-se na Tabela I

Para utilizar como inóculo, as culturas de *P. brasiliensis* em Antibiotic Medium 20 ágar incubadas a 34°C, durante 5 (cinco) dias, foram preparadas em suspensão com PBS (pH = 7,2), contendo de 10⁶ a 10⁷ células/ml.

As placas com meio de cultura e nistatina, foram inoculadas com 0,1 ml da suspensão de *P. brasiliensis* e a seguir incubadas a 34°C, durante 30 dias, fazendo-se leituras semanais. Uma amostra de *Candida albicans* foi utilizada como controle da droga.

7 - AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE LEVEDURAS E *P. brasiliensis* EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA COM E SEM NISTATINA

Para uma avaliação mais adequada os meios de cultura utilizados no isolamento de *P. brasiliensis* foram inicialmente preparados sem nistatina e em outros tantos foi adicionado 20 U de nistatina/ml de meio de cultura. Esta concentração foi escolhida com base nos testes de CIM realizados no estudo anterior (item 6) e que é capaz de inibir 100% das leveduras, mas insuficiente para atuar sobre as amostras de *P. brasiliensis*.

Para esse experimento foram empregadas 4 (quatro) cepas de *P. brasiliensis* e as 6 (seis) espécies de *Candida* isoladas de escarro, a saber: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis*, *C. guilliermondii* e *C. krusei*;

semeando-se 0,1 ml do inóculo em cada placa e espalhando com um bastão de vidro em forma de L.

Os meios de cultura utilizados foram os seguintes:

- a. Mycosel agar (MY)
- b. Mycosel agar + 20 U de nistatina/ml (MY+N)
- c. Mycosel agar adicionado de sangue (MY+S)
- d. Mycosel agar adicionado de sangue e de 20 U de nistatina/ml (MY+S+N)
- e. Glucose-Peptone-Yeast Extract (GPY)
- f. Glucose-Peptone-Yeast Extract + 20 U de nistatina/ml (GPY+N)
- g. Meio de Fava Netto (FN)
- h. Meio de Fava Netto + 20 U de nistatina/ml (FN+N)
- i. Yeast Extract Agar (YEA)
- j. Yeast Extract Agar + 20 U de nistatina/ml (YEA+N)
- l. Yeast Extract Phosphate Medium (YEPM)
- m. Yeast Extract Phosphate Medium + 20 U de nistatina/ml (YEPM+N)
- n. Sabouraud Dextrose Agar (SAB)
- o. Sabouraud Dextrose Agar + 20 U de nistatina/ml (SAB+N)
- p. Sabhi Agar (SA)
- q. Sabhi Agar + 20 U de nistatina/ml (SA+N)

Cada amostra foi semeada em 4 (quatro) placas de cada meio de cultura, sendo que duas delas foram incubadas à 34°C e as outras à 25°C. As leituras para as leveduras foram realizadas após 48 horas e leituras semanais durante 30 dias para as amostras de *P. brasiliensis*.

No meio YEPM acrescentou-se, no centro da placa, uma gota ($\pm 0,05$ ml) de hidróxido de amônio concentrado, sobre sua superfície.

8 - AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Candida albicans* E *Paracoccidioides brasiliensis*: AÇÃO PRÉVIA DO CLORANFENICOL E DE CLORANFENICOL + NISTATINA

A atuação do cloranfenicol e cloranfenicol + nistatina como descontaminantes foi verificada em suspensões contendo uma associação de *P. brasiliensis* e *C. albicans*.

Para tanto as suspensões foram preparadas em dois tubos da seguinte forma:

- a) TUBO 1: 9 ml de solução tampão fosfato pH = 7,2
0,1 ml da suspensão de *C. albicans* contendo 10^6 - 10^7 células/ml
1 ml da suspensão de *P. brasiliensis* contendo 10^6 - 10^7 células/ml
100 μ g de cloranfenicol/ml de PBS
- b) TUBO 2: 9 ml de solução tampão fosfato pH = 7,2
0,1 ml da suspensão de *C. albicans* contendo 10^6 - 10^7 células/ml
100 μ g de cloranfenicol/ml de PBS
20 U de nistatina/ml de PBS

Os tubos contendo as suspensões foram incubadas em banho maria a 34°C , durante 30 minutos e, depois colocados a temperatura ambiente por mais 30 minutos. A seguir, alíquotas de 0,1 ml foram retiradas de cada um dos tubos e semeadas em 4 (quatro) placas de cada meio de cultura da bateria empregada no estudo 7. As placas vedadas com fita adesiva foram incubadas, a 34°C e a 25°C , durante 30 dias, fazendo-se leituras semanais.

9 - MEDIDA DE CRESCIMENTO

A avaliação semiquantitativa de crescimento das leveduras e do *P. brasiliensis* foi executada de acordo com o seguinte critério:

PARÂMETRO	AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO
(-)	ausência
(1+)	de 1 a 50 colônias
(2+)	de 51 a 100 colônias
(3+)	de 101 a 200 colônias
(4+)	acima de 200 colônias

R E S U L T A D O S

Das 57 (cinquenta e sete) amostras de leveduras isoladas de escarro, a *Candida albicans* foi a espécie predominante, estando presente em 47 (quarenta e sete) isolamentos, o que corresponde a 82,4% do total. Com porcentagem bastante inferior, outras espécies foram isoladas, também: *Candida krusei* (7,0%); *Candida parapsilosis* (3,5%); *Candida tropicalis* (3,5%); *Candida guilliermondii* (1,8%) e *Candida pseudotropicalis* (1,8%) (Tabela II).

A concentração inibitória mínima (CIM) de nistatina para as 57 (cinquenta e sete) amostras de leveduras isoladas de escarro apresentou valores variáveis de 6 a 20 U de nistatina/ml (ver Tabela III). Apenas duas amostras foram sensíveis para a concentração de 6 U de nistatina/ml (ver Tabela IV) e a maior porcentagem das leveduras mostrou-se sensível à concentração de 10 U de nistatina/ml, como representado na Figura 2. Considerando a porcentagem cumulativa, obteve-se a inibição total das amostras de leveduras com a concentração de 20 U de nistatina/ml (ver Tabela V).

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de nistatina, para as onze amostras de *Paracoccidioides brasiliensis*, isoladas de diferentes materiais, mostrou que o valor mais baixo, capaz de inibir o fungo, foi de 30 U de nistatina/ml e o maior foi de 70 U de nistatina/ml (Tabela VI).

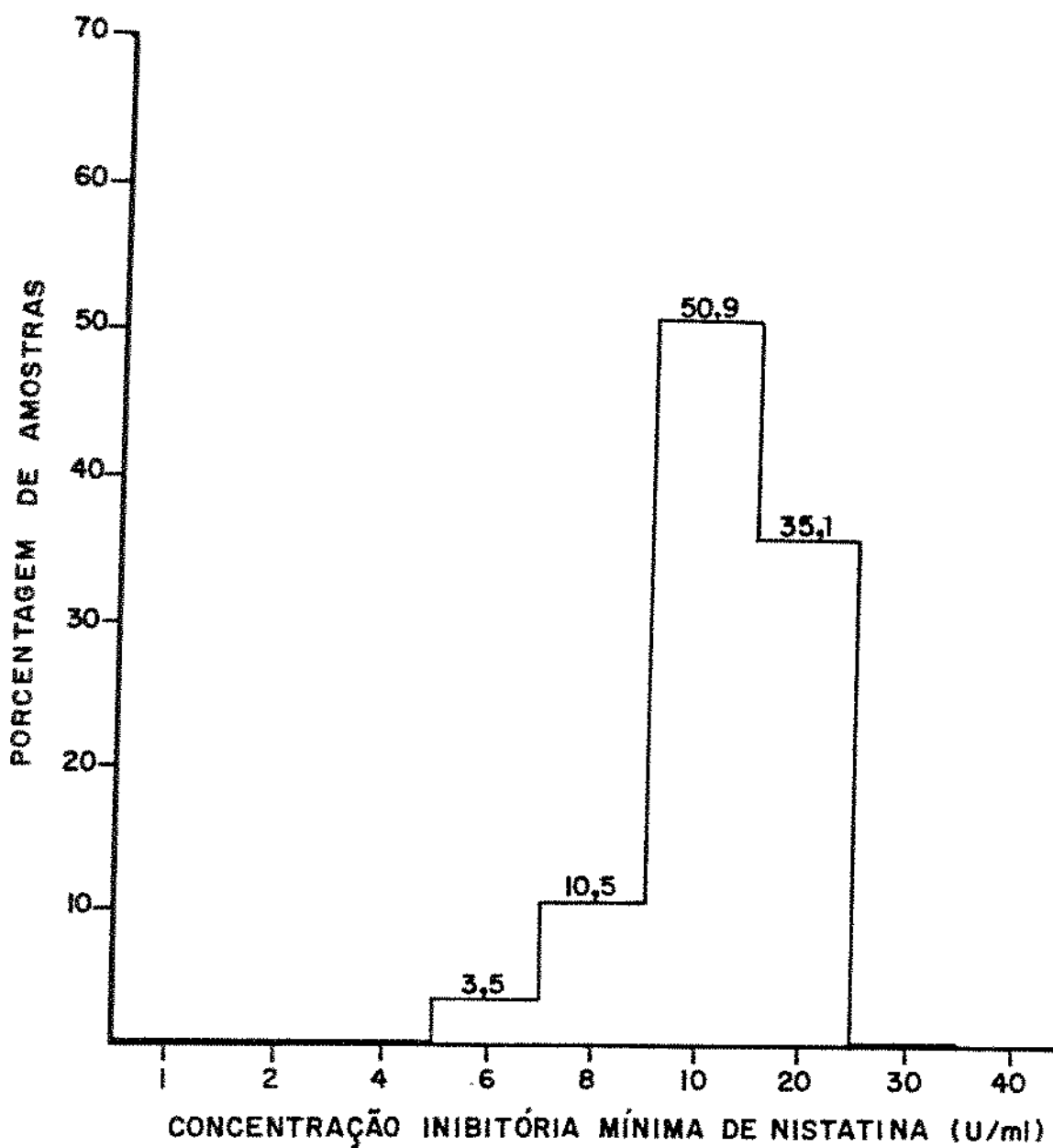


FIGURA 2 - Distribuição percentual das 57 (cinquenta e sete) amostras de leveduras, isoladas de escarro, segundo a concentração inibitória mínima (CIM) de nistatina.

O efeito da nistatina, adicionada aos meios de cultura na concentração de 20 U/ml, sobre o crescimento das seis espécies de leveduras, isoladas de pacientes (ver Tabela II) sofre influência da temperatura. Pode-se observar que a 25°C a nistatina parece ter melhor atividade do que a 34°C (ver Tabelas VII e VIII).

A nistatina inibiu o crescimento da *Candida albicans* em quase todos os meios de cultura em que foi adicionada, sendo mais acentuada a 25°C, quando a levedura cresceu apenas no MY+N. Foi constatado, também, que não houve crescimento em dois meios, mesmo na ausência da nistatina, que são o YEA e YEPN. A 34°C, a *C. albicans* foi totalmente inibida nos meios FN+N, SA+N, SAB+N e YEPN+N, desenvolvendo-se em todos os demais (Figura 3).

Pela Figura 4 pode-se verificar que a presença da nistatina teve atuação inibitória sobre a *Candida krusei*, a 25°C, nos meios FN+N e SA+N, não ocorrendo o crescimento desse fungo em quatro meios de cultura, mesmo sem a nistatina. A 34°C houve inibição pela nistatina apenas no meio YEPN+N, não se observando crescimento da levedura nos meios MY, MY+S e YEA; independentemente da presença ou ausência de nistatina.

Em relação a *C. parapsilosis*, a nistatina inibiu a levedura nos meios FN+N, SA+N e YEPN+N, a 34°C, não ocorrendo crescimento nos meios MY, MY+S e YEA mesmo com ausência de nistatina. A 25°C o comportamento da levedura foi semelhante, exceto que a nistatina inibiu, também, o seu crescimento em meio SAB+N (Figura 5).

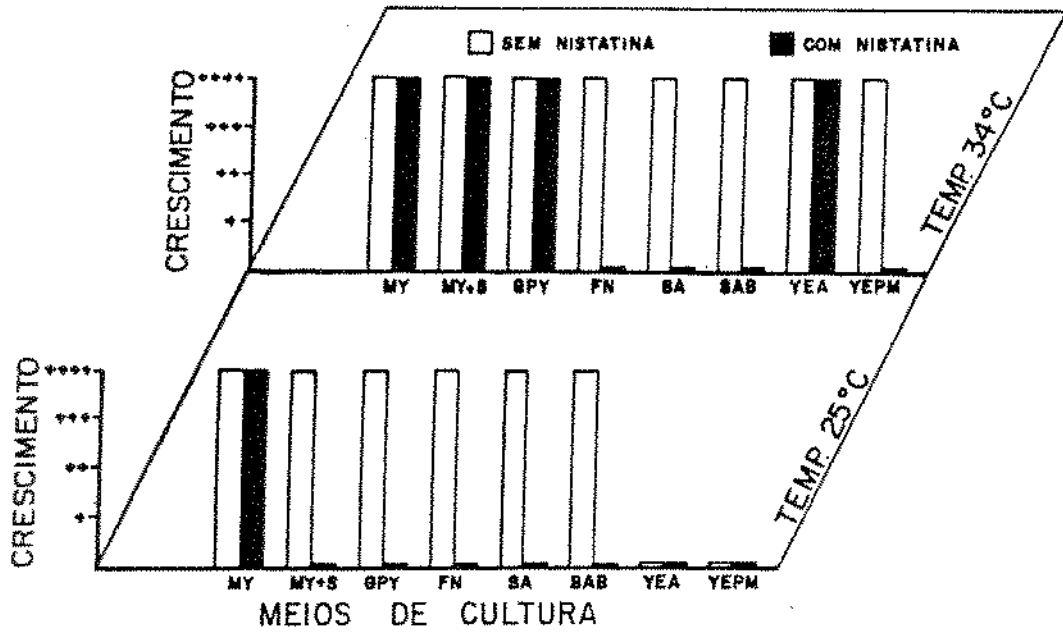


FIGURA 3 - Crescimento de *Candida albicans* em diferentes meios de cultura com e sem nistatina (20 U/ml), nas temperaturas de 34°C e 25°C.

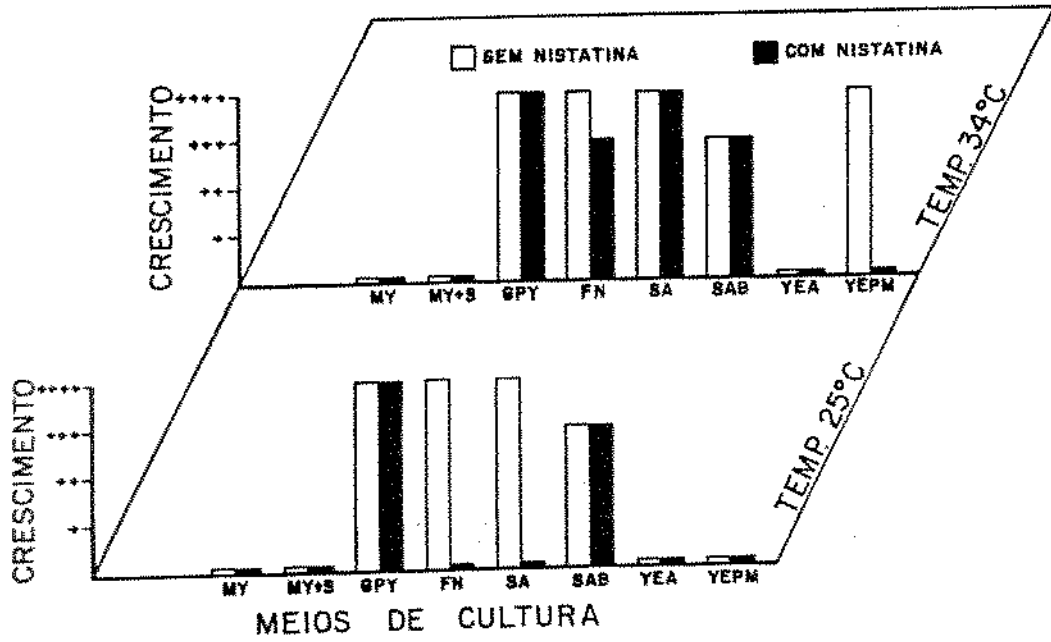


FIGURA 4 - Crescimento de *Candida krusei* em diferentes meios de cultura com e sem nistatina (20 U/ml), nas temperaturas de 34°C e 25°C.

Quanto à espécie *C. tropicalis*, a inibição pela nistatina ocorreu nos meios FN+N, SA+N, SAB+N e YEPM+N na temperatura de 34°C, e não houve crescimento do fungo no YEA com e sem nistatina. À 25°C, não houve crescimento da levedura nos meios com nistatina, a exceção do MY+N e, da mesma forma, não ocorreu crescimento no meio YEA com e sem nistatina (Figura 6).

A nistatina teve efeito inibitório sobre a *C. pseudotropicalis* apenas no SAB+N, quando submetida à temperatura de 34°C e, também, no SA+N, além do SAB+N, à 25°C. Nos meios MY, MY+S, YEA e YEPM não houve crescimento da levedura mesmo sem adicionar a nistatina, em nenhuma das duas temperaturas (Figura 7).

Para a *C. guilliermondii*, os resultados foram praticamente iguais em ambas as temperaturas, não se verificando o crescimento do fungo nos meios MY, MY+S, YEA, YEPM com e sem nistatina. O crescimento foi inibido, pela presença da nistatina, nos meios FN+N, SA+N e SAB+N, sendo que no primeiro houve inibição total à 25°C e parcial à 34°C (Figura 8).

O crescimento das quatro amostras de *P. brasiliensis*, apresentou apenas pequenas variações, em relação às temperaturas de incubação (ver Tabelas IX e X). Uma avaliação do comportamento das amostras de *P. brasiliensis*, em cada meio de cultura com e sem nistatina será feita a seguir.

A amostra Bt-07 apresentou crescimento nos meios

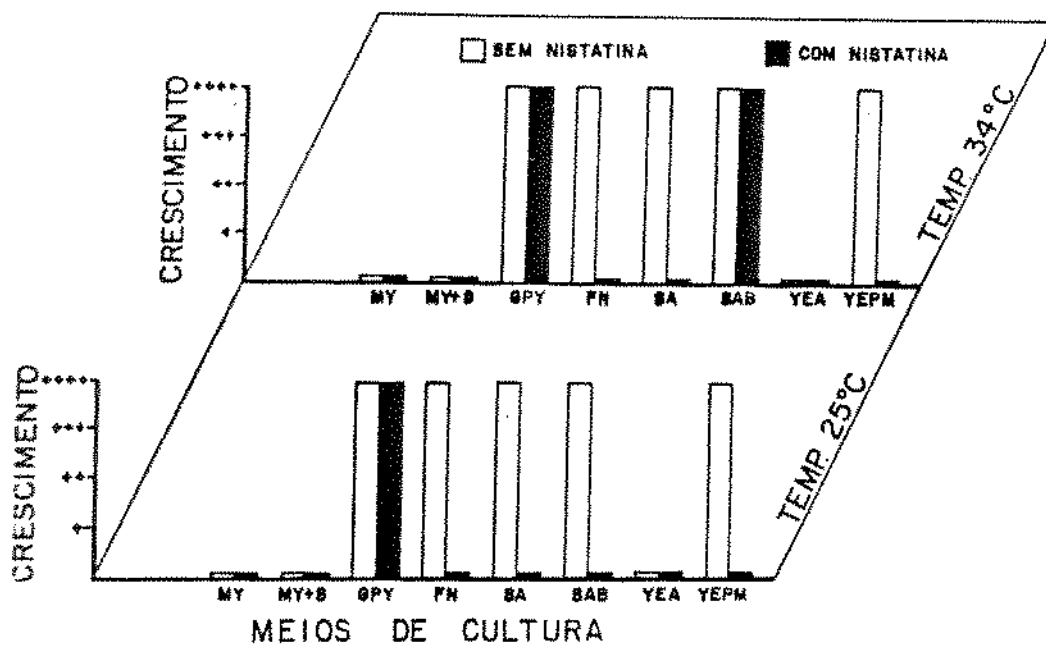


FIGURA 5 - Crescimento de *Candida parapsilosis* em diferentes meios de cultura com e sem nistatina (20 U/ml), nas temperaturas de 34°C e 25°C.

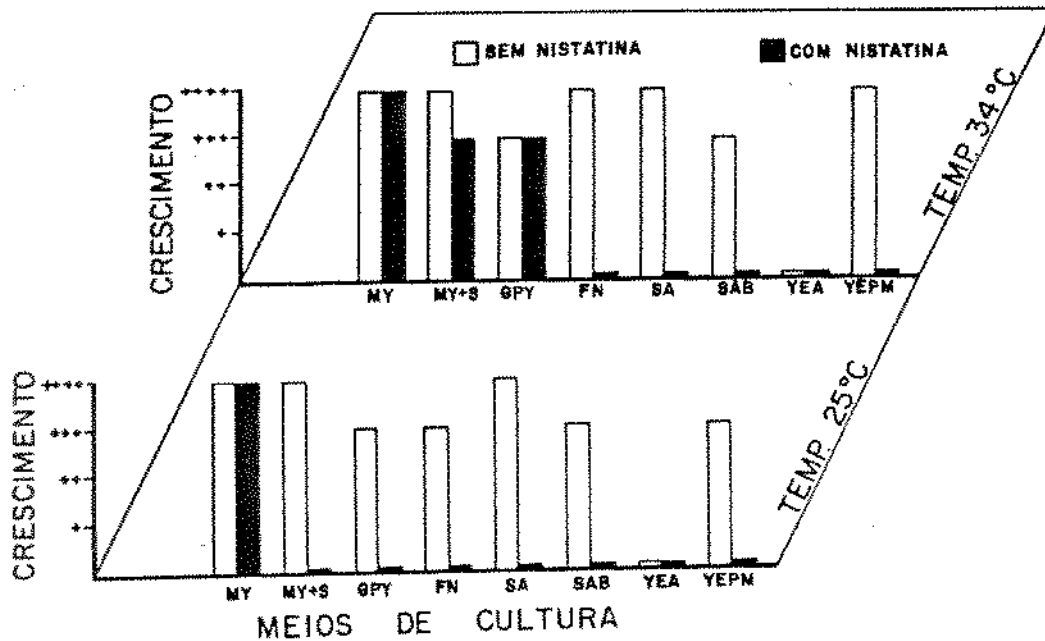


FIGURA 6 - Crescimento de *Candida tropicalis* em diferentes meios de cultura com e sem nistatina (20 U/ml), nas temperaturas de 34°C e 25°C.

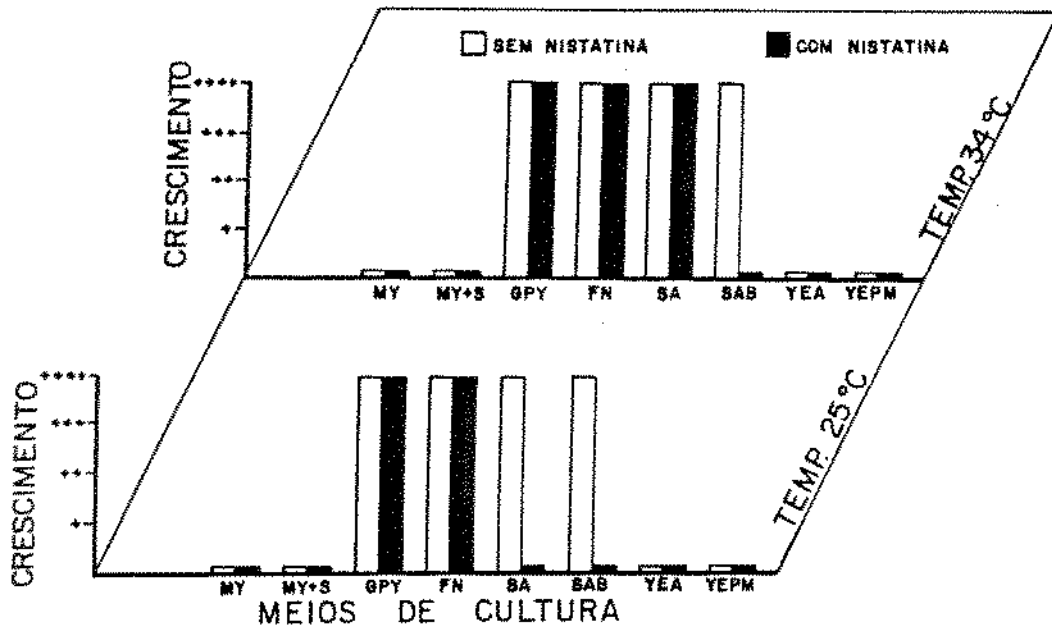


FIGURA 7 - Crescimento de *Candida pseudotropicalis* em diferentes meios de cultura com e sem nistatina (20 U/ml), nas temperaturas de 34°C e 25°C.

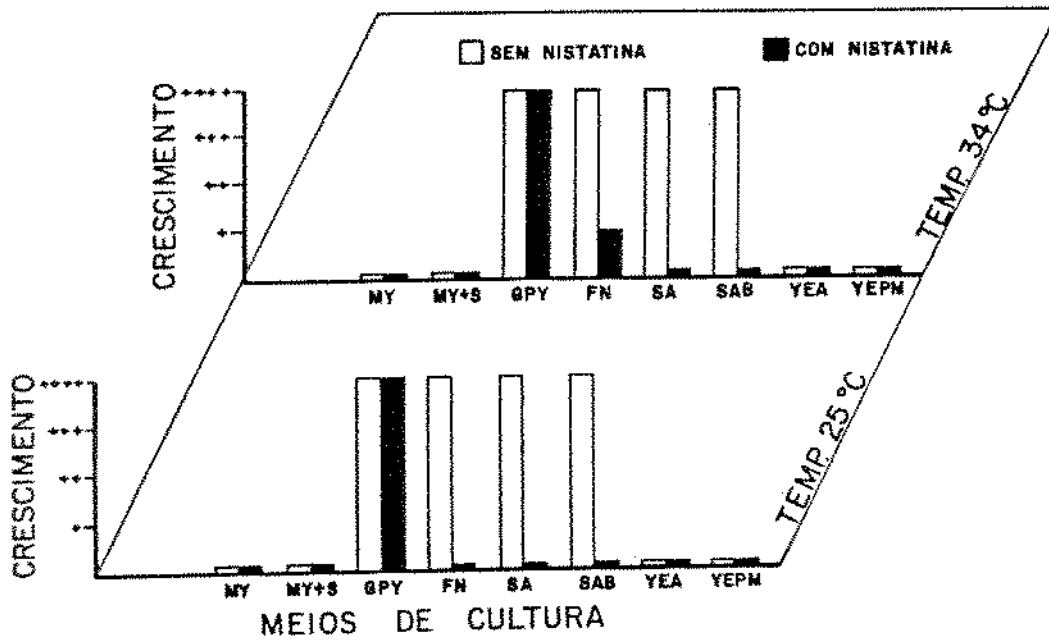


FIGURA 8 - Crescimento de *Candida guilliermondii* em diferentes meios de cultura com e sem nistatina (20 U/ml), nas temperaturas de 34°C e 25°C.

sem nistatina, com exceção do SAB, à 34°C. Nessa temperatura a presença de nistatina inibiu o crescimento da amostra no meio FN+N e interferiu parcialmente nos meios SA+N, YEA+N e YEPN+N. Quando submetida à 25°C houve crescimento da amostra em todos os meios sem nistatina, embora no SAB não tenha sido com a mesma intensidade dos demais. Com a adição da nistatina nos meios de cultura, pôde-se verificar que houve influência da droga no desenvolvimento do fungo nos meios FN+N, SA+N, SAB+N, YEA+N e YEPN+N (Figura 9).

O crescimento da amostra Bt-08 foi total em todos os meios sem nistatina, exceto no SAB, em ambas as temperaturas. Na presença da nistatina, houve inibição parcial no meio YEA+N à 34°C e no FN+N à 25°C. O *P. brasiliensis* teve seu crescimento totalmente inibido pela nistatina nos meios YEPN+N, nas duas temperaturas, e no YEA+N apenas à 25°C (Figura 10).

Quanto à amostra Bt-09, o crescimento ocorreu em todos os meios de cultura sem nistatina, em ambas as temperaturas. Em relação aos meios com nistatina, somente o SAB+N não apresentou crescimento, à 34°C, enquanto que à 25°C houve inibição nos meios SA+N, SAB+N e YEPN+N (Figura 11).

A amostra Bt-11, quando incubada à 34°C, só não cresceu nos meios SAB e SAB+N, sendo que em todos os demais houve desenvolvimento do fungo, independentemente da presença ou não da nistatina. À 25°C, também não ocorreu crescimento

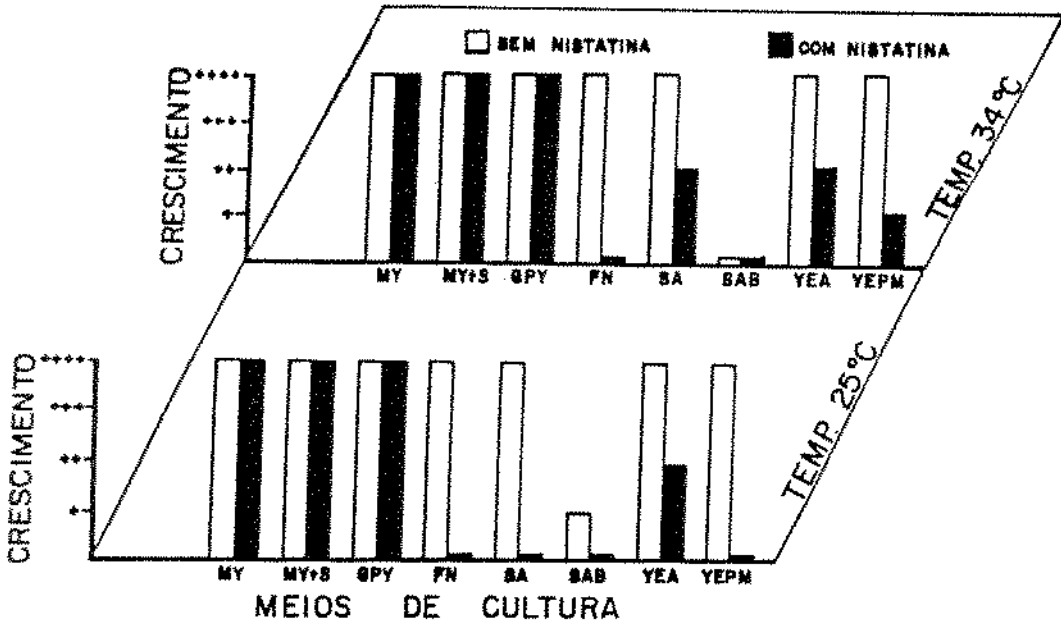


FIGURA 9 - Crescimento da amostra Bt-07 de *Paracoccidioides brasiliensis* em diferentes meios de cultura com e sem nistatina (20 U/ml), nas temperaturas de 34°C e 25°C.

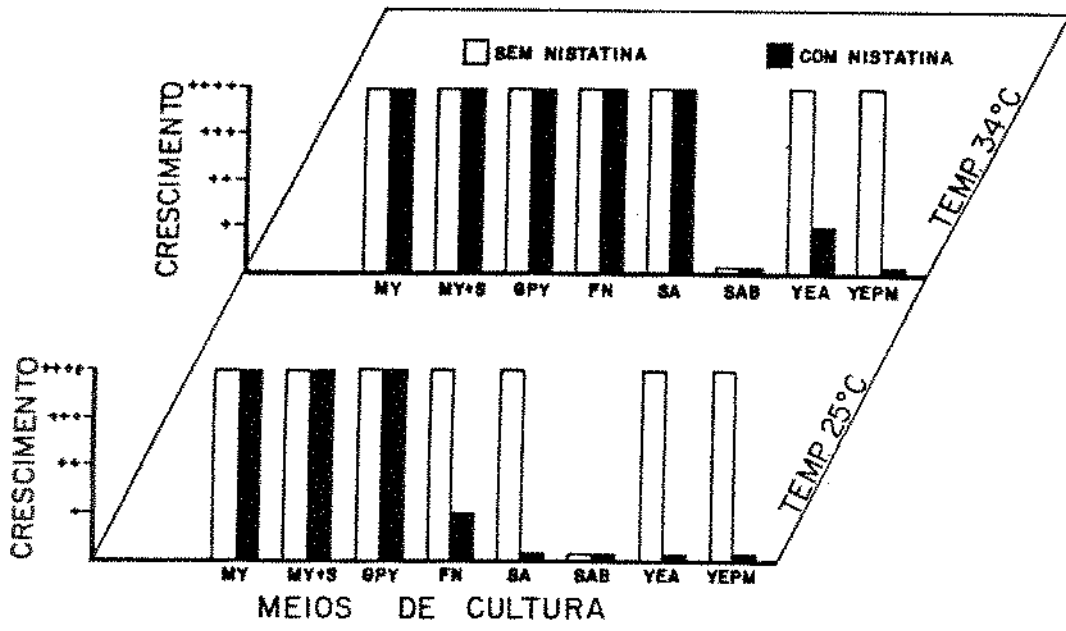


FIGURA 10 - Crescimento da amostra Bt-08 de *Paracoccidioides brasiliensis* em diferentes meios de cultura com e sem nistatina (20 U/ml), nas temperaturas de 34°C e 25°C.

do *P. brasiliensis* no SAB e SAB+N, embora o desenvolvimento no YEA e YEPM não tenha sido com a mesma intensidade dos outros meios de cultura. Nessa temperatura, pôde-se observar uma inibição parcial do crescimento no meio YEA+N e total no YEPM+N (Figura 12).

Em uma última etapa, foram realizados experimentos para avaliar a ação do cloranfenicol associado à nistatina, como descontaminantes, sobre o crescimento do *P. brasiliensis*, quando na presença da *C. albicans* (Tabelas XI e XII).

Quando submetido somente à ação prévia do cloranfenicol, à 34°C, o *P. brasiliensis* cresceu nos meios de cultura MY+S, GPY, YEA e YEPM com e sem nistatina, sendo que nos meios MY+S+N, YEA+N e YEPM+N o crescimento foi superior ao da levedura. À 25°C, o *P. brasiliensis* apresentou crescimento nos meios MY+S, MY+S+N, GPY, GPY+N, SA, SA+N, YEA, YEPM e YEPM+N. Porém, apenas nos meios MY+S+N, SA+N e YEPM+N pôde-se verificar inibição da *C. albicans*, de forma mais evidente em relação ao crescimento do *P. brasiliensis* (Figura 13).

O tratamento com cloranfenicol associado à nistatina interferiu, de maneira geral, sobre o crescimento de ambos os fungos em quase todos os meios de cultura, quando incubados à 34°C. Somente no YEPM houve menor desenvolvimento da *C. albicans*, quando comparado ao do *P. brasiliensis*, sendo que a levedura foi totalmente inibida pela presença da nistatina nesse mesmo meio. Por outro lado, tal tratamento permitiu que

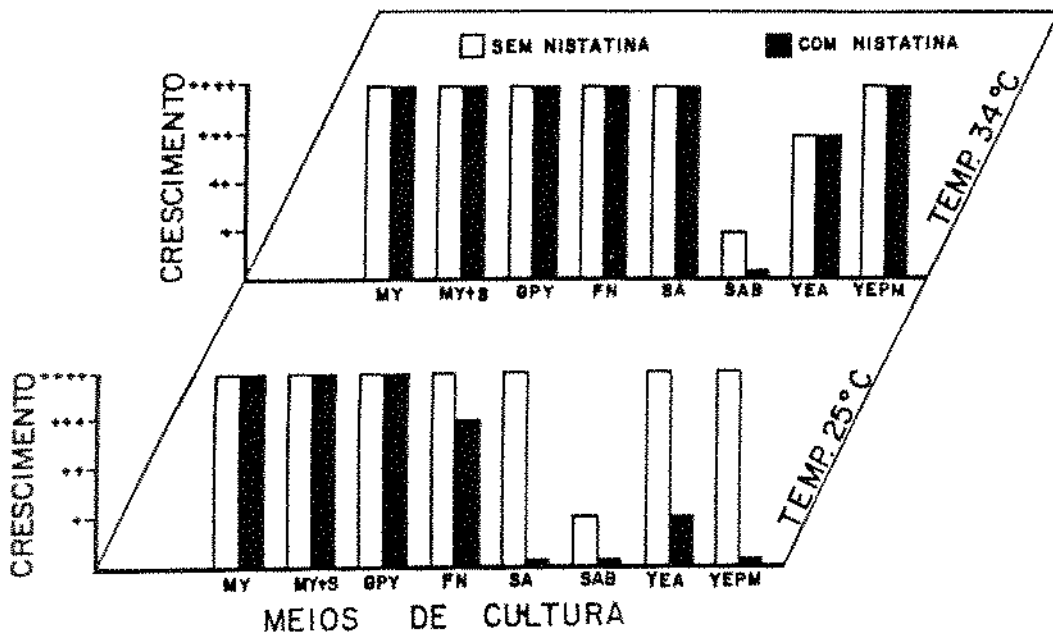


FIGURA 11 - Crescimento da amostra Bt-09 de *Paracoccidioides brasiliensis* em diferentes meios de cultura com e sem nistatina (20 U/ml), nas temperaturas de 34°C e 25°C.

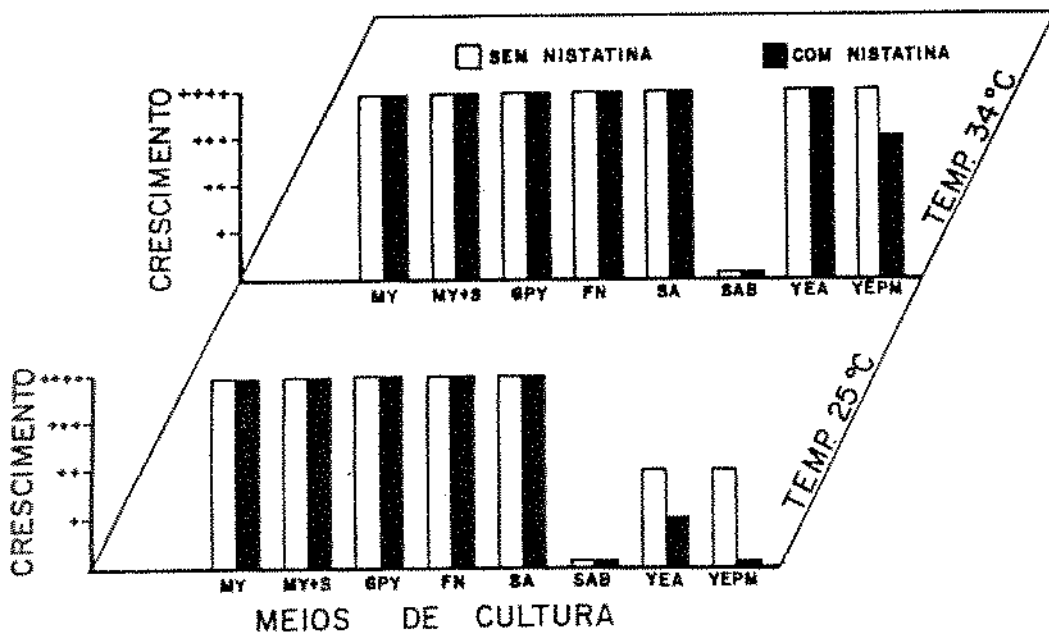


FIGURA 12 - Crescimento da amostra Bt-11 de *Paracoccidioides brasiliensis* em diferentes meios de cultura com e sem nistatina (20 U/ml), nas temperaturas de 34°C e 25°C.

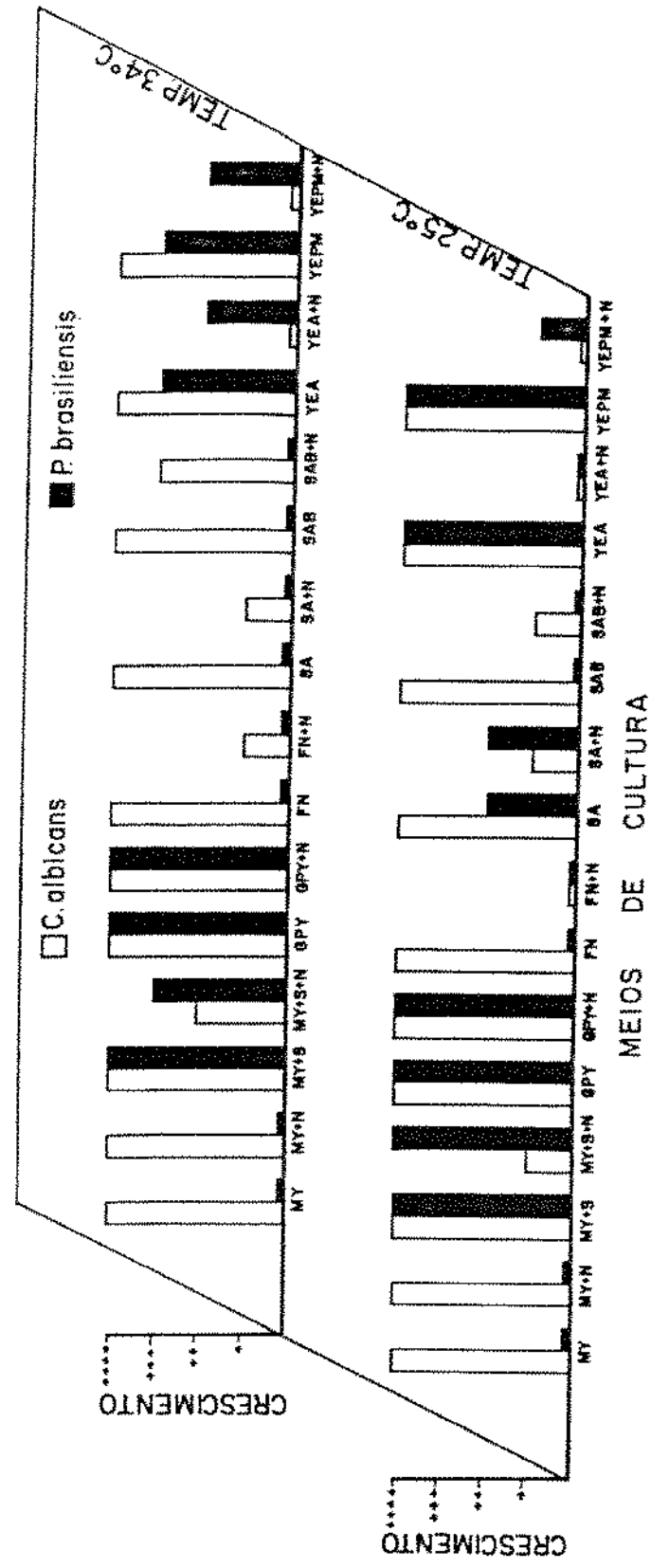


FIGURA 13 - Crescimento de *Paracoccidioides brasiliensis* (Bt-07) e *Candida albicans* (E-1), em diferentes meios de cultura com e sem nistatina (20 U/ml), nas temperaturas de 34°C e 25°C, após descontaminação com cloranfenicol (100 µg/ml).

o *P. brasiliensis* tivesse crescimento bem mais acentuado que o da levedura, à temperatura de 25°C. Havendo, inclusive, inibição total da *C. albicans* nos meios YEA e YEPM praticamente sem afetar o crescimento do *P. brasiliensis* (Figura 14).

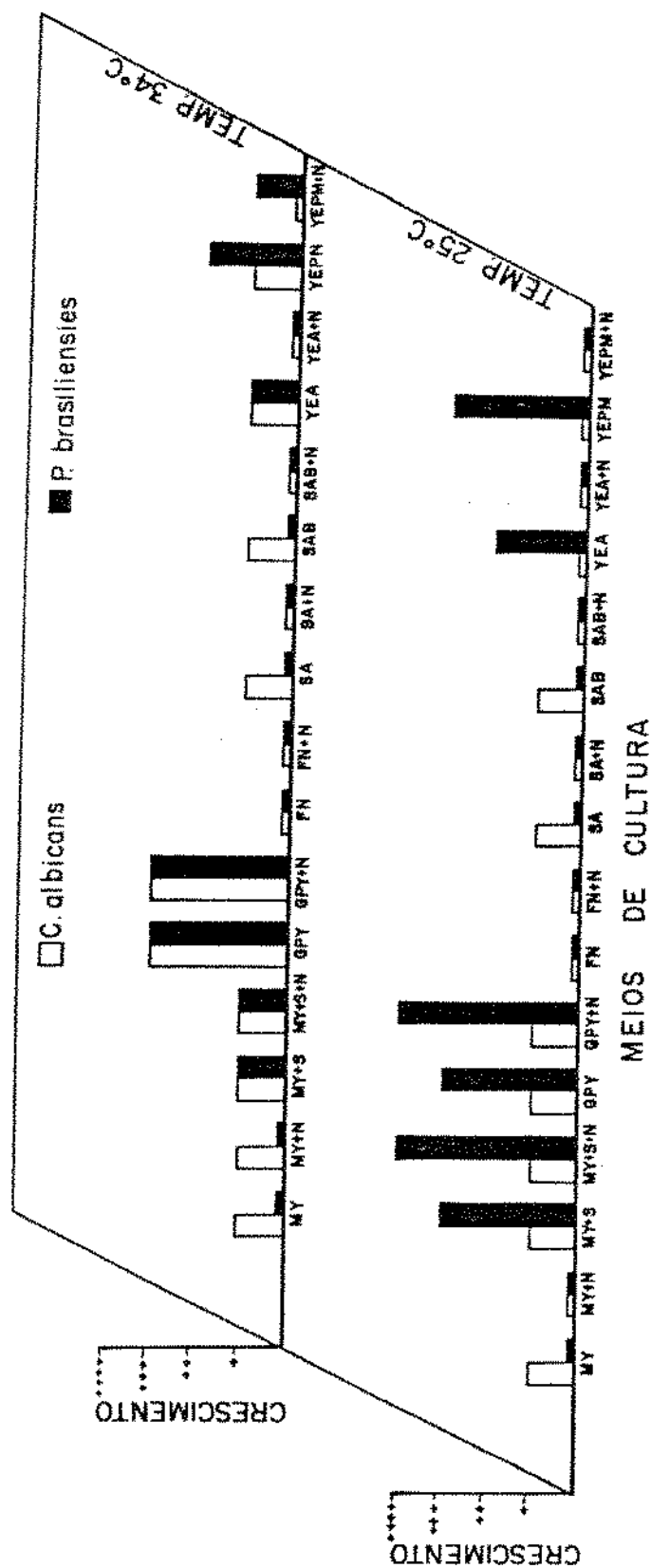


FIGURA 14 - Crescimento de *Paracoccidioides brasiliensis* (Bt-07) e *Candida albicans* (E-1), em diferentes meios de cultura com e sem nistatina (20 U/ml), nas temperaturas de 34°C e 25°C, após descontaminação com cloranfenicol (100 µg/ml) associado à nistatina (20 U/ml).

D I S C U S S Ã O

Considerando que a paracoccidioidomicose representa um problema de grande importância em termos de patologia infecciosa no Brasil, produzida por fungos que atingem as vias respiratórias e cutâneo-mucosas (MACHADO FILHO & MIRANDA, 1960; SARAVIA e cols., 1965; RESTREPO e cols., 1970; LONDERO & RAMOS, 1972; GIRALDO e cols., 1976; LONDERO e cols., 1978) e frente às dificuldades apresentadas no isolamento do seu agente etiológico, o *P. brasiliensis*, o presente trabalho procurou desenvolver uma metodologia adequada para tal fim.

O diagnóstico laboratorial da paracoccidioidomicose pode ser realizado através do exame microscópico, com demonstração do *P. brasiliensis* e, também, por cultivo dos materiais clínicos. Embora o diagnóstico micológico dessa afecção seja relativamente fácil, o isolamento de seu agente etiológico de determinados materiais clínicos, apresenta certo grau de dificuldade, devido a presença de flora contaminante. Um dos principais materiais examinados no diagnóstico da paracoccidioidomicose pulmonar é o escarro, no qual a presença de leveduras pode dificultar o isolamento do *P. brasiliensis* (ANGEL e cols., 1955; MIRANDA & MACHADO FILHO, 1959; RESTREPO & CORREA, 1972).

Analisando os escarros de pacientes em estudo (Tabela II) pode-se verificar que das espécies encontrados, a

C. albicans apresenta-se com predominância sobre as demais, atingindo 82,4% do total das amostras, o que é concordante com os dados encontrados na literatura (HELMS, 1956; ARMSTRONG & HALL, 1956; KAPICA & CLIFFORD, 1968).

Segundo KAPICA e cols. (1968), a presença de *C. albicans* em quantidade muito pequena, de apenas 10 (dez) colônias, é suficiente para inibir totalmente o crescimento de 50.000 colônias de *Histoplasma capsulatum*, quando inoculados em meio de ágar Sabouraud. A inibição do crescimento de *H. capsulatum* por *C. albicans*, além de ter sido observada repetidamente por esses autores, já havia sido relatada em escarro, por BURNS & LARSCH (1962). Para RESTREPO & CORREA (1972), um mecanismo similar poderia ocorrer em relação ao *P. brasiliensis*.

A nistatina, droga de atividade fungistática e fungicida, foi escolhida uma vez que seu espectro de ação está mais direcionado como inibidora do desenvolvimento de leveduras, principalmente as do gênero *Candida*. Embora o *P. brasiliensis* seja um fungo dimórfico, apresentando uma fase leveduriforme, a nistatina não possui a mesma potencialidade de inibição sobre o crescimento desse fungo.

Procurando estabelecer a concentração de nistatina mais adequada para inibir o crescimento das leveduras, mas que não atuasse sobre o *P. brasiliensis*, foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) para as amostras de leveduras isoladas do escarro e amostras de *P. brasiliensis*. Como in

dicado na Tabela V, a concentração de 20 U de nistatina/ml mostrou-se capaz de inibir 100% das amostras de leveduras, sem afetar as de *P. brasiliensis*. Os resultados de CIM de nistatina para as leveduras são compatíveis com aqueles encontrados por SMITH e cols. (1975), SEGUELA e cols. (1980) e NOBRE e cols. (1981), cujos valores de CIM de nistatina para leveduras está ao redor de 15 U/ml, que inibiu a maioria das amostras.

Em relação ao *P. brasiliensis*, HAZEN & BROWN (1951) demonstraram em seu trabalho que a CIM de nistatina para o fungo é de 4,36 U/ml, o que, evidentemente, é bem inferior às concentrações verificadas no presente estudo, que variaram de 30 a 70 U de nistatina/ml (Tabela VI). Portanto, diante desses resultados, em que a concentração de 20 U de nistatina/ml inibe totalmente o crescimento das leveduras, mas permitindo, ainda, que o *P. brasiliensis* possa se desenvolver, tal concentração da droga foi empregada na preparação dos meios de cultura utilizados no isolamento do fungo.

Como o desenvolvimento do *P. brasiliensis* é afetado pela temperatura, os experimentos foram conduzidos a 25°C e 34°C, no entanto este fator atuou, também, sobre a atividade da nistatina. A 25°C, a droga teve maior eficiência em inibir o crescimento das leveduras (Tabelas VII e VIII), concordando com as observações de SHADOMY & ESPINEL-INGROFF (1982), os quais relataram uma diminuição de atividade da nistatina, quando empregada em temperaturas superiores a 30°C.

O comportamento das leveduras, nos diferentes meios de cultura, variou de acordo com a espécie, sendo que somente alguns meios atuaram de forma mais generalizada na inibição do crescimento. No meio YEA, com e sem nistatina houve impedimento do crescimento de quase todas as amostras, com exceção da *C. albicans*, que se desenvolveu a 34°C (ver Figura 3). Estes achados são concordantes com a citação de RESTREPO & CORREA (1972), que utilizando o mesmo meio, também, verificaram haver impedimento no desenvolvimento das leveduras, provavelmente devido à falta de fontes de carbono. Outro meio de cultura que se mostrou eficiente em inibir o crescimento das leveduras, em ambas as temperaturas, foi o YEPM adicionado de nistatina (Tabelas VII e VIII). A influência desse meio deve estar relacionado com sua composição, uma vez que além da escassez de fontes de carbono, o tampão fosfato pode afetar o crescimento das espécies de *Candida* (KAPICA e cols., 1968), e também pelas alterações de pH (SMITH & GOODMAN, 1975) produzidas pela presença de hidróxido de amônio.

Os meios MY e MY+S que inibem muitos fungos, sejam saprófitas ou patogênicos, pela presença do antibiótico cicloheximide (actidione) em sua constituição, impediram o crescimento de algumas espécies em estudo, como a *C. pseudotropicalis* e a *C. guilliermondii*. Esses dados diferem dos encontrados por LACAZ (1980), que considera essas espécies resistentes ao cicloheximide, porém é pertinente no que se refere à *C. albicans* que se desenvolveu nesses dois meios de cultura.

Por outro lado, com o meio GPY pode-se observar que não ocorreu inibição do crescimento da maior parte das espécies de leveduras, mesmo quando se adicionou a nistatina, com exceção da *C. albicans* e *C. tropicalis*, que foram inibidas à 25°C.

Como a *C. albicans* é a principal espécie presente no escarro, torna-se importante analisar o seu comportamento em diferentes meios de cultura. Pela Figura 3 pode-se evidenciar que os meios FN, SA, SAB e YEA adicionados de nistatina foram mais eficazes em inibir o crescimento dessa espécie. Pode-se verificar, ainda, que a inibição foi mais acentuada à 25°C, quando a levedura desenvolveu-se em apenas um dos meios com nistatina, que é o MY+N.

Nos experimentos relacionados ao *P. brasiliensis*, pode-se observar que o crescimento sofre inibição em alguns meios de cultura contendo nistatina e de forma mais ampla, à temperatura de 25°C. As quatro cepas testadas apresentam uma certa heterogeneidade em relação ao crescimento nos diferentes meios de cultura, como pode ser visto pelas Figuras 9, 10, 11 e 12; fato este que poderia ser esperado, conforme as observações de GOIHMAN-YAHR e cols. (1980). No entanto, o crescimento do fungo nos meios MY, MY+S e GPY, contendo ou não nistatina, foi similar para todas as amostras, independentemente da temperatura de incubação.

Embora o meio de cultura SAB, seja o mais utili-

zado em Micologia para o cultivo e isolamento de fungos patogênicos (LONDERO & RAMOS, 1972; ASCONEGUY e cols., 1982), este não permitiu um desenvolvimento adequado das amostras de *P. brasiliensis*. Inclusive impediu o crescimento de duas amostras (Bt-08 e Bt-11), mesmo sem nistatina, em ambas as temperaturas. Esse fato, já havia sido observado por MIRANDA & MACHADO FILHO (1959), que obtiveram baixa freqüência de isolamento de *P. brasiliensis* do escarro no meio SAB, principalmente quando comparada aos resultados descritos por RESTREPO e cols. (1970), que utilizaram os meios MY, MY+S e BHI e por ASCONEGUY e cols. (1982), usando YEA e BHI.

Embora tenha sido determinada, experimentalmente, que a concentração de 20 U de nistatina/ml era suficiente para inibir 100% das leveduras, quando a droga foi adicionada aos diferentes meios de cultura, não teve a atuação esperada, pois permitiu que, ainda houvesse crescimento das leveduras e também, inibiu parcialmente o *P. brasiliensis*. Assim, procurou-se avaliar a possibilidade de utilizar a nistatina como agente descontaminante, submetendo-se os fungos à ação prévia da droga, para então serem semados nos meios de cultura em estudo. A utilização do cloranfenicol baseou-se no fato de que este antibiótico antibacteriano é comumente empregado no isolamento de fungos, que podem ter o seu crescimento inibido por bactérias.

Para comparar os tratamentos prévios com cloranfenicol e cloranfenicol associado à nistatina, utilizou-se uma amostra de *P.*

brasiliensis (Bt-07) em presença da *C. albicans*, que é a espécie de levedura mais freqüente no escarro. Pode-se observar que no tratamento com cloranfenicol e nistatina houve redução acentuada no crescimento dos dois fungos, em quase todos os meios de cultura. No entanto, à 25°C verifica-se que o *P. brasiliensis* apresentou crescimento superior ao da *C. albicans* nos meios MY+S, MY+S+N, GPY, GPY+N, YEA e YEPM, inclusive, ocorrendo inibição total da levedura nos dois últimos (Figura 14).

De acordo com KAPICA e cols. (1968), a presença de algumas colônias de leveduras pode inibir grande quantidade de *H. capsulatum*. Portanto, torna-se bastante sugestivo que a recuperação mais intensa do *P. brasiliensis*, na temperatura de 25°C, como mostrado na Figura 14, deve-se ao tratamento prévio com cloranfenicol e nistatina que atuou sobre a *C. albicans*, inibindo seu crescimento e permitindo, assim, o desenvolvimento do *P. brasiliensis*.

RESTREPO & CORREA (1972) mostram que o meio de cultura YEA proporcionou condições mais adequadas do que o MY para isolamento do *P. brasiliensis* a partir do escarro, porém dados encontrados em outra citação de RESTREPO & CANO (1981) não confirmam essa comparação. No presente trabalho, fazendo-se uma avaliação dos meios de cultura, pode-se verificar que o YEA realmente comportou-se de forma mais favorável que o MY no desenvolvimento do *P. brasiliensis*. Porém, este último meio adicionado de sangue, constituindo o MY+S, permitiu que o crescimento do fungo, mesmo na presença da *C. albicans*, fosse

superior ao YEA e com maior evidência, ainda, quando se acrescenta nistatina.

Embora SHORIN & GOL'DBERG (1959) tenham relatado que a nistatina tem sua atividade reduzida pela metade, quando colocada em meios de cultura contendo 50% de soro, HAZEN & BROWN (1951) afirmam que essa droga não sofre alterações na presença de soro ou sangue desfibrinado de cavalo. Portanto, os resultados apresentados na Figura 14 são concordantes com estes últimos autores, uma vez que a nistatina manteve a capacidade de inibir o crescimento da *C. albicans*, na presença de sangue, como ocorreu no meio MY+S.

Em relação ao meio YEPM, empregado por SMITH & GOODMAN (1975) para isolamento de *H. capsulatum* e *B. dermatitidis*, foi possível constatar que o mesmo, também, se mostrou eficiente para isolar o *P. brasiliensis* em presença de leveduras. Tais dados diferem dos encontrados por RESTREPO & CANO (1981) que obtiveram baixa recuperação do *P. brasiliensis*, provavelmente por não ter utilizado solução tampão fosfato para manutenção do pH do meio de cultura. Da mesma forma, o GPY propiciou condições para que o *P. brasiliensis* se desenvolvesse com maior intensidade que a *C. albicans*, após tratamento com cloranfenicol e nistatina, quando incubados a 25°C.

Em uma análise global dos resultados obtidos, pode-se observar que, a nistatina foi extremamente eficiente sobre as leveduras quando se verificou as concentrações inibitô

rias mínimas e, em menor grau, quando associada ao cloranfenicol, para ser utilizada como agente descontaminante. Porém, a droga quando adicionada aos meios de cultura, na concentração de 20 U/ml, não apresentou o mesmo efeito inibitório sobre as leveduras. Pode-se verificar, também, que o crescimento do *P. brasiliensis* ocorreu na maioria dos meios analisados, mas em alguns deles, a presença da *C. albicans* e da nistatina dificultaram a sua recuperação.

Apesar de que o isolamento do agente etiológico da paracoccidioidomicose apresente inúmeras dificuldades, no presente estudo foi possível obter uma recuperação satisfatória do *P. brasiliensis* em alguns dos meios de cultura utilizados, quando incubados à temperatura de 25°C e empregando-se a nistatina como agente descontaminante.

SUMÁRIO E CONCLUSÕES

A paracoccidioidomicose é uma moléstia infecciosa causada por um fungo patogênico, *Paracoccidioides brasiliensis*, que tem merecido muita atenção no Brasil, especialmente no Estado de São Paulo, onde é considerada endêmica. Do ponto de vista micológico, as maiores dificuldades para se estudar o agente etiológico dessa moléstia, são encontradas no isolamento do *P. brasiliensis*. Esse fungo patogênico, normalmente, é obtido a partir de amostras clínicas que estão contaminadas por outros tipos de microrganismos, cujo crescimento mais acelerado impede a recuperação do *P. brasiliensis*.

Com a finalidade de avaliar as condições que possibilitem a melhor recuperação do fungo, utilizou-se a nistatina para inibição de leveduras contaminantes, que foi adicionada a 8 (oito) meios de cultura diferentes, incubados às temperaturas de 25°C e 34°C. Em uma segunda etapa, a nistatina foi associada ao cloranfenicol, para ser empregada como agente descontaminante, numa tentativa de eliminar as leveduras, em tratamento prévio à inoculação do fungo nos meios de cultura.

Quando a nistatina foi adicionada aos meios de cultura, na concentração de 20 U/ml, não teve a eficiência esperada, permitindo que houvesse crescimento de algumas espécies de *Candida* e inibindo parcialmente o *P. brasiliensis*. A associação da nistatina ao cloranfenicol, em tratamento prévio co

mo descontaminante, permitiu melhor recuperação do *P. brasiliensis* na presença de leveduras, em 4 (quatro) dos meios de cultura estudados.

Pela análise dos resultados obtidos no presente trabalho, as seguintes conclusões podem ser inferidas:

- 1 - A nistatina adicionada aos meios de cultura, apresentou maior atividade inibitória tanto para as espécies de *Candida* como para as amostras de *P. brasiliensis*, quando incubadas à temperatura de 25°C.
- 2 - A concentração de 20 U de nistatina/ml de meio de cultura, capaz de inibir 100% das amostras de *Candida*, não manifestou o mesmo grau de inibição sobre esses microrganismos, quando foi adicionada aos meios de cultura.
- 3 - A presença de nistatina nos meios de cultura apresentou efeito inibitório sobre o desenvolvimento das amostras de *P. brasiliensis* em alguns dos meios de cultura em estudo.
- 4 - A nistatina associada ao cloranfenicol, utilizada como descontaminante, permitiu que houvesse melhor recuperação do *P. brasiliensis* em presença da *C. albicans*, à temperatura de 25°C.
- 5 - Os meios de cultura MY+S, MY+S+N, GPY, GPY+N, YEA e YEPM

favorecem o crescimento do *P. brasiliensis*, de forma mais acentuada que da *C. albicans*, após o tratamento com nistatina associada ao cloranfenicol.

S U M M A R Y

Paracoccidioidomycosis, an infectious disease induced by the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* has drawn a great deal of attention in Brazil, specially in the State of São Paulo, where the infection is endemic.

The major difficulty in studying this disease, by the mycological view point, is related to the ethiological agent isolation usually provided from clinical samples, which are always contaminated other kinds of microorganisms, whose accelerated growth impedes recuperation from *P. brasiliensis*.

With the purpose of evaluating the conditions which possibilitate a better recuperation from the fungus, nistatyn was used as inhibitor of contaminant yeasts. The nistatyn was added to eight different culture media that in counterpart were incubated at 25°C and 34°C temperatures, to make possible the conditions for the best fungus recuperation. In a second study, previously to the inoculation into the culture media the fungus sample was treated with the nistatin associated to the chloramphenicol as decontaminant agent, in an attempt to eliminate the yeast contamination.

The nistatyn added to the culture media did not show the expected result, allowing the growth of some *Candida* species and the partial inhibition of the *P. brasiliensis*. On

the other hand, the chloramphenicol and nistatyn used together as a decontaminant agent in previous treatment, enhanced a better *P. brasiliensis* recuperation in four of the culture media studied.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

AHEARN, D.G. Medically important yeasts. Ann. Rev. Microbiol., 32:59-68, 1978.

AJELLO, L. Cultural methods for human pathogenic fungi. J. chron. Dis., 5:545-51, 1957.

ANGEL, H.D.; CORTÉS, C.G.; RAMIREZ, J.M.M. Contribucion al estudio de la blastomicosis suramericana em Colombia. Estudio anatomopatológico y micológico. An. Soc. Biol. (Bogotá), 7: 1-19, 1955.

ARMSTRONG, E.C. & HALL, J.A. The incidence of *Candida* species in routine specimens of sputum. Mth. Bull. Minist. Hlth. Lab. Serv., 15:220-4, 1956.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Comissão de Estudos de Documentação. Referências bibliográficas; NB-66. In: _____ . Normas ABNT sobre documentação. Rio de Janeiro, 1978. p.13-30.

WORLD medical periodicals. 3.ed. London, World Medical Association, 1961. 407p.

WORLD medical periodicals. Supplement of 3.ed. London, World Medical Association, 1968. 68p.

ASCONEGUY, F.R.; BONASSE, J.; CALEGARI, L.F.; CONTI DIAZ, I.A.

Paracoccidioidomycosis; a proposito de 3 nuevos casos nacionales. Mycopathologia (Den Haag), 78:155-9, 1982.

ATHAR, M.A. & WINNER, H.I. The development of resistance by

Candida species to polyene antibiotics in vitro. J. med. Microbiol., 4:505-17, 1971.

BAPTISTA, G. Estudo de leveduras em fezes diarreicas e não

diarreicas. São Paulo, 1981. 85p. (Tese - Mestrado - Escola Paulista de Medicina).

BEIJERINCK, M.W. L'auxanographie, on la méthode de l'hydro

diffusion dans la gelatine appliquée aux recherches microbiologiques. Arch. nederl. Sci., 23:367-72, 1889.

BRILLIANDE, T.W.; HOLLICK, G.E.; LARSH, H.W. The efficacies

of common dyes in primary isolation media for recovery of pathogenic fungi. Am. J. Clin. Pathol., 72:868-70, 1979.

BURNS, J. & LARSH, H.W. Selective isolation of *Histoplasma*

capsulatum in presence of *Candida* ssp. Bact. Proc., 62:66, 1962.

CAMPOS, C.E.O.P. Resistência de *Candida albicans* a nistatina

e anfotericina B. Alterações no crescimento de mutantes resistentes. Botucatu, 1973. 88p. (Tese - Doutorado - Faculdade Paulista de Medicina).

culdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu).

CASTRILLON, A.L. & MINAMI, P.S. Resistência do *Paracoccidioides brasiliensis* "in vitro", à anfotericina B. Rev. Microbiol., 2:93-6, 1971.

COMSTOCK, G.W.; PALMER, C.E.; STONE, R.W.; GOODMAN, N.L. Fungi in the sputum of normal men. Mycopathologia (Den Haag), 54: 55-62, 1974.

DEL NEGRO, G.; LACAZ, C.S.; FIORILLO, A.M. Paracoccidioidomicose; blastomicose sul-americana. São Paulo, Sarvier; EDUSP, 1982. 283p.

FAVA NETTO, C. & RAPHAEL, A. A reação intradérmica com polisacáride de *Paracoccidioides brasiliensis* na blastomicose sul-americana. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, 3:161-5, 1961.

GEORG, L.K.; AJELLO, L.; PAPPAGEORGE, C. Use of cycloheximide in the selective isolation of fungi pathogenic to man. J. Lab. clin. Med., 44:422-8, 1954.

GERVASI, J.P. & MILLER, N.G. Recovery of *Cryptococcus neoformans* from sputum using new technics for the isolation of fungi from sputum. Amer. J. clin. Path., 63:916-20, 1975.

GIRALDO, R.; RESTREPO, A.; GUTIERREZ, F.; ROBLEDO, M.; LONDOÑO,

F.; HERNÁNDEZ, H.; SIERRA, F.; CALLE, G. Pathogenesis of paracoccidioidomycosis: a model based on the study of 46 patients. Mycopathologia (Den Haag), 58:63-70, 1976.

GOIHMAN-YAHR, M.; PINE, L.; ALBORNOZ, M.C.; YARZABAL, L.; DE GOMEZ, M.H.; SAN MARTIN, B.; OCANTO, A.; MOLINA, T.; CONVIT, J. Studies on plating efficiency and estimation of viability of suspensions of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells. Mycopathologia (Den Haag), 71:73-83, 1980.

GREER, D.L. & RESTREPO, A. La epidemiología de la paracoccidioidomycosis. Bol. Ofic. sanit. panamer., 82:428-47, 1977.

HAZEN, E.L. & BROWN, R. Fungicidin, an antibiotic produced by a soil actinomycete. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 76:93-7, 1951.

HELMS, P. The occurrence of *Candida albicans* in sputum in Denmark. J. clin. Path., 9:372-3, 1956.

ILUKEWITSCH, A. & RUEHS, G.A. Experimentos fungistáticos "in vitro" con 71 distintos productos químicos. Nuevas sustancias inhibidoras para los hongos; *Histoplasma capsulatum* - Darling (1906) y *Elastomyces brasiliensis* - Conant y Howell (1941). Rev. Sanit. Asist. soc., 20:339-65, 1955.

- KAPICA, L. & CLIFFORD, A. Quantitative determination of yeasts in sputum. Mycopathologia (Den Haag), 34:27-32, 1968.
- KAPICA, L.; SHAW, C.E.; BARTLETT, G.W. Inhibition of *Histoplasma capsulatum* by *Candida albicans* and other yeasts on Sabouraud's agar media. J. Bact., 95:2171-6, 1968.
- LACAZ, C.S. Candidíases. São Paulo, EDUSP, 1980. 190p.
- LACAZ, C.S. & MINAMI, P.S. Ação "in vitro" da sulfamida RO 4-4393 sobre o *Paracoccidioides brasiliensis*. Resultados preliminares. Hospital (Rio de J.), 64:603-7, 1963.
- LACAZ, C.S.; AZEVEDO, P.C.; BOLOGNANI, H. Novos meios de cultivo para o *Paracoccidioides brasiliensis*; nota prévia. Rev. paul. Med., 26:302, 1945.
- LITTMAN, M.L. A culture medium for the primary isolation of fungi. Science, 106:109-11, 1947.
- LITTMAN, M.L. Growth of pathogenic fungi on a new culture medium. Amer. J. clin. Path., 18:409-20, 1948.
- LODDER, J. The yeasts. A taxonomic study. 2.ed. Amsterdam, North Holland, 1970. 35-113p.

LONDERO, A.T. Epidemiologia da paracoccidioidomicose. J. Pneumol., 4:57-9, 1978.

LONDERO, A.T. & RAMOS, C.D. Paracoccidioidomycosis; a clinical and mycologic study of forty-one cases observed in Santa Maria RS, Brazil. Amer. J. Med., 52:771-5, 1972.

LONDERO, A.T. RAMOS, C.D.; LOPES, J.O.S. Progressive pulmonary paracoccidioidomycosis a study of 34 cases observed in Rio Grande do Sul (Brazil). Mycopathologia (Den Haag), 63:53-6, 1978.

LOPES, O.S.S. Descrição de uma técnica de concentração para pesquisa do *Paracoccidioides brasiliensis* no escarro. Hospital (Rio de J.), 47:557-66, 1955.

MACHADO FILHO, J. & MIRANDA, J.L. Considerações relativas à blastomicose sul-americana. Localizações. Sintomas iniciais. Vias de penetração e disseminação em 313 casos consecutivos. Hospital (Rio de J.), 58:99-137, 1960.

MACKINNON, J.E. Geographical distribution and prevalence of paracoccidioidomycosis. Pan Amer. Hlth Org. Sci. Publ., (254):45-52, 1972.

MARQUES, S.A.; FRANCO, M.F.; MENDES, R.P.; SILVA, N.C.A.;
BACCILI, C.; CURCELLI, E.D.; FERACIN, A.C.M.; OLIVEIRA, C.S.;

TAGLIARINI, J.V.; DILLON, N.L. Aspectos epidemiológicos da paracoccidiodomicose na área endêmica de Botucatu (São Paulo - Brasil). Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, 25:87-92, 1983.

MIRANDA, J.L. & MACHADO FILHO, J. Considerações relativas à blastomicose sul-americana. Análise do diagnóstico micológico em 261 casos consecutivos. Hospital (Rio de J.), 56:579-93, 1959.

MURAHOVSKI, J.; TRABULSI, L.R.; LACAZ, C.S. Investigação sobre a prevalência de *Candida albicans* nas fezes de crianças e sua participação na diarreia do latente. Rev. paul. Med., 76:1-16, 1970.

NEGRONI, P. & DAGLIO, C.A.N. Sobre la flora micológica de los esputos y su interpretación. Pren. méd. argent., 35:1450-6, 1948.

NEGRONI, P. & RODRIGUEZ, Z.J. Ensayos sobre la acción fungistática y fungicida del miconazol. Bol. Acad. Med. (B. Aires), 51:123-30, 1973.

NEIMESTER, R.P.; PATTERSON, N.T.; COCKLIN, J.H.; HARADA, G.F. The isolation of pathogenic fungi from sodium hydroxide-processed sputum specimens from patients suspected to have tuberculosis. Amer. J. clin. Path., 56:201-3, 1971.

NOBRE, G.; SOBRAL, T.; FERREIRA, A.F. In vitro susceptibility to 5-fluorocytosine and nystatin of common clinical yeast isolates. Mycopathologia (Den Haag), 73:39-41, 1981.

ODDS, F.C. *Candida* and Candidosis. Leicester; Leicester University Press, 1979. In: SKINNER, F.A.; PASSMORE, S.M.; DAVENPORT, R.R. Biology and activities of yeasts. New York, Academic Press, 1980. p.231-47.

OMIECZYNSKI, D.T.; SWATEK, F.E.; BECKER, S.W. A rapid method for the isolation of *Coccidioides immitis* from sputum. Hlth Lab. Sci., 2:35-9, 1965.

PANIKER, C.K.J.; KURUP, P.V.; INDIRA DEVI, K. Nystatin sensitivity of *Candida* strains. Indian J. med. Res., 51:846-50, 1963.

PEDROSO, M.C. Semi-anaerobic conditions in synthetic media as an important factor in the isolation of *Paracoccidioides brasiliensis*. Hospital (Rio de J.), 65:111-2, 1964.

POLONELLI, L. & MORACE, G. A microautomated dilution method for susceptibility testing with antifungal drugs. Mycopathologia (Den Haag), 86:21-8, 1984.

REEP, B.R. & KAPLAN, W. The effect of newer tubercle bacillus digestion and decontamination procedures on fungi causing

pulmonary diseases. Mycopathologia (Den Haag), 46:325-34, 1972a.

REEP, B.R. & KAPLAN, W. The use of N-acetyl-l-cysteine and dithiothreitol to process sputa for mycological and fluorescent antibody examination. Hlth Lab. Sci., 9:118-24, 1972b.

RESTREPO, A.M. & ARANGO, M.D. In vitro susceptibility testing of *Paracoccidioides brasiliensis* to sulfonamides. Antimicrob. Agents Chemother., 18:190-4, 1980.

RESTREPO, A. & CANO, L.E. Recovery of fungi from seeded sputum samples. Effect of culture media and digestion procedures. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, 23:178-84, 1981.

RESTREPO, M.A. & CORREA, R.I. Comparison of two culture media for primary isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from sputum. Sabouraudia, 10:260-5, 1972.

RESTREPO, A.; ROBLEDO, M.; GUTIERREZ, F.; SANCLEMENTE, M.; CASTAÑEDA, E.; CALLE, C. Paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis). A study of 39 cases observed in Medellín, Colômbia. Amer. J. trop. Med. Hyg., 19:68-76, 1970.

RESTREPO, A.; BEDOUT, C.; CANO, L.E.; ARANGO, M.D.; BEDOYA, V. Recovery of *Paracoccidioides brasiliensis* from a partially

- calcified lymph node lesion by microaerophilic incubation of liquid media. Sabouraudia, 19:295-300, 1981.
- SAMPAIO, S.A.P.; LACAZ, C.S.; BOLOGNANI FILHO, H. Ação do sulfisoxazol na blastomicose sul-americana. Rev. Ass. méd. bras., 2:33-6, 1955.
- SAN-BLAS, F.; SAN-BLAS, G.; INLOW, D. Dimorphism in *Paracoccidioides brasiliensis*. Zbl. Bakt., 8(Suppl.):23-8, 1980.
- SANFORD, L.V.; MASON, K.N.; HATHAWAY, B.M. The concentration of sputum for fungus culture. Amer. J. clin. Path., 44:172-6, 1965.
- SARAVIA, J.; POSADA, H.R.; JIMENEZ, M.A. Aspectos clínicos y de laboratorio de la blastomycosis sudamericana. Rev. Fac. Med. (Cartagena), 33:189-204, 1965.
- SEELIG, M.S. The role of antibiotics in the pathogenesis of *Candida* infections. Amer. J. Med., 40:887-917, 1966.
- SEGUELLA, J.P.; LEPARGNEUR, J.P.; SAVERES, C.; CAZAUX, M.; RISER, A.; LINAS, M.D. Antifungal antibiotic sensitivity testing: use of autobac 1 for standardization purposes. Mycopathologia (Den Haag), 72:13-6, 1980.

- SHADOMY, S. & ESPINEL-INGROFF, A. Pruebas de susceptibilidad con agentes antifungicos. In: LENNETTE, E.H.; BALLOWS, A.; HAUSLER, W.; TRUANT, I.P. Manual de microbiologia clinica. 3.ed. Buenos Aires, 1982, p.776-84.
- SHORIN, V.A. & GOL'DBERG, L.Y. The antifungus antibiotic nystatin and its clinical use. Int. Rec. Med., 172:310, 1959
- SMITH, A.G. & ROHDE, P.A. A new technique for isolating pathogenic fungi from mixed flora inocula. Mycopathologia (Den Haag), 47:105-20, 1972.
- SMITH, C.D. & GOODMAN, N.L. Improved culture method for the isolation of *Histoplasma capsulatum* and *Blastomyces dermatitidis* from contaminated specimens. Amer. J. clin. Path., 63:276-80, 1975.
- SMITH, R.F.; DAYTON, S.L.; BLASI, D.; CHIPPS, D.D. Incidence of yeasts and influence of nystatin on their control in a group of burned children. Mycopathologia (Den Haag), 55:115-20, 1975.
- SMITS, B.J.; PRIOR, A.P.; ARBLASTER, P.G. Incidence of *Candida* in hospital in patients and the effects of antibiotic therapy. Brit. med. J., 1:208-10, 1966.
- SOUZA, E.M.; LIMA, D.M.M.; CAVALCANTI, M.D.G.; SANTOS, M.J.

Isolamento e estudo de *Candida albicans* e actinomicetos encontrados na cavidade oral de crianças. Rev. Microbiol., 11:89-96, 1980.

SPLENDRE, A. Blastomycoses americanas. Bras. med., 24:155-57, 1910.

STEVENS, D.A. & PHUOC, T. Synergistic interaction of trimethoprim and sulfamethoxazole on *Paracoccidioides brasiliensis*. Antimicrob. Agents Chemother., 21:852-4, 1982.

TASCHDJIAN, C.L.; BURCHALL, J.J.; KOZINN, P.J. Rapid identification of *Candida albicans* by filamentation on serum and serum substitutes. Amer. J. Dis. Child., 99:212-5, 1960.

THOMPSON, D.W.; KAPLAN, W.; PHILLIPS, B.J. The effect of freezing and the influence of isolation medium on the recovery of pathogenic fungi from sputum. Mycopathologia (Den Haag), 61:105-9, 1977.

VAN DER WALT, J.P. Criteria and methods used in classification. In: LODDER, J. The yeasts. A taxonomic study. 2.ed. Amsterdam, North Holland, 1970. p.35-113.

A P Ê N D I C E

TABELA I - Proporções de solução de nistatina e de meio de cultura para se obter a concentração desejada da droga

Solução mãe (ml)	Concentração da solução mãe (U/ml)	Meio de cultura (ml)	Concentração final (U/ml)
0,2	100	19,8	1
0,4	100	19,6	2
0,8	100	19,2	4
1,2	100	18,8	6
1,6	100	18,4	8
2,0	100	18,0	10
0,4	1000	19,6	20
0,6	1000	19,4	30
0,8	1000	19,2	40
1,0	1000	19,0	50
1,2	1000	18,8	60
1,4	1000	18,6	70
1,6	1000	18,4	80
2,0	1000	18,0	100
2,5	1000	17,5	125
3,0	1000	17,0	150
0,4	10000	19,6	200
0,5	10000	19,5	250
0,6	10000	19,4	300
0,7	10000	19,3	350

TABELA II - Distribuição percentual das espécies de leveduras do gênero *Candida* isoladas de 57 (cinquenta e se te) amostras de escarro

E s p é c i e	Número de amostras	%
<i>Candida albicans</i>	47	82,4
<i>Candida krusei</i>	4	7,0
<i>Candida parapsilosis</i>	2	3,5
<i>Candida tropicalis</i>	2	3,5
<i>Candida guilliermondii</i>	1	1,8
<i>Candida pseudotropicalis</i>	1	1,8
T O T A L	57	100,0

TABELA III - Concentração inibitória mínima (CIM) de nistatina determinada para cada uma das espécies de leveduras isoladas de escarro

Amostra	Leveduras	C I M (Unidades de nistatina/ml)
E - 1	<i>Candida albicans</i>	8
E - 2	<i>Candida albicans</i>	20
E - 3	<i>Candida albicans</i>	10
E - 4	<i>Candida albicans</i>	20
E - 5	<i>Candida albicans</i>	8
E - 6	<i>Candida albicans</i>	20
E - 7	<i>Candida albicans</i>	20
E - 8	<i>Candida albicans</i>	20
E - 9	<i>Candida albicans</i>	8
E - 10	<i>Candida albicans</i>	20
E - 11	<i>Candida albicans</i>	8
E - 12	<i>Candida albicans</i>	10
E - 13	<i>Candida krusei</i>	10
E - 14	<i>Candida albicans</i>	20
E - 15	<i>Candida parapsilosis</i>	20
E - 16	<i>Candida parapsilosis</i>	6
E - 17	<i>Candida albicans</i>	10
E - 18	<i>Candida tropicalis</i>	6
E - 19	<i>Candida krusei</i>	20
E - 20	<i>Candida albicans</i>	10
E - 21	<i>Candida albicans</i>	20
E - 22	<i>Candida albicans</i>	20
E - 23	<i>Candida albicans</i>	10
E - 24	<i>Candida albicans</i>	8
E - 25	<i>Candida albicans</i>	10
E - 26	<i>Candida albicans</i>	10

continua

TABELA III - Continuação

Amostra	L e v e d u r a s	C I M (Unidades de nistatina/ml)
E - 27	<i>Candida albicans</i>	20
E - 28	<i>Candida albicans</i>	10
E - 29	<i>Candida albicans</i>	20
E - 30	<i>Candida pseudotropicalis</i>	10
E - 31	<i>Candida guilliermondii</i>	10
E - 32	<i>Candida albicans</i>	10
E - 33	<i>Candida albicans</i>	10
E - 34	<i>Candida albicans</i>	20
E - 35	<i>Candida albicans</i>	10
E - 36	<i>Candida albicans</i>	20
E - 37	<i>Candida albicans</i>	20
E - 38	<i>Candida krusei</i>	10
E - 39	<i>Candida albicans</i>	20
E - 40	<i>Candida albicans</i>	20
E - 41	<i>Candida albicans</i>	20
E - 42	<i>Candida albicans</i>	10
E - 43	<i>Candida albicans</i>	8
E - 44	<i>Candida tropicalis</i>	10
E - 45	<i>Candida albicans</i>	10
E - 46	<i>Candida albicans</i>	10
E - 47	<i>Candida albicans</i>	10
E - 48	<i>Candida albicans</i>	10
E - 49	<i>Candida albicans</i>	10
E - 50	<i>Candida albicans</i>	10
E - 51	<i>Candida albicans</i>	10
E - 52	<i>Candida albicans</i>	10
E - 53	<i>Candida albicans</i>	10
E - 54	<i>Candida albicans</i>	10
E - 55	<i>Candida albicans</i>	10
E - 56	<i>Candida albicans</i>	10
E - 57	<i>Candida krusei</i>	20

TABELA IV - Distribuição das espécies de leveduras, isoladas de escarro, de acordo com as concentrações inibitórias mínimas (CIM) de nistatina

Espécies de leveduras	Número de amostras	C I M (Unidades de nistatina/ml)			
		6	8	10	20
<i>Candida albicans</i>	47	-	6	24	17
<i>Candida krusei</i>	4	-	-	2	2
<i>Candida parapsilosis</i>	2	1	-	-	1
<i>Candida tropicalis</i>	2	1	-	1	-
<i>Candida guilliermondii</i>	1	-	-	1	-
<i>Candida pseudotropicalis</i>	1	-	-	1	-
T O T A L	57	2	6	29	20
%	100	3,5	10,5	50,9	35,1

TABELA V - Porcentagem cumulativa das amostras de leveduras inibidas por diferentes concentrações de nistatina

C I M (Unidades de nistatina/ml)	Número de amostras	Porcentagem cumulativa (%)
6	2	3,5
8	8	14,0
10	37	64,9
20	57	100,0

TABELA VI - Concentração inibitória mínima (CIM) de nistatina para cada uma das 11 (onze) amostras de *Paracoccidioides brasiliensis* isoladas de pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP

Amostras	C I M (Unidades de nistatina/ml)
Bt-02	50
Bt-03	60
Bt-04	50
Bt-07	50
Bt-08	40
Bt-09	30
Bt-11	70
Bt-21a	30
Bt-21b	60
Bt-23b	40
Bt-31	50

TABELA VII - Avaliação semi-quantitativa do crescimento das espécies de *Candida*, isoladas de escarro, em diferentes meios de cultura com e sem nistatina (20 U/ml), à temperatura de 34°C

Meios de cultura	Espécies de <i>Candida</i>						
	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. pseudotropicalis</i>	<i>C. guilliermondii</i>	
MY	4+	-	-	4+	-	-	-
MY+N	4+	-	-	4+	-	-	-
MY+S	4+	-	-	4+	-	-	-
MY+S+N	4+	-	-	3+	-	-	-
GPY	4+	4+	4+	3+	4+	4+	4+
GPY+N	4+	-	4+	3+	4+	4+	4+
FN	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
FN+N	-	-	-	-	4+	4+	1+
SA	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
SA+N	-	-	-	-	4+	4+	-
SAB	4+	4+	4+	3+	4+	4+	4+
SAB+N	-	-	4+	-	-	-	-
YEA	4+	-	-	-	-	-	-
YEA+N	4+	-	-	-	-	-	-
YEM	4+	-	4+	4+	-	-	-
YEM+N	-	-	-	-	-	-	-

TABELA VIII - Avaliação semi-quantitativa do crescimento das espécies de *Candida*, isoladas de escarro, em diferentes meios de cultura com e sem nistatina (20 U/ml), à temperatura de 25°C

Meios de cultura	Espécies de <i>Candida</i>					
	<i>C.albicans</i>	<i>C.krusei</i>	<i>C.parapsilosis</i>	<i>C.tropicalis</i>	<i>C.pseudotropicalis</i>	<i>C.guilliermondii</i>
MY	4+	-	-	4+	-	-
MY+N	4+	-	-	4+	-	-
MY+S	4+	-	-	4+	-	-
MY+S+N	-	-	-	-	-	-
GPY	4+	4+	4+	3+	4+	4+
GPY+N	-	4+	4+	-	4+	4+
FN	4+	4+	4+	3+	4+	4+
FN+N	-	-	-	-	4+	-
SA	4+	4+	4+	4+	4+	4+
SA+N	-	-	-	-	-	-
SAB	4+	3+	4+	3+	4+	4+
SAB+N	-	3+	-	-	-	-
YEA	-	-	-	-	-	-
YEA+N	-	-	-	-	-	-
YEPM	-	-	4+	3+	-	-
YEPM+N	-	-	-	-	-	-

TABELA IX - Avaliação semi-quantitativa do crescimento de quatro amostras de *Paracoccidioides brasiliensis*, em diferentes meios de cultura com e sem nistatina (20 U/ml), à temperatura de 34°C

Meios de cultura	Amostras de <i>P. brasiliensis</i>			
	Bt-07	Bt-08	Bt-09	Bt-11
MY	4+	4+	4+	4+
MY+N	4+	4+	4+	4+
MY+S	4+	4+	4+	4+
MY+S+N	4+	4+	4+	4+
GPY	4+	4+	4+	4+
GPY+N	4+	4+	4+	4+
FN	4+	4+	4+	4+
FN+N	-	4+	4+	4+
SA	4+	4+	4+	4+
SA+N	2+	4+	4+	4+
SAB	-	-	1+	-
SAB+N	-	-	-	-
YEA	4+	4+	3+	4+
YEA+N	2+	1+	3+	4+
YEPM	4+	4+	4+	4+
YEPM+N	1+	-	4+	3+

TABELA X - Avaliação semi-quantitativa do crescimento de quatro amostras de *Paracoccidioides brasiliensis*, em diferentes meios de cultura com e sem nistatina, à temperatura de 25°C

Meios de cultura	Amostras de <i>P. brasiliensis</i>			
	Bt-07	Bt-08	Bt-09	Bt-11
MY	4+	4+	4+	4+
MY+N	4+	4+	4+	4+
MY+S	4+	4+	4+	4+
MY+S+N	4+	4+	4+	4+
GPY	4+	4+	4+	4+
GPY+N	4+	4+	4+	4+
FN	4+	4+	4+	4+
FN+N	-	1+	3+	4+
SA	4+	4+	4+	4+
SA+N	-	-	-	4+
SAB	1+	-	1+	-
SAB+N	-	-	-	-
YEA	4+	4+	4+	2+
YEA+N	2+	-	1+	1+
YEPM	4+	4+	4+	2+
YEPM+N	-	-	-	-

TABELA XI - Avaliação do processo de descontaminação com clo₂ ranfenicol (100 µg/ml) sobre o crescimento de *Paracoccidioides brasiliensis* (Bt-07) e *Candida albicans* (E-1) em diferentes meios de cultura com e sem nistatina (20 U/ml), submetidos às temperaturas de 34°C e 25°C

Meios de cultura	Temperatura			
	34°C		25°C	
	E-1	Bt-07	E-1	Bt-07
MY	4+	-	4+	-
MY+N	4+	-	4+	-
MY+S	4+	4+	4+	4+
MY+S+N	2+	3+	1+	4+
GPY	4+	4+	4+	4+
GPY+N	4+	4+	4+	4+
FN	4+	-	4+	-
FN+N	1+	-	-	-
SA	4+	-	4+	2+
SA+N	1+	-	1+	2+
SAB	4+	-	4+	-
SAB+N	3+	-	1+	-
YEA	4+	3+	4+	4+
YEA+N	-	2+	-	-
YEPM	4+	3+	4+	4+
YEPM+N	-	2+	-	1+

TABELA XII - Avaliação do processo de descontaminação com clo₂ ranfenicol (100 µg/ml) associado à nistatina (20 U/ml) sobre o crescimento de *Paracoccidioides brasiliensis* (Bt-07) e *Candida albicans* (E-1), em diferentes meios de cultura com e sem nistatina (20 U/ml) submetidos às temperaturas de 34°C e 25°C

Meios de cultura	T e m p e r a t u r a			
	34°C		25°C	
	E-1	Bt-07	E-1	Bt-07
MY	1+	-	1+	-
MY+N	1+	-	-	-
MY+S	1+	1+	1+	3+
MY+S+N	1+	1+	1+	4+
GPY	3+	3+	1+	3+
GPY+N	3+	3+	1+	4+
FN	-	-	-	-
FN+N	-	-	-	-
SA	1+	-	1+	-
SA+N	-	-	-	-
SAB	1+	-	1+	-
SAB+N	-	-	-	-
YEA	1+	1+	-	2+
YEA+N	-	-	-	-
YEPM	1+	2+	-	3+
YEPM+N	-	1+	-	-