

ANA BEATRIZ ALKMIM TEIXEIRA LOYOLA

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas, área de Patologia Clínica do(a) aluno(a) ANA BEATRIZ ALKMIM TEIXEIRA LOYOLA.

Campinas, 10 de fevereiro de 2006.

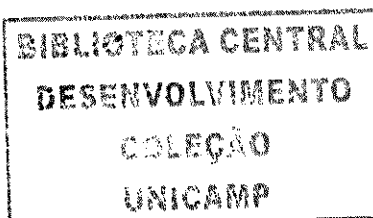

Prof(a). Dr(a). Angélica Zaninelli Schreiber
Orientador(a)

**AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE DE *Aspergillus spp* E
Fusarium spp A ANTIFÚNGICOS POR MICRODILUIÇÃO
EM CALDO E SISTEMA DE MONITORIZAÇÃO DE
CRESCIMENTO DE HIFAS (BIOCELL-TRACER®)**

CAMPINAS

2006

i



ANA BEATRIZ ALKMIM TEIXEIRA LOYOLA

**AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE DE *Aspergillus spp* E
Fusarium spp A ANTIFÚNGICOS POR MICRODILUIÇÃO
EM CALDO E SISTEMA DE MONITORIZAÇÃO DE
CRESCIMENTO DE HIFAS (BIOCELL-TRACER®)**

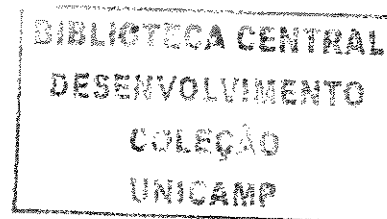
*Tese de Doutorado apresentada à Pós-graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas para obtenção
do título de Doutor em Ciências Médicas, área de
concentração em Ciências Biomédicas.*

ORIENTADORA: *Profa. Dra. Angélica Zaninelli Schreiber*

CO-ORIENTADORA: *Profa. Dra. Maria Luiza Moretti*

UNICAMP

2006



UNIDADE BC
 Nº CHAMADA T12UNICAMP
L958a
 V EX
 TOMBO BC/ 69153
 PROC. 16.123.06
 C ☐ D ☐
 PREÇO 14,00
 DATA 29.06.06

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**
 Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Bib ID 343369

L958a Loyola, Ana Beatriz Alkmim Teixeira
 Avaliação da susceptibilidade de *Aspergillus spp* e *Fusarium spp*
 a antifúngicos pela microdiluição em caldo e sistema de monitorização
 de crescimento de hifas (Biocell-tracer©) / Ana Beatriz Alkmim
 Teixeira Loyola. Campinas, SP : [s.n.], 2006.

Orientadores: Angélica Zaninelli Schreiber, Maria Luiza Moretti
 Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
 de Ciências Médicas.

1. Teste de susceptibilidade. 2. *Aspergillus*. 3. *Fusarium*. 4.
 Antifúngicos. I. Schreiber, Angélica Zaninelli. II. Moretti, Maria
 Luiza. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências
 Médicas. IV. Título.

(Sln/fcm)

Título em inglês: *Susceptibility evaluation of Aspergillus spp and Fusarium spp to antifungal agents by microdilution and automatic monitoring of hypha growth (BIOCELL-TRACER ©)*

Keywords: • Susceptibility test

- *Aspergillus*
- *Fusarium*
- Antifungal agents

Área de concentração: Ciências Biomédicas

Titulação: Doutorado

Banca Examinadora: Proaf. Dra. Angélica Zaninelli Schreiber
 Profa. Dra. Márcia dos Santos Lazera
 Profa. Dra. Márcia de Souza Carvalho Melhem
 Profa. Dra. Tomomasa Yano
 Profa. Dra. Maria Heloísa Souza Lima Blotta

Data de Defesa: 10/02/2006

Banca examinadora da tese de Doutorado

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Angélica Zaninelli Schreiber

Co-Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Maria Luiza Moretti

Membros:

1. Prof. (a). Dr. (a). Márcia dos Santos Lazera

2. Prof. (a). Dr. (a). Márcia de Souza Carvalho Melhem

3. Prof. (a). Dr. (a). Tomomasa Yano

4. Prof. (a). Dr. (a). Maria Heloísa Souza Lima Blotta

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 10/02/06

DEDICO ESTE TRABALHO...

...ao Hideaki Taguchi, tão distante e tão presente

...a toda a minha família pelo incentivo

...ao Luiz Maurício por me propiciar a inspiração

AGRADECIMENTOS

A minha mãe, Beatriz minha fada madrinha que sempre transforma meus sonhos em realidade e ao meu pai Clayton pelos eternos questionamentos científicos, fazendo me crescer. Foi imprescindível para o sucesso de minha qualificação.

Aos meus irmãos Alexandre e Gil que sempre participaram de todos os momentos de minha vida.

As minhas cunhadas Francini pelo companheirismo e Natalia pelo incentivo.

Ao meu sogro José Luiz e a minha sogra Gláucia por participarem das minhas alegrias.

À minha orientadora Profa. Dra. Angélica Zaninelli Schreiber que me incentivou em todos os momentos durante a execução deste trabalho, principalmente dando estímulo a minha vida profissional. Meu muito obrigado.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Maria Luiza Moretti por ter acreditado e ter dado espaço, por me acolher nos momentos difíceis da minha jornada acadêmico-científica. Por ter me adotado em seu laboratório.

A Luzia Lyra pela amizade, respeito e dedicação.

Aos meus colegas de Pós-graduação principalmente Paula, Fernanda e Valquíria e aos docentes do DPC- FCM-UNICAMP.

A Profa. Dra. Maria Cecília B. Villares pelo carinho que sempre demonstrou ter comigo.

Aos funcionários do Laboratório de Microbiologia da Divisão de Patologia Clínica do HC-Unicamp.

À Luciana Sarmiento que me acolheu em todos os momentos de dificuldade, sempre paciente na tentativa de solucionar os problemas técnicos.

As funcionárias Marcinha e Éri van do Laboratório de Epidemiologia Molecular em fungos da FCM-Unicamp, pelo auxílio no funcionamento do aparelho BioCell-tracer® e pelas palavras de conforto nos momentos difíceis.

Aos colegas Rogério que não se incomodou em nem um momento no auxílio do funcionamento do aparelho BioCell-tracer® e a Dulcinéa que me ensinou a pensar, questionar e argüir.

A Ana Cecília, pela afinidade, amizade e respeito.

As secretárias Nida e Regina pela boa vontade e simpatia

Ao Prof. Dr Plínio Trabasso pela convivência, amizade e colaboração em todos os momentos, e a toda equipe do CCIH- HC-UNICAMP.

À Márcia do CEB pelo ajuste e limpeza do equipamento BioCell-tracer®.

Ao Helymar da estatística da FCM que muito colaborou com a análise dos dados.

A Celina Shizuka Oita pelas valorosas sugestões durante o processo de qualificação.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do estado de São Paulo - FAPESP, pela concessão do auxílio ao projeto de pesquisa.

A CAPES, pela concessão da bolsa de Doutorado.

À Japan Internatinal Corporation Agency (JICA), e ao Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicosis, Chiba University, Chiba- Japão.

A todas as pessoas que deixo de citar mas que indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

O meu profundo agradecimento!

“As perguntas exigem sigillus e

ofuscam o meu imaginarium”

Ana Beatriz Alkmim Teixeira Loyola

	<i>Pág.</i>
RESUMO.....	xxvii
ABSTRACT.....	xxxix
1 - INTRODUÇÃO GERAL.....	35
1.1 - Características Gerais dos fungos filamentosos.....	37
1.2 - Fungos Filamentosos como agentes de infecções humanas.....	39
1.2.1 - Espécies de <i>Aspergillus</i> sp.....	40
1.2.2 - Espécies de <i>Fusarium</i> sp.....	41
1.3 - Tratamento de infecção fúngica invasiva.....	42
1.4 - Testes de suscetibilidade aos antifúngicos para fungos filamentosos....	45
1.4.1 - Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI, M38-A, 2002)...	46
1.4.1.1 - Histórico.....	46
1.4.1.2 - Diferenças metodológicas ocorridas entre CLSI M38-P (1998) e CLSI M38-A (2002).....	47
1.4.2 - BioCell - tracer® system.....	49
1.4.3 - Correlação <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	54
1.4.4 - Outros testes.....	55
1.5 - Perspectivas.....	55

2 - OBJETIVOS.....	57
2.1 - Objetivos Gerais.....	59
2.2 - Objetivos dos artigos.....	59
3 - CAPÍTULOS.....	61
3.1 - Manuscrito 1.....	65
3.2 - Artigo 2.....	85
3.3 - Trabalho completo 3.....	93
3.4 - Manuscrito 4.....	109
4 - DISCUSSÃO GERAL.....	127
4.1 - Seleção das cepas para o estudo.....	129
4.2 - Testes de microdiluição em caldo.....	129
4.2.1 - Dose e Concentração sérica dos antifúngicos avaliados.....	130
4.2.2 - Cepa padrão.....	131
4.3 - Avaliação Dinâmica de Crescimento.....	132
4.3.1 - Padronização do inóculo.....	133
4.3.2 - Preparação do Teste.....	133
4.3.3 - Medida de crescimento das hifas.....	134
4.3.4 - Análise estatística dos dados.....	136
4.3.5 - Determinação da taxa de inibição de crescimento das hifas.....	136
4.4 - Correlação entre os testes de microdiluição e avaliação de crescimento de hifas.....	137
4.5 - Correlação dos resultados com morte e sobrevida dos pacientes.....	139

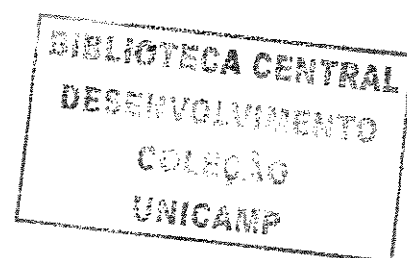
5 - CONCLUSÃO GERAL.....	143
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	147
7 - BIBLIOGRAFIA DE NORMATIZAÇÃO.....	159
8 - ANEXOS.....	163
Anexo 1 - Definições de Aspergilose e Fusariose.....	165
Anexo 2 - Histórico resumido dos pacientes.....	167
Anexo 3 - Cepas selecionadas para estudo.....	169
Anexo 4 - Padronização do inóculo de espécies de <i>Aspergillus</i> e <i>Fusarium</i> para avaliação do crescimento das hifas pelo sistema automatizado BioCell-tracer®.....	171
Anexo 5 - Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração fungicida mínima (CFM) pelo método de microdiluição em caldo (CLSI M38-A, 2002) e pelo sistema BioCell-tracer® das cepas de <i>Aspergillus spp</i> e <i>Fusarium spp.</i> isoladas de pacientes.....	173
Anexo 6 - Avaliação do crescimento das hifas de <i>Aspergillus spp</i> e <i>Fusarium spp.</i> isoladas de pacientes e sua inibição frente a diferentes concentrações de antifúngicos pelo sistema BioCell- tracer®.....	177

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<i>Português</i>	<i>Inglês</i>	
ANB	—	anfotericina B
API	—	aspergilose pulmonar invasiva
—	ATCC	American type Culture Collection
—	BAL	lavado broncoalveolar
—	BCT	BioCell-tracer®
CIM	—	concentração inibitória mínima
—	CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DMSO	—	dimetilsulfóxido
DEVH	GVHD	Doença do enxerto versus hospedeiro
IFA	—	infecção fúngica por <i>Aspergillus</i>
IFI	—	infecção fúngica invasiva
ITZ	—	Itraconazol
IV	—	intravenoso
MOPS	—	ácido morfolinepropanesulfônico
TMO	—	transplante de medula óssea
UFC	—	unidade formadora de colônia
—	SAAMF	meio sintético de aminoácidos para fungos
ANVISA	—	Agência Nacional de Vigilância Sanitária

	<i>Pág.</i>
Tabela 1 - Comparação entre os testes de suscetibilidade CLSI M38-P (proposto) e CLSI M38-A (aprovado) para fungos filamentosos.....	48
Tabela 2 - Padronização do teste para as cepas de <i>Aspergillus</i> spp no sistema automatizado BioCell-Tracer®.....	171
Tabela 3 - Padronização do teste para as cepas de <i>Fusarium</i> spp no sistema automatizado BioCell-Tracer®.....	172
Tabela 4 - Valores de concentração inibitória mínima (CIM) e valores de média e mediana de concentração fungicida mínima (CFM) de anfotericina B, frente as cepas selecionadas para o estudo.....	173
Tabela 5 - Valores de concentração inibitória mínima (CIM) e valores de média e mediana de concentração fungicida mínima (CFM) de itraconazol, frente as cepas selecionadas para o estudo.....	174
Tabela 6 - Valores de concentração inibitória mínima (CIM) e valores de média e mediana de concentração fungicida mínima (CFM) de voriconazol, frente as cepas selecionadas para o estudo.....	175
Tabela 7 - Valores de média (a) e mediana (b) de crescimento e taxa de inibição de crescimento das hifas de <i>Aspergillus</i> spp pela técnica do BioCell-tracer® frente a anfotericina B e itraconazol.....	177
Tabela 8 - Valores de média (a) e mediana (b) de crescimento e taxa de inibição de crescimento das hifas de <i>Fusarium</i> spp pela técnica do BioCell-tracer® frente a anfotericina B e itraconazol.....	178

	<i>Pág.</i>
Figura 1 - Fotografia do aparelho BioCell-tracer®	51
Figura 2 - Monitorização de crescimento: período pré-exposição, período de exposição e período de pós-exposição.....	52
Figura 3 - Elementos utilizados para o cálculo do crescimento de hifas.....	53



RESUMO

Os fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* e *Fusarium* são fungos hialinos, saprófitas, encontrados no solo e na vegetação em decomposição e têm sido, crescentemente, relatados em casos de infecções sistêmicas ou disseminadas. A patogenicidade destes fungos oportunistas está na alta concentração dos microconídios no ar, facilitando a sua inalação. Infecções por *Fusarium* spp são altamente resistentes à terapia disponível, com prognóstico desfavorável e taxa de mortalidade em torno de 57% dos casos. Vários relatos têm descrito a tolerância *in vitro*, ou resistência, de espécies de *Aspergillus* aos agentes antifúngicos, após falha terapêutica com anfotericina B. A infecção por *Aspergillus* sp em pacientes imunossuprimidos apresenta taxa de mortalidade em torno de 86%, independente do tratamento antifúngico. Assim, testes de suscetibilidade a antifúngicos são de extrema importância. O teste de microdiluição, utilizando suspensão de conídios, foi recentemente padronizado pelo CLSI. No entanto, em regra, as infecções causadas por fungos filamentosos são caracterizadas pela presença de hifas no tecido infectado, sendo portanto, a realização do teste de suscetibilidade com hifas, de grande interesse clínico. A concentração inibitória mínima (CIM) de vários agentes antifúngicos pode ser determinada pela observação da inibição de crescimento de uma hifa isolada. Há poucos relatos na literatura sobre a medição automatizada do crescimento de hifas de *Aspergillus* sp. e nenhum relato para hifas de *Fusarium* sp. pelo sistema BioCell-tracer®. Neste estudo foram selecionadas quatro cepas de *Aspergillus* sp. e quatro cepas de *Fusarium* sp. isoladas de pacientes com infecção sistêmica. Para todas as cepas foram realizados testes de microdiluição em caldo pelo CLSI e inibição de crescimento de hifas pelo BCT® frente a anfotericina B e itraconazol. Voriconazol foi avaliado somente pela técnica de microdiluição e para *A. terreus* foi também realizado o teste de crescimento de hifas. Os valores de CIM de anfotericina B para conídios e hifas de *Aspergillus* spp variaram respectivamente, entre 1,0 - 8,0 e 0,5 - >2,0 µg/ml, de itraconazol entre 0,125 - 8,0 e >0,5 µg/ml e de voriconazol entre 2,0 - 4,0 µg/ml. As CIMs de anfotericina B para conídios e hifas de *Fusarium* spp variaram respectivamente, entre 1,0 - 4,0 e ≤0,5 - >4,0 µg/ml, de itraconazol ≥ 128,0 e de voriconazol entre 1,0 - 2,0 µg/ml. A correlação de CIMs obtidas pelos métodos de microdiluição em caldo e BioCell-tracer® com óbito ou sobrevida foi realizada para 6 pacientes. Os resultados dos testes de suscetibilidade e a resposta clínica dos pacientes frente à terapia com anfotericina B, foi observada para testes com conídios

pelo CLSI, para 3 (100%) cepas de *Fusarium* e 2 (66,6%) cepas de *Aspergillus* sp. Para testes com hifas, foi observada correlação para 2 (66,6%) cepas pela média e 1 (33,3%) cepas pela mediana dos resultados de ANB para *Fusarium* sp e 1 (33,3%) cepa pela média e 2 (66,6%) cepas pela mediana dos resultados de ANB para *Aspergillus* sp.

Palavras chave: *Aspergillus* sp, *Fusarium* sp, agentes antifúngicos, teste de suscetibilidade, microdiluição, hifa, BioCell-tracer[®],

Aspergillus and *Fusarium* species are hyaline moulds that are usually found in the soil and plants. These organisms have emerged as a cause of disseminated invasive disease. It has been suggested that airborne conidia might invade the respiratory tract with primary lung or sinus localisation. *Fusarium* species are largely resistant to available chemotherapy and are correlated with poor prognosis and lethal outcome in 57% of the cases. Several reports have described *in vitro* tolerance or resistance of *Aspergillus* spp to antifungal drugs, which correlate with amphotericin B therapeutic failure. The *Aspergillus* infection in immunosuppressed patients shows mortality around 86%, independent of antifungal treatment. Antifungal susceptibility testing of filamentous fungi has therefore become more important. Since most infections caused by filamentous fungi are characterized by the presence of hyphal elements in the tissue, the monitoring of hyphal susceptibility might be of clinical interest. The MICs of several antifungal agents can be determined based on the growth rate of a single hypha. There are only few reports for automatic growth evaluation for *Aspergillus* spp and no reports for *Fusarium* spp using the BioCell-tracer® system. In this work, we selected four clinical isolates of *Aspergillus* and four clinical isolates of *Fusarium*. For all strains we proceeded microdilution and hypha susceptibility antifungal evaluation with amphotericin B and itraconazole. Voriconazole was only tested by microdilution and only for *A. terreus* also by hypha increase. MICs for amphotericin B to *Aspergillus* spp conidia and hypha, respectively, vary from 1,0 - 8,0 and 0,5 - >2,0 µg/ml, for itraconazole from 0,125 - 8,0 and > 0,5 µg/ml and for voriconazole from 2,0 - 4,0 µg/ml. MICs for amphotericin B to *Fusarium* spp conidia and hypha, respectively, vary from 1,0 - 4,0 and ≤0,5 - >4,0 µg/ml, for itraconazole from ≥ 128,0 µg/ml and for voriconazole from 1,0 - 2,0 µg/ml. CIMs correlation between microdilution and BioCell-tracer® with death or survive were observed for 6 patients. The results of susceptibility tests and clinical outcome with amphotericin B therapy could be observed between MIC values for 3 (100%) *Fusarium* strains and 2 (66.6%) *Aspergillus* strains observing conidia. When observing hypha, this correlation was observed between media and median MIC values, respectively, for 2 (66.6%) and 1 (33.3%) to *Fusarium* and 1 (33.3%) and 2 (66.6%) to *Aspergillus* strains.

Keywords: *Aspergillus* sp, *Fusarium* sp; antifungal agents, susceptibility test, microdilution, hyphal response, BioCell-Tracer®

ABSTRACT

1 - INTRODUÇÃO GERAL

1.1 - Características Gerais dos fungos filamentosos

O termo *Fungi* refere-se a todos os membros do Reino *Fungi*. Embora fungos e algas tivessem sido considerados membros primitivos do reino *Vegetalia*, o aumento do conhecimento de seu ciclo de vida, fisiologia e genética, demonstraram que não poderiam ser classificados nem como plantas, nem como animais. A micologia foi prejudicada pelo grande número de sinônimas e inúmeras associações estruturais às plantas. Em 1969, com Whittaker, os fungos passaram a ter seu próprio reino, o reino *Fungi*, que compreendem os organismos eucarióticos, sem flagelo e que se desenvolvem a partir de esporos: leveduras, bolores e cogumelos (KWON-CHUNG e BENNETT, 1992; (SIDRIN e MOREIRA, 1999).

Por não possuírem pigmentos fotossintéticos, capazes de absorver luz e transformá-la em energia, classificam-se como seres heterotróficos, pois retiram matéria-prima e energia de matéria orgânica para sua existência (SIDRIN e MOREIRA, 1999). As células dos fungos são constituídas de núcleo, parede celular, membrana plasmática, sistema metabólico e respiratório como as células dos seres humanos. O citoplasma é revestido pela membrana que contém ergosterol, onde nos seres humanos predomina o colesterol (KWON-CHUNG e BENNETT, 1992). Estão presentes algumas organelas, como: retículo endoplasmático, aparelho de Golgi, vesículas mitocondriais e vacúolos. Outras, que são apenas agregações de macromoléculas, como os ribossomos e os túbulos (SIDRIN e MOREIRA, 1999).

O núcleo apresenta características típicas de uma célula eucariótica, mas de menor tamanho, possuindo uma quantidade relativamente menor de DNA se comparado com as células dos seres humanos (SIDRIN e MOREIRA, 1999).

A parede celular fúngica constitui a superfície de contato da célula fúngica com o meio externo, composta por polissacarídeos em grande quantidade associados a polipeptídeos, constituindo, glicoproteínas (SIDRIN e MOREIRA, 1999).

Os bolores, ou fungos filamentosos, são multicelulares e constituídos de hifas, que são filamentos microscópicos ramificados que crescem em diversas direções. O protoplasto da hifa é contínuo, ou interrompido por septos irregulares, que dividem cada hifa em células. A presença ou ausência de septos e as estruturas dos poros são critérios importantes na taxonomia dos fungos (KWON-CHUNG e BENNETT, 1992).

O micélio, freqüentemente, forma uma colônia circular em meio de ágar e uma colônia globosa em meio de cultura líquida. Isto porque o micélio apresenta tendência de crescer por todas as direções, saindo do ponto central. O crescimento de cada hifa ocorre nas extremidades. Muitas hifas são capazes de crescerem, infinitamente, em condições favoráveis (KWON-CHUNG e BENNETT, 1992).

As hifas possuem células chamadas de estruturas de frutificação que, em determinadas situações biológicas, sofrem modificação para dar origem às células conidiogênicas. Essas células têm a função de originar os conídios que são estruturas responsáveis pela reprodução assexuada dos fungos filamentosos. Portanto, o conídio, após sua formação, fica livre para se destacar das hifas a dar origem a novo fungo. Nas leveduras, as pseudo-hifas assemelham-se muito à hifas verdadeiras, diferindo apenas, em razão da presença de constrições formadas antes de cada brotamento (SIDRIN e MOREIRA, 1999).

Espécies de *Aspergillus* são exemplos de fungos filamentosos que formam colônias cotonosas ou velutineas e apresentam crescimento rápido, podendo variar, conforme a espécie, mas, em regra, de 1 a 7 dias. Os fungos filamentosos produzem, por reprodução assexuada, conídios que, dependendo de seu tamanho, são classificados em macroconídios ou microconídios, e possuem formas diferentes, conforme gênero e espécie (CARVALHAES, 1999).

A temperatura ideal para crescimento *in vitro*, para a maioria dos fungos filamentosos, é de 25 à 35°C. *Aspergillus fumigatus* e *Cladosporium trichoides* porém, crescem melhor entre 37°C e 50°C. Os fungos se desenvolvem em pH normalmente ácido, e muitos meios de cultura utilizados no laboratório têm pH entre 6,0 e 6,8. Fungos não necessitam de luz para crescer, pois esta inibe a esporulação (KWON-CHUNG e BENNETT, 1992).

1.2 - Fungos Filamentosos como agentes de infecções humanas

Os micologistas estimam que existam cerca de 100.000 espécies válidas descritas de fungos. Em se tratando de fungos filamentosos, mais de 300 espécies já foram reportadas como agentes causais de doenças (GUARRO et. al., 1997; PUJOL et. al., 1997). Estes microrganismos podem causar amplo espectro de infecções, desde doenças sistêmicas e potencialmente fatais, à lesões localizadas na pele, tecido subcutâneo ou mucosas. Em adição a estes patógenos primários, numerosos outros fungos com baixa patogenicidade, podem infectar pacientes imunocomprometidos e por isso, são chamados oportunistas. Com a expansão da população desse tipo de paciente, e a melhora no diagnóstico laboratorial a lista destes fungos oportunistas vem aumentando anualmente (JAWETZ et al., 1998).

Espécies de *Aspergillus*, particularmente *A. fumigatus*, e fungos dos gêneros *Fusarium*, *Curvularia* e *Alternaria* são os mais freqüentemente relatados em casos de infecções sistêmicas ou disseminadas (VARTIVARIAN et al., 1993; IWEN et al., 1994; CHRYSSANTHOU, 1997).

Com o aparecimento dos antibióticos e de outras medidas que permitiram aumentar a sobrevivência dos pacientes, estes se tornaram mais vulneráveis às infecções oportunistas, e, com elas, as infecções fúngicas começaram a ser mais prevalentes. Em adição, outras circunstâncias também favoreceram a maior freqüência das infecções fúngicas como: a utilização de terapêuticas imunossupressoras em diferentes patologias, o aparecimento da AIDS e a melhora nos métodos diagnósticos (SIDRIN e MOREIRA, 1999).

Esporos de fungos filamentosos estão extremamente disseminados no ambiente, e podem ser encontrados como colonizantes do trato respiratório do hospedeiro, causando neste, desde processos alérgicos, até infecções sistêmicas ou disseminadas (CHYSSANTHOU, 1997; DEBEAUPUIS et al., 1997; SOARES et al., 1997; CHAZATET et al., 1998; LEENDERS et al., 1999). As infecções ocorrem por aquisição exógena dos fungos por inalação dos conídios (DEBEAUPUIS et al., 1997). O risco de adquirir infecção fúngica está, relacionado com a concentração de conídios presentes no ar ambiental onde se encontra o paciente (ARNOW et al., 1991).

A patogenicidade dos fungos oportunistas é resultante de um conjunto de aspectos biológicos específicos, tais como a alta concentração dos microconídios no ar, assim como a capacidade de germinar e crescer em temperaturas maiores que 37°C, sem exigir nenhuma suplementação nutricional específica (DEBEAUPUIS et al., 1997).

1.2.1 - Espécies de *Aspergillus* sp.

Os fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* são encontrados na vegetação em decomposição (JAWETZ et al., 1998) e identificados por suas características morfológicas básicas como cor e formato da cabeça conidial, número de fiáides, formato da vesícula, pela cor e formato do conidióforo e pelo formato das “células pé” (KWON-CHUNG e BENNETT, 1992). Cepas de *Aspergillus terreus* podem ser identificadas previamente devido à presença de aleuroconídios ao longo da hifa. Esta espécie pode ser detectada a partir de hemoculturas (WALSH et al., 2003).

Aproximadamente sete espécies de *Aspergillus* foram envolvidas em doenças infecciosas humanas: *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. ustus* e *A. versicolor*. Cepas de *A. fumigatus*, são encontradas tanto na aspergilose alérgica como em formas disseminadas de infecção como aspergilose broncopulmonar alérgica, aspergiloma e infecções invasivas em pacientes imunocomprometidos ou com alguma doença de base (DEBEAUPUIS et al., 1997; LEENDERS et al., 1999; VERGHESE et al., 2004).

A aspergilose pulmonar pode ser causada por *A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. flavus*, *A. nidulans*. Na forma disseminada estão envolvidos *A. fumigatus*, *A. flavus* e *A. restrictus* (LACAZ et al., 1991, VERGHESE et al., 2004).

A maioria dos pacientes é infectada com uma única cepa de *Aspergillus fumigatus*, sendo que numerosas colônias estão presentes no ambiente hospitalar. Estes dados sugerem que alguns isolados de *Aspergillus fumigatus* devem ser mais patogênicos que outros (AUFAUVRE-BROWN et al., 1998).

A aspergilose pulmonar invasiva (API) é uma das enfermidades mais severas para pacientes imunossuprimidos, particularmente para os submetidos a transplante de medula óssea. A infecção por *Aspergillus* sp ocorre em 4,5% dos pacientes, independentemente, do tipo de transplante de medula realizado e apresenta taxa de mortalidade de 86%, de acordo com a apresentação clínica e órgãos acometidos (DENNING, 1996). No transplante do tipo alogênico, a API ocorre em 20% dos pacientes sendo, dentre estes, uma das maiores causas de mortalidade (CHAZATET et al., 1998; SALERMO et al., 1998).

1.2.2 - Espécies de *Fusarium* sp

Os fungos do gênero *Fusarium* são fungos que causam hialohifomicoses, são saprófitas, encontrados no solo, sendo patogênicos para as plantas (RAAD e HACHEN, 1995; CASTELLÁ et al., 1999; RAAD et al., 2002; CONSIGNY et al., 2003). Estes são identificados conforme a morfologia da colônia, inicialmente branca e coberta por um micélio aéreo plumoso que ao maturar, produz pigmentos de cores variadas na superfície e no reverso. Em sua micromorfologia, apresentam hifas hialinas, septadas, microconídios de 2 a 3 μm de diâmetro e macroconídios com forma de “banana” ou de “foice” (KONEMAN et al., 1993; RAAD e HACHEN, 1995). Espécies de *Fusarium* estão, vastamente, espalhadas no meio ambiente. Sugere-se que os conídios são inalados e invadem o trato respiratório, primeiramente os pulmões e sinus ou pela ruptura da pele, por introdução de cateter venoso central, ferimentos ou queimaduras (LETSCHER-BRU et al., 2002).

Fusarium spp são ubíquos e podem causar infecção em indivíduos saudáveis (ELJASCHEWITSCH, J., 1996). As espécies de *Fusarium* mais frequentemente relatadas em casos de infecções humanas são *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. chlamydosporum* e *F. verticillioides* (*F. moniliforme*), associadas a processos disseminados e/ou como colonizantes em pacientes imunocomprometidos (KWON-CHUNG e BENNETT, 1992; RAAD e HACHEN, 1995).

A presença de *Fusarium* sp foi predominante na maioria dos casos relatados de ceratite fúngica por trauma ocular. Sendo o *Fusarium solani* a espécie mais frequentemente envolvida em casos de infecções oculares em pacientes que fazem uso de lentes de contato (CARVALHO et al., 2001; GUARRO et al., 2003; PRAJNA et al., 2003; HOFLING-LIMA et al., 2005).

As infecções se limitavam a micoses superficiais, mas recentemente, o número de infecções disseminadas tem crescido, particularmente em pacientes imunossuprimidos (CASTELLÁ et. al., 1999; CONSIGNY et. al., 2003) ou com alguma doença de base como leucemia, câncer e AIDS (SUGIURA et. al., 1999).

Estas infecções disseminadas são, na maioria, relatadas em locais de clima quente (VARTIVARIAN et. al., 1993; RAAD e HACHEN, 1995; JENSEN et. al., 2004). Na cidade de Campinas espécies de *Fusarium* foram mais isoladas do ar ambiental durante o outono e o inverno (SOARES et al., 1997). No ar ambiental da unidade de transplante de medula óssea do HC-UNICAMP foi significativa a presença de *Fusarium* no outono (TEIXEIRA, 2001; TEIXEIRA et. al., 2005^a).

As infecções oportunistas causadas por *Fusarium* spp ocorrem em grande parte, em pacientes com doenças hematológicas malignas e apresentam prognóstico desfavorável, com taxa de letalidade de 50 a 75 %. Aproximadamente, 72% dos pacientes imunocomprometidos desenvolvem lesão de pele na fusariose disseminada, sendo a neutropenia um dos fatores predisponentes. Além dos sintomas de lesão de pele, a febre persistente também está presente em pacientes com fusariose disseminada. (JENSEN et. al., 2004).

1.3 - Tratamento de infecção fúngica invasiva

O arsenal terapêutico atualmente disponível para tratamento de micoses sistêmicas conta com os antifúngicos poliênicos, anfotericina B, nas três formulações lipídicas (ANB lipossomal, ANB complexo lipídico e ANB dispersão coloidal), os imidazólicos, miconazol e cetoconazol, os triazólicos fluconazol e itraconazol; o novo triazólico voriconazol; e uma equinocandina, a caspofungina (ESPINELL-INGROFF, 2003).

A anfotericina B, interage com a membrana citoplasmática do fungo, especialmente nos sítios contendo ergosterol, danificando as funções de barreira da mesma. Dependendo da dose, ocorre apenas alteração da permeabilidade com alterações na nutrição ou a formação de “poros” ou “canais”, por onde escoará o conteúdo intracelular do fungo, particularmente potássio, levando-o à morte (SIDRIN e MOREIRA, 1999; ALVES et. al., 2000).

Os imidazólicos e os triazólicos são inibidores da biossíntese do ergosterol. Estes agentes antifúngicos interagem com a 14 α -demetilase, que é uma enzima do citocromo P-450, bloqueando a demetilação do lanosterol em ergosterol. Esta inibição impede a formação do ergosterol alterando a fluidez e permeabilidade da membrana citoplasmática do fungo (SIDRIN e MOREIRA, 1999; ALVES et. al., 2000).

O acetato de caspofungina, pertencente a classe das equinocandinas, inibe a síntese da β -1,3-D-glucan, presente na parede celular do fungo, com efeito fungicida (BARTIZAL e ODDS, 2003).

A anfotericina B (ANB) e os derivados azólicos, como fluconazol e itraconazol, são as drogas de primeira escolha para o tratamento das infecções fúngicas graves. ANB é a droga que apresenta os melhores resultados *in vivo* e, mesmo assim, o sucesso no tratamento é limitado (WOODS et. al., 1988; OSTROSKY-ZEICHNER et. al., 2003).

A dosagem de anfotericina B, usualmente, recomendada é 3,0-5,0 mg/ kg/ dia (SAMUEL et al, 2005). A ANB lipossomal na dosagem de 3 mg/ kg/ dia tem sido eficaz no tratamento de fusariose disseminada em pacientes leucêmicos (ELJASCHEWITSCH et. al., 1995), ao contrario dos antifúngicos flucitocina e itraconazol que são altamente ineficazes frente aos *Fusarium* spp (SANDER et. al., 1998).

Espécies de *Aspergillus fumigatus* já demonstraram resistência ao uso *in vivo* e *in vitro* de itraconazol (Te DORSTHORST et. al., 2004).

Vários relatos têm demonstrado tolerância *in vitro* ou resistência de espécies de *Aspergillus* a terapia antifúngica, conseqüentemente com falha terapêutica. *Aspergillus terreus* parece ser mais resistente a anfotericina B do que outras espécies de *Aspergillus* sp (LASS-FLORL et. al., 1998; SUTTON et. al., 1999; BALAJEE e MARR, 2002),

Em experimentos com modelos animais não houve diferença significativa na eficácia da anfotericina B administrada sozinha ou combinada com rifampicina ou flucitosina, no entanto estas combinações são comumente usadas para tratamento de fusariose invasiva (CONSIGNY et. al., 2003).

O aumento da variedade de patógenos associados com infecções fúngicas graves não tem encontrado correspondência com o número de agentes antifúngicos disponíveis para tratamento (ALVES et. al., 2000). Limitações na eficácia e na tolerância dos agentes antifúngicos em uso têm estimulado a pesquisa de novas drogas que possam ser mais eficientes para o tratamento de pacientes com infecções por fungos filamentosos ou leveduras (ESPINEL-INGROFF, 1998).

O aparecimento dos agentes antifúngicos triazoles nos anos 80 e 90 facilitou o tratamento das infecções fúngicas devido à baixa toxicidade destes agentes comparados com as terapias antifúngicas precedentes. Três novos agentes antifúngicos (voriconazol, posaconazol e ravuconazol) apareceram para expandir a atividade antifúngica comparada com os azólicos previamente utilizados. Somente o voriconazol está disponível na clínica e é indicado para o tratamento de candidíase esofágica, aspergilose invasiva, e em infecções refratárias causadas por *Scedosporium apiospermum* e *Fusarium* spp. O posaconazol e o ravuconazol estão ainda em fase experimental, ainda não liberados para o uso em seres humanos (KALE e JOHNSON, 2005).

O voriconazol é um novo antifúngico triazólico, administrado ao paciente após falha terapêutica com o uso de anfotericina B na formulação convencional ou na formulação lipossomal, podendo ser uma alternativa no tratamento de fusariose em pacientes neutropênicos que não obtiveram resposta terapêutica satisfatória (CONSIGNY et. al., 2003). Sua combinação com caspofungina demonstrou sinergismo frente a *Aspergillus* spp (BADDLEY e PAPPAS, 2005)

A caspofungina é a primeira droga disponível de uma nova classe de agentes antifúngicos, as equinocandinas. A caspofungina é fungicida para todas as espécies de *Candida* e mata mais lentamente as espécies de *Aspergillus* sp. Está disponível somente para administração intravenosa, tem efeitos colaterais mínimos e baixa interação

medicamentosa. As equinocandinas são drogas de primeira escolha para tratamento de infecções sistêmicas em pacientes neutropênicos causadas por *Cândida* e como terapia secundária para tratamento de infecções por *Aspergillus* sp (KAUFFMAN, 2004).

A terapia combinada tem sido documentada em estudos de sinergismo com os novos agentes antifúngicos, mas são poucas as informações de correlação *in vivo/ in vitro* para fungos filamentosos (SPINELL-INGROFF, 2003).

Os novos azólicos voriconazol, posaconazol e ravuconazol, são alternativas terapêuticas promissoras. Os estudos *in vitro* estão sendo realizados, mas os dados de correlação clínica ainda são insuficientes para permitir conclusões (LETSCHER-BRU et al, 2002).

No estudo de JANSEN et al. 2005, o custo do tratamento de cada paciente com aspergilose invasiva foi de €32,651 para voriconazol comparado com €33,616 para anfotericina B e €29,115 para itraconazol. O tempo de sobrevida dos pacientes tratados com voriconazol foi de 174 semanas de vida comparado com 116,1 semanas se tratados com anfotericina B e 150,4 se tratados com itraconazol (JANSEN et al, 2005).

1.4 - Testes de suscetibilidade Aos Antifúngicos Para Fungos Filamentosos

Os métodos atualmente utilizados para determinar a suscetibilidade aos antifúngicos de fungos filamentosos são limitados devido ao tempo gasto para realizar as análises e a dificuldade de quantificar o crescimento miceliar (BALAJEE e MARR, 2002).

Apesar do baixo número de infecções causadas por fungos filamentosos, em comparação às infecções causadas por leveduras, a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração fungicida mínima (CFM) é de extrema importância para os pacientes com infecção por fungos filamentosos. Tanto para orientação ao tratamento, geralmente difícil e frequentemente sem sucesso, assim como para a avaliação de novos agentes antifúngicos (DRUTZ, 1987). Estes métodos têm como princípio, expor um inóculo definido do microrganismo em estudo a conhecidas concentrações da droga a ser avaliada,

em condições que suportem o crescimento do microrganismo e pouco, ou nada, interfiram com a atuação da droga. A leitura final dos testes permite definir a menor concentração da droga que inibe o crescimento (concentração inibitória mínima – CIM) ou que mata o microrganismo problema (concentração fungicida mínima – CFM) (SIDRIN e MOREIRA, 1999).

Em estudos colaborativos têm sido determinados os pontos de corte da concentração fungicida mínima (CFM) para fungos filamentosos, mas a relevância clínica ainda precisa ser investigada (ESPINELL-INGROFF, 2003).

1.4.1 - Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI, M38-A, 2002)

1.4.1.1 - Histórico

Em 1982, o National Committee for Clinical of Laboratory Standards (NCCLS) organizou um sub-comitê para padronização do teste de suscetibilidade a antifúngicos para leveduras, pelo método de microdiluição em caldo. Em 1985, foi liberado um relatório sobre o teste de suscetibilidade para leveduras, ainda sujeito às modificações (DRUTZ, 1987).

Os fatores pré-analíticos mais relevantes foram estudados, e em 1992, foram definidos e publicados no documento M27-P (proposto), depois adaptado para M27-T (tentativo) (SHEEHAN et. al., 1999).

Em 1997 foi liberado o documento NCCLS M27-A, referente ao teste de suscetibilidade a antifúngicos pelo método de macrodiluição e microdiluição em caldo para leveduras (CLSI, 1997; SHEEHAN et. al., 1999) e, em 1998 foi editado o NCCLS M38-P (proposto), específico para alguns fungos filamentosos (CLSI, 1998).

O método de microdiluição em caldo é uma miniaturização do método de acrodiluição (CORMICAN e PFALLER, 1996).

Em agosto de 2002 foi liberado pelo NCCLS o documento M38-A, sendo o método de referência para o teste de suscetibilidade de diluição em caldo para fungos filamentosos. A padronização aprovada descreve a metodologia utilizada para a realização do teste de suscetibilidade de suspensões de esporangiosporos ou conídios não germinados de fungos filamentosos que causam infecções fúngicas invasivas, incluindo espécies de *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhizopus arrhizus*, *Pseudallescheria boydii* e a forma miceliana de *Sporothrix schenckii* (SHEEHAN et. al., 1999; CLSI, 2002).

Em 2005 o NCCLS mudou de nome para Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) e adquiriu-se os direitos de tradução do documento pela agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA) do Brasil (CLSI, 2002).

1.4.1.2 - Diferenças metodológicas ocorridas entre CLSI M38-P (1998) e CLSI M38-A (2002)

A metodologia aprovada difere muito pouco da metodologia proposta, sendo a maior mudança observada na leitura do teste realizado com itraconazol e os novos trizólicos.

Tabela 1 - Comparação entre os testes de suscetibilidade CLSI M38-P (proposto) e CLSI M38-A (aprovado) para fungos filamentosos.

Parâmetros	CLSI M 38-P	CLSI M 38-A
Microrganismos	<i>Aspergillus sp</i> , <i>Fusarium sp</i> , <i>Rhizopus arrhizus</i> , <i>Pseudallescheria boydii</i> <i>Sporothrix schenckii</i>	<i>Aspergillus sp</i> , <i>Fusarium sp</i> , <i>Rhizopus arrhizus</i> , <i>Pseudallescheria boydii</i> <i>Sporothrix schenckii</i>
Antifúngicos	Anfotericina B, 5-fluocitocina, cetoconazol, itraconazol e fluconazol	Anfotericina B, 5-fluorocitocina, cetoconazol, itraconazol e fluconazol, posaconazol, ravuconazol, voriconazol,
Diluyente	RPMI 1640 tamponado com 0,165 mol/l MOPS.	RPMI 1640 tamponado com 0,165 mol/l MOPS.
Inóculo	$0,4 \times 10^4$ a $5,0 \times 10^4$ UFC/ml	$0,4 \times 10^4$ a $5,0 \times 10^4$ UFC/ml
Leitura dos resultados	0% de crescimento: anfotericina B 50% de crescimento: fluconazol e azólicos	0% de crescimento: anfotericina B, itraconazol e triazóis 50% de crescimento: fluconazol, 5-fluocitocina, cetoconazol
Cepa padrão	ATCC 22019 <i>C. parapsilosis</i> , ATCC 6258 <i>C. krusei</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. fumigatus</i>	ATCC 22019 <i>C. parapsilosis</i> , ATCC 6258 <i>C. krusei</i> , ATCC 204304 <i>A. flavus</i> , ATCC 204305 <i>A. fumigatus</i> (os valores foram modificados)

Ainda há muitas controvérsias em torno da avaliação de suscetibilidade a antifúngicos, para fungos filamentosos. Devido às características morfológicas destes microrganismos, no ambiente e nos pacientes, há questionamentos sobre se a forma conidial, seria a mais adequada para esta avaliação. Os conídios são formas de resistência dos fungos filamentosos. Considerando que a hifa é predominante e, praticamente a forma exclusiva em tecidos de indivíduos infectados, a relevância dos dados obtidos dos testes de crescimento conidial, em comparação com aqueles obtidos em testes de crescimento com hifas permanece uma pergunta ainda sem resposta (GUARRO et. al., 1997).

O método de microdiluição em caldo (CLSI, 2002) recomenda ajustar a turbidez do inóculo utilizando o espectrofotômetro. Entretanto tem sido reportado que a contagem de conídios em câmara de células hematológicas foi mais bem avaliada para ajustar o tamanho do inóculo para a realização do teste (TEIXEIRA, 2001; ESPINELL-INGROFF, 2003; TEIXEIRA et. al., 2005^b).

O tempo de incubação recomendado pelo documento CLSI M38-A é de 48 horas para *Fusarium* spp e outros fungos oportunistas (CLSI, 2002). Tem sido documentado que o tempo de incubação e o tamanho do inóculo interferem, diretamente, na determinação da CIM frente ao posaconazol, ravuconazol e voriconazol para estas espécies. Resultados da CIM determinados em curto tempo de incubação têm apresentado melhor correlação *in vivo* (ESPINELL-INGROFF, 2003).

Atualmente, o método do CLSI M38-A exige tempo de incubação de 48 a 72 horas para a determinação da CIM. Foi proposto um método mais rápido de 5 horas de incubação, o qual utiliza a sonda FUN-1 marcada com fluorescência que apresenta como alvo o metabolismo conidial, desta forma minimizando o tempo de incubação (ESPINELL-INGROFF, 2003).

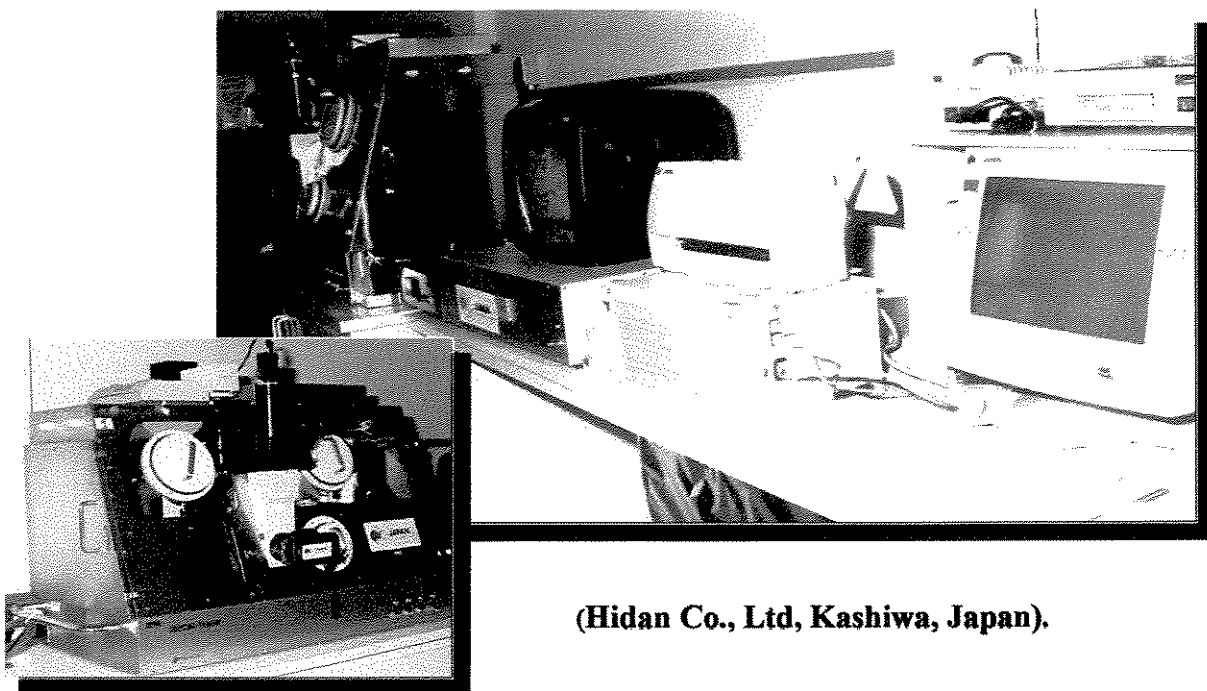
O método do CLSI M38-A não descreve as condições de teste para determinar a concentração fungicida mínima (CFM). Segundo GUARRO et al, 1997 a concentração fungicida mínima (CFM) foi determinada transferindo-se 10 µl de todos os pocinhos da placa de microtitulação em caldo que não apresentaram crescimento fúngico, para uma placa de ágar batata dextrose. Após a incubação da placa a 30°C por 48h verificou-se a presença, ou não, de crescimento do inóculo (GUARRO et al, 1997).

1.4.2 - BioCell - tracer[®] system

A determinação da CIM para fungos filamentosos poderia ser mais adequada com a utilização de um método que permitisse a quantificação do crescimento das hifas (BEZJAK, 1985; MATSUOKA et al., 1990; YAMADA et al., 1992; OH et al., 1993; GUARRO et al., 1997). Assim, o sistema automatizado “BioCell-tracer[®]”

(Hidan Co., Ltd, Kashiwa, Japan), para análise de crescimento de hifas *in vitro*, poderia ser uma alternativa para o estudo da atividade de drogas antifúngicas. Através do acompanhamento do crescimento de hifas à 35°C que, dentre os testes *in vitro*, é a que mais se assemelha à temperatura corporal interna, é possível mimetizar uma situação de crescimento bem semelhante à encontrada no organismo humano. O método BioCell-tracer® (BCT®) propõe a análise do estágio de emergência da hifa, bem como os estágios subseqüentes, para determinação da atividade antifúngica. O método propõe a intensificação do acompanhamento do crescimento, conjuntamente com registros e gráficos que são automaticamente gerados, para melhor avaliação (OH et al., 1995; TAGUCHI et al., 1995; ANSHENG et al., 1999; IIDA et al., 1999).

O sistema (Figura 1) é constituído por uma base para as placas plásticas estéreis de cultura 35 x 10 mm, um microscópio (Olympus; IMT2), uma câmara filmadora CCD (Change Coupled Device) que capta a imagem das placas e as envia para um digitalizador de imagem (Flovel), um microcomputador que monitora todo o desenvolvimento do experimento e um televisor. A imagem da hifa, formada na placa de cultura, é visualizada ao microscópio e filmada pela câmara que envia a imagem para o televisor e o digitalizador de imagem que as envia para o microcomputador, onde é possível observar o crescimento da estrutura em detalhes. A resolução da imagem tem alta definição e precisão analítica de 0,01 $\mu\text{m}/\text{min}^{-1}$ (OH et. al., 1995; TAGUCHI et. al., 1995).



(Hidan Co., Ltd, Kashiwa, Japan).

Figura 1 - Fotografia do aparelho BioCell-tracer®. O equipamento foi doado pela JICA - Japan International Cooperative Agency, durante o programa de cooperação entre o Brasil e o Japão na vigência do “Projeto de Pesquisa Clínica e Tratamento Médico” - Unicamp, desenvolvido em conjunto com a FCM-Unicamp, e o Research Center for Pathogenic Fungi, Chiba University, Japão e encontra-se alocado no Laboratório de Epidemiologia Molecular de Bactérias e Fungos, da Disciplina de Infectologia da FCM-UNICAMP, coordenado pela Profª Drª Maria Luiza Moretti.

O sistema possui ainda uma câmara de incubação onde a temperatura interna pode ser ajustada de 10 °C a 50°C. A velocidade em que pode ser acompanhado o crescimento das extremidades das hifas no sistema BCT® varia de 0,5 a 20 $\mu\text{m}/\text{min}$.

Com o auxílio do computador é possível escolher as melhores hifas a serem analisadas, bem como monitorar seu crescimento. Depois de observar o crescimento uniforme da hifa, é adicionada a concentração da droga a ser avaliada. As informações

obtidas geram gráficos, que podem ser analisados sozinhos ou em conjunto com outros gerados por análises posteriores (OH et al., 1995; ANSHENG et al., 1999). A figura 2 exemplifica o crescimento de uma única hifa:

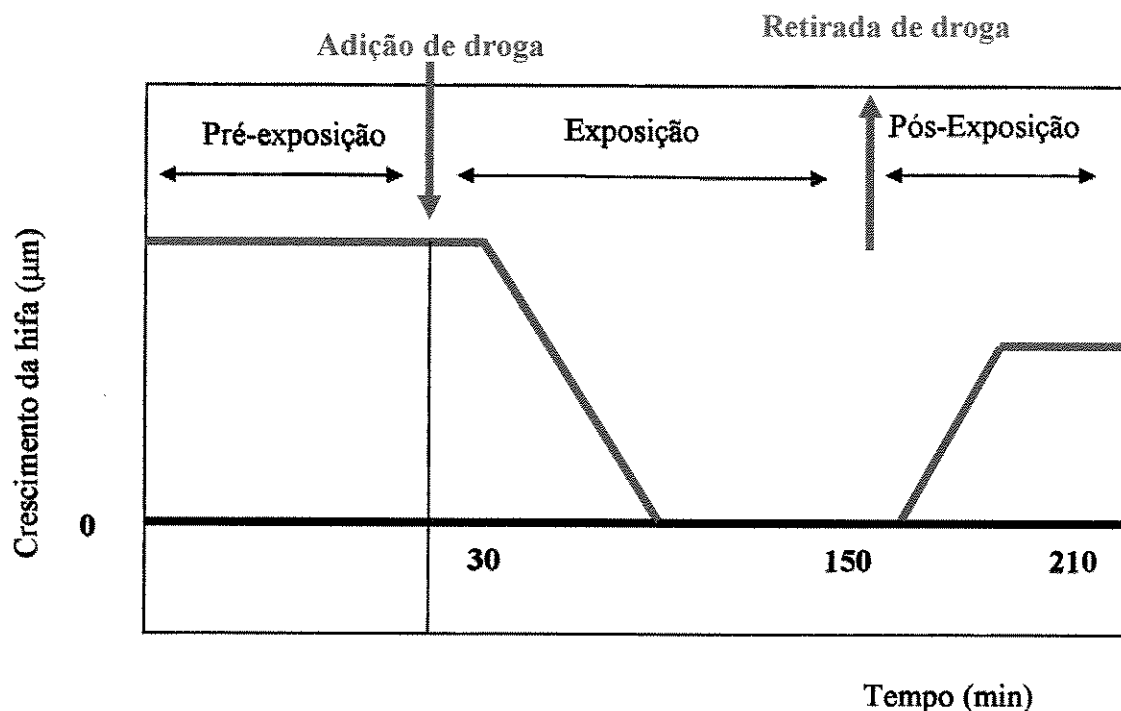


Figura 2 - Monitorização de crescimento: período pré-exposição: crescimento da hifa sem a adição da droga a ser testada. **Período de exposição:** exposição da hifa à droga em determinada concentração. **Período de pós-exposição:** crescimento da hifa após a retirada da droga a ser testada.

O cálculo da taxa de crescimento da hifa pelo modelo BCT[®] é automático e consiste na divisão do valor correspondente ao crescimento da hifa a cada 5 min (L1), pela subtração dos tempos final (t₁) menos inicial (t₀), também a cada 5 min. [$V1 = L1 / (t_1 - t_0)$, $V2 = L2 / (t_2 - t_1), \dots$]

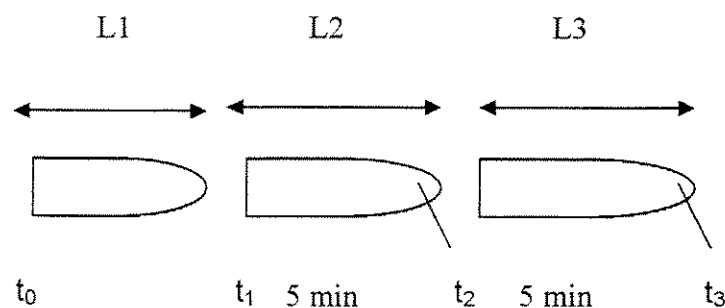


Figura 3 - Elementos utilizados para o cálculo do crescimento de hifas (V): valor do crescimento da hifa a cada 5 minutos, L: valor do crescimento da hifa; t₀: tempo inicial dos 5 minutos, t₁: tempo final dos 5 minutos

A vantagem de utilizar o sistema BioCell-tracer[®] está nas informações geradas pelas análises. Os testes podem ser realizados com produtos líquidos ou gasosos. Este sistema tem uma aplicação fundamental em pesquisa ao que se refere à determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e determinação da atividade fungicida e fungistática ($V_{\text{pós}} / V_{\text{pré}} \times 100 < 0$ e $V_{\text{pós}} / V_{\text{pré}} \times 100 \geq 0$). Uma desvantagem do sistema é que somente uma cepa pode ser testada por vez (MATSUOKA et al., 1990; OH et. al., 1993^a; YAMADA et. al., 1992).

O aparelho BCT[®] mede, automaticamente, o crescimento de cada uma das hifas selecionadas para o teste. Ao final, o aparelho gera os valores de crescimento das hifas testadas e constrói gráficos. A maioria dos relatos da literatura baseia-se nos valores da média do crescimento das hifas (MATSUOKA et al. 1990; YAMADA et al. 1992; OH et al. 1993^{a,b}; OH et al. 1995; TAGUCHI et al. 1995; IIDA et al. 1999; ANSHENG et al. 1999).

1.4.3 - Correlação *in vivo* e *in vitro*

A resposta clínica é influenciada por uma grande variedade de fatores que são intrínsecos ao antimicrobiano, ao hospedeiro e ao patógeno. Devido a esta multiplicidade de fatores, e sua completa interação *in vivo*, é evidente que devem existir discrepâncias entre os resultados das provas de suscetibilidade *in vitro* e a eficácia terapêutica (TUDELLA et al., 2001).

A evolução do quadro clínico das infecções por *Aspergillus* sp, pode depender da suscetibilidade dos isolados frente a anfotericina B. Altos valores da CIM para isolados de *Aspergillus* sp resultaram em menor sobrevida dos pacientes, enquanto que, valores baixos da CIM para o mesmo agente, resultaram em maior sobrevida dos pacientes. *A. terreus* apresentou altos valores da CIM contra a anfotericina B e, portanto baixa sobrevida (LASS-FLORL et al., 1998). Também foi documentado em dois estudos, a correlação de baixos valores da CIM para *A. terreus* frente à anfotericina B, com resistência clínica em modelos de laboratório com neutropenia persistente e aspergilose (ESPINELL-INGROFF, 2003)

O uso indiscriminado da terapia antifúngica, incluindo a profilática, pode contribuir para o aparecimento de resistência aos antifúngicos disponíveis. O número de falhas terapêuticas relatadas após utilização de anfotericina B (60 à 70%) pode ser atribuído: ao diagnóstico tardio, ao curto período de tratamento devido à natural toxicidade da droga, à possível deficiência de ergosterol no fungo ou pela farmacocinética da droga (ESPINELL-INGROFF, 2003).

Dados preliminares demonstraram que uma CIM > 8,0 µg/ml frente ao itraconazol para fungos filamentosos está diretamente associada à resistência clínica (CLSI, 2002).

Estudos correlacionando os testes de suscetibilidade, com base na determinação da CIM utilizando hifas, com a evolução clínica dos pacientes, poderiam abrir novos horizontes para a terapêutica de infecções invasivas causadas por fungos filamentosos.

1.4.4 - Outros testes

O teste de difusão E test[®] (AB Biodisk) tem sido padronizado para fungos filamentosos, mas os valores de CIMs, determinado pelo E teste[®], frente à anfotericina B, para certas espécies de *Aspergillus*, foram mais altos que os valores de CIM determinado conforme método proposto pelo CLSI, principalmente, para *A. flavus* (ESPINHEL-INGROFF, 2003). Outro método comercial, o colorimétrico de placas antifúngicas para leveduras, foi concordante com os valores determinados pelo CLSI frente a anfotericina B, itraconazol e posaconazol para *Aspergillus spp* (ESPINHEL-INGROFF, 2003).

O teste de suscetibilidade utilizando ágar semi-sólido emprega tubos contendo 0,5% ágar semi-sólido de infusão de coração. Comparado com o CLSI M38-P, o método demonstrou excelente concordância entre os resultados. A limitação deste estudo foi em estabelecer qual o tipo ideal de inóculo a ser preparado, somente contendo conídios ou mistura de hifas com conídios. No entanto, não foram observadas variações dos resultados utilizando inóculos diferentes. (KUZUCU et al., 2004).

No entanto, os testes comerciais devem ser encarados como ferramentas para auxiliar na adaptação da metodologia do CLSI para uso em laboratório clínico. Sua relevância clínica deveria ser avaliada (ESPINHEL-INGROFF, 2003).

1.5 - Perspectivas

O Hospital de Clínicas da UNICAMP atende a um grande número de pacientes imunocomprometidos, submetidos ou não, a transplante de medula óssea (TMO) e, portanto, altamente suscetíveis às infecções fúngicas oportunistas.

Uma vez que a hifa é predominante e, praticamente, a forma exclusiva em tecidos de indivíduos infectados, a relevância dos dados obtidos dos testes com suspensão de inóculo contendo conídios, em comparação com aqueles obtidos em testes de crescimento com hifas, permanece como uma pergunta ainda sem resposta.

Testes de suscetibilidade comparativos, entre inóculos de conídios e hifas, seriam de grande interesse, principalmente, se realizados para acompanhamento de tratamento.

Não há relatos na literatura sobre a padronização da utilização do sistema automático para monitoramento de crescimento BioCell-tracer[®] para cepas de *Fusarium* sp. Para espécies de *Aspergillus* há poucos relatos na literatura (OH et al., 1995; TAGUCHI et al., 1995; ANSHENG et al., 1999; IIDA et al., 1999), visto que existem somente cinco equipamentos disponíveis no mundo, um no Brasil, três no Japão e um no Canadá.

2 - OBJETIVOS

2.1 - Objetivos Gerais

- Estudar cepas de *Aspergillus* e *Fusarium* de casos de infecção prováveis, possíveis ou confirmadas, para as quais há relato e acompanhamento de tratamento com antifúngico
- Estudar o crescimento das cepas de *Aspergillus* spp e *Fusarium* spp, e a sua suscetibilidade frente a anfotericina B, itraconazol e voriconazol, utilizando o teste de microdiluição em caldo
- Estudar o crescimento das cepas de *Aspergillus* spp e *Fusarium* spp, e a sua suscetibilidade frente a anfotericina B e itraconazol, utilizando o Sistema automatizado de avaliação de crescimento BioCell-tracer[®].
- Correlacionar os valores de concentração inibitória mínima (CIM) obtidos pelo método de microdiluição em caldo com os valores medidos pelo BioCell-tracer[®].
- Correlacionar os valores de concentração fungicida mínima (CFM) obtidos pelo método de microdiluição em caldo com os valores medidos pelo BioCell-tracer[®].
- Correlacionar os valores da CIM obtidos pelos métodos de microdiluição em caldo e BioCell-tracer[®] com óbito ou sobrevida dos pacientes dos quais as cepas foram isoladas.

2.2 - Objetivos dos artigos

- **Manuscrito 1:** O crescimento de hifas de *Fusarium solani* foram monitoradas pelo sistema BioCell-tracer[®] e os valores de concentração inibitória mínima foram obtidos por este sistema automatizado (hifas) e pelo método convencional (conídio) frente à anfotericina B.

- **Artigo 2:** Este artigo descreve um caso de infecção por *Fusarium solani* em paciente transplantado de medula óssea, o diagnóstico microbiológico, teste de suscetibilidade para conídios e hifas e correlação clínica.
- **Trabalho completo 3:** O comportamento do crescimento de hifas de *F. solani* (3) e *F. oxysporum* (1) frente a várias concentrações de anfotericina B (ANB) e itraconazol (ITZ) pelo sistema BioCell-tracer®
- **Manuscrito 4:** Neste estudo, nós medimos o crescimento da hifa de cepas clínicas de *A. flavus*, *A. terreus* e *A. fumigatus* e observamos a resposta da hifa na presença de diferentes concentrações de anfotericina B e itraconazol.

3 - CAPÍTULO

Esta tese está baseada na informação CCPG/001/98/Unicamp que regulamenta o formato alternativo para tese de Doutorado e permite a inserção de artigos científicos de autoria ou co-autoria do candidato.

Desta forma, esta tese é composta de quatro artigos, os quais foram submetidos ou publicados em revistas científicas ou anais de congresso, conforme descrito abaixo:

3.1. Manuscrito 1 - “Inhibitory effect of amphotericin B on apical growth of *F. solani*”. Manuscrito submetido para publicação na revista Journal of Microbiological Methods em 22 de novembro de 2005.

3.2. Artigo 2 – “Evaluation of *Fusarium solani* hyphae and conidia susceptibility to amphotericin B and itraconazole: study of a clinical case” Artigo publicado na revista Mycopathologia (2005) 116 (4):291-296.

3.3 Trabalho completo – “Study on the hyphal responses of *Fusarium* species to the amphotericin B and itraconazole by BioCell-Tracer[®]” Abstract publicado nos anais do congresso 45th ICAAC 2005 aceito para exposição em poster, Washington, DC, EUA.

3.4. Manuscrito 4 – “Susceptibility testing of *Aspergillus* spp to Amphotericin B and Itraconazole by hyphal response study”. Manuscrito submetido para publicação na revista Medical Mycology em 12 de dezembro de 2005.

3.1 - Manuscrito 1

Journal of Microbiological Methods

submetido em 22 de novembro de 2005

1 **Inhibitory effect of amphotericin B on apical growth of *F. solani***

2 Ana Beatriz Alkmim Teixeira,¹ Maria Luiza Moretti,¹ Helymar Costa Machado,¹ Keiko

3 Nishimura,² Hideaki Taguchi,² Angélica Zaninelli Schreiber^{1*}

4

5 *School of Medical Sciences, State University of Campinas, São Paulo, Brazil¹ and

6 Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicoses, Chiba University, Japan²

7

8

9 Address reprint requests to: Dr. Angélica Zaninelli Schreiber

10 Departamento de Patologia Clínica - Faculdade de Ciências Médicas

11 Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

12 Cidade Universitária Zeferino Vaz, Cx. Postal 6142,

13 CEP 13083-970 Campinas, São Paulo, Brasil.

14 Telephone: 55-19-32893273; Fax: 55-19-37889434

15 E-mail: zaninele@fcm.unicamp.br

16 **ABSTRACT**

17 The BioCell-Tracer[®] system is a microscopic method to measure the growth rate
18 of a single fungal hypha. We have determined growth control for *Fusarium solani* using
19 this system and also the effect of different concentrations of amphotericin B on the
20 growth rate. The median growth value was used instead of the mean value due to the high
21 variability of the measurements obtained for each hypha. The minimal inhibitory
22 concentration (MIC) for this drug was also determined by the microdilution method using
23 RPMI medium. Different MIC values, 1.0 and 4.0 $\mu\text{g/ml}$, were obtained by the two
24 different methods for amphotericin B, suggesting that hyphae are more susceptible than
25 conidia, which often do not have the same morphological form of the causative fungus
26 seen *in vivo*.

27

28 Keywords: amphotericin B; BioCell-tracer; *Fusarium* sp; susceptibility test.

29 INTRODUCTION

30 Most opportunistic fusarial infections occur in patients with hematological
31 malignancies and are correlated with poor prognosis and lethal outcome in 57% of the
32 cases (Rombaux *et al.*, 1996). Amphotericin B is still frequently used in medical therapy
33 for many fungal infections. In many cases, it is the only initial antifungal indication and
34 often considered the “gold standard” in therapy (Ostrosky-Zeichner *et al.*, 2003).

35 The differentiation of *Fusarium* species from other filamentous fungal
36 opportunists is important to establish the correct clinical diagnosis, in view of their
37 different susceptibilities to antifungal drugs. *Fusarium* species are largely resistant to
38 available chemotherapy (Sugiura *et al.*, 1999). It is necessary to measure the
39 susceptibility of causative fungi to antifungal agents, and to do this several methods have
40 been reported (Guarro *et al.*, 1997; Espinel-Ingroff *et al.*, 2001; Kuzuku *et al.*, 2004).

41 For susceptibility testing of filamentous fungi to antifungal agents, conidium
42 germination was used instead of hyphal growth (Taguchi *et al.*, 1995), which often do not
43 have the same morphological form of the causative fungus seen *in vivo* (Bezjak *et al.*,
44 1985). For this purpose, new methods for MIC testing of filamentous fungi using hyphae
45 inoculum are being sought.

46 BCT[®] can detect the growth rate change of a single hypha every 30s with a
47 precision of 0.1 $\mu\text{m min}^{-1}$ (Oh *et al.*, 1993). The newly developed system is composed of
48 a reaction vessel under microscope, automatic staging, charge coupled device (CCD)
49 cameras, TV monitor, video tape recorder (VTR) and microcomputer (Yamada *et al.*,
50 1992) (Figure 1).

51 The minimal inhibitory concentrations (MICs) of several antifungal agents can be
 52 determined based on the growth rate of a single hypha in liquid media. This system has
 53 potential application in fundamental research, estimation of minimal inhibitory
 54 concentrations and determination of fungicidal (Exp-GR=0 and Post-GR=0) and
 55 fungistatic (Exp-GR=0 and Post-GR>0) activities (Yamada et al., 1992).

56 The hyphae growth rate of *Fusarium solani* was observed in the BCT system and
 57 MIC values were obtained by the automatic system (hyphae) and by conventional assay
 58 methods (conidia) for amphotericin B.

59 We showed almost the same values of AMB MIC and MFC for *Fusarium solani*
 60 using conidia; and two concentrations less show the same MIC and MFC values using
 61 hyphae. In this case our data suggest that hyphae are more susceptible to AMB than
 62 conidia.

63

64 MATERIAL AND METHODS

65 **Strain.** *Fusarium solani* LIF 8/98 evaluated in this study was isolated from
 66 bronchalveolar lavage fluid (BAL) of a bone marrow transplant recipient and identified
 67 by extracting DNA using GenTLE™ (TaKaRa, Osaka, Japan). The ribosomal DNA
 68 internal transcribed ITS1-5.8S-ITS2 sequences and D1/D2 domain region sequence of the
 69 large-subunit (26S) rDNA were analyzed using the following PCR primer pairs: ITS5
 70 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') and ITS4 (5'-
 71 TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') for ITS region, and 26SS (AAA CCA ACA GGG
 72 ATT GCC TC) and 26Sa (GTG GCT TAA AGT CAT TAC GCC) for D1/D2 domain
 73 (Katsu et al. 2004; Kartzman et al. 1998).

74 **Media** Potato dextrose agar (PDA, Difco, Detroit, Michigan, USA) was autoclaved at
75 121°C and prepared as slants for pre-cultivation of the tested strain. RPMI 1640 (Sigma
76 Chemical Co., St. Louis, MO.) with l-glutamine, buffered with 0.165 M
77 morpholinepropanesulphonic acid (MOPS, Sigma Chemical Co.) at pH 7.0 was used as
78 the basal broth medium, with or without amphotericin B (AMB).

79 **Microdilution test.** A reference method for broth dilution antifungal susceptibility
80 testing of conidium-forming filamentous fungi, CLSI M 38-A, was used (Clinical
81 Laboratory Standards Institute - CLSI, 2002). *Antifungal agent.* Amphotericin B (AMB,
82 Sigma Chemical Co., St. Louis, MO.) was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) at
83 12.8 mg/ml as a stock solution. The stock solution was kept at - 40°C and used within a
84 week. For the experiments, it was serially diluted in RPMI 1640 (Sigma Chemical Co.,
85 St. Louis, MO.) with l-glutamine, buffered with 0.165 M morpholinepropanesulphonic
86 acid (MOPS, Sigma Chemical Co) into eleven concentrations ranging from 128.0 to
87 0.125 µg/ml. Those diluted solutions were used within 24 h. *Preparation of inoculum.*
88 The conidial cells from 7-day culture slants were maintained in potato dextrose agar
89 (PDA; Difco, Detroit, Michigan, USA) at 25°C and harvested in sterile distilled water.
90 The resulting mixture of conidia and hyphae was transferred to a sterile tube and vortexed
91 for 1 min. Heavy particles of the suspension were allowed to settle for 3 to 5 min and the
92 upper homogeneous suspension was collected for inoculum, adjusting 1×10^4 conidia/ml
93 with a Thoma hemocytometer counting. Minimal inhibitory concentrations (MIC) of the
94 drugs were recovered after 48h of incubation at 35°C. MIC was defined as the lowest
95 concentration of the drug that allowed no growth in duplicate determination.

96 In order to obtain the minimum fungicidal concentration (MFC), volumes of 10 μ l
97 were taken from every well showing inhibition, spread onto PDA plates and incubated at
98 35°C for 48 h or until growth of subcultures from the growth control well were apparent.
99 The MFC of an antifungal agent was defined as the lowest drug concentration from
100 which one colony was visible on the agar plate (Guarro et al., 1997).

101 **Monitoring by BCT[®] system.** Plastic tissue culture dishes (Corning[®] Cell Bind Surface
102 35 mm Culture Dish, Product 3294, NY, USA) were used as culture vessels. The conidial
103 cells from 7-day culture slants were maintained in potato dextrose agar (PDA; Difco,
104 Detroit, Michigan, USA) at 25°C and harvested in sterile distilled water. The resulting
105 mixture of conidia and hyphae was transferred to a sterile tube and vortexed for 1 min.
106 Heavy suspension particles were allowed to settle for 3 to 5 min and the upper
107 homogeneous suspension was collected for inoculum, adjusting 1×10^6 conidia/ml with a
108 Thoma hemocytometer counting. A ten μ l (10^6 conidia) volume of the suspension was
109 dropped onto the center of a culture vessel coated with 0.05% (w/v) poly-l-lysine (PLL)
110 (Sigma Chemical Co.; Ltd., St. Louis, Mo., U.S.A.). The vessel was kept for 50 min at
111 room temperature and then gently washed with 1 ml of sterile distilled water. The conidia
112 not adhered to the poly-l-lysine were washed out by this procedure. After addition of 2ml
113 of RPMI 1640 onto the culture vessel, it was incubated at 35°C for 24h. Then, an
114 appropriate hypha growing horizontally on the bottom of vessel was selected and
115 monitored by the BioCell-Tracer[®] system (Hidan Co., Ltd., Chiba, Japan). Its growth rate
116 was programmed to measure about 20 μ m/5 min.

117 **The experimental design for BCT[®] testing.** A BCT[®] system (Hidan Co., Ltd., Chiba,
118 Japan) was used in our experiments (as shown in Figure 1). After the temperature of the

reaction chamber was stabilized at 35°C the reaction vessel was fixed at the microscopic stage. The entire system was turned on and focused on a single hyphal tip. Before the measurement was taken, one milliliter of RPMI, warmed to 35°C, was added to replace the old medium in the reaction vessel. A tracing marker was set at the hyphal apex position on the TV screen. At each measurement, the two-dimensional brightness pattern around the marker was analyzed to determine the position of the apex, which was then plotted. The growth rate was calculated by a computer program from the growth distance during the measuring interval (Oh et al. 1993).

The experimental BCT process was designed for 3h and 30 min with three phases, as follows: 0-30 min - the pre-exposure period (Pre-GR), to measure original hyphal growth data; 30-150 min - the exposure period (Exp-GR), to observe hyphal responses to AMB in RPMI added at 30 min; 150-210 min - the post-exposure period (Post-GR), to measure hyphal re-growth after AMB was removed by replacing the RPMI with no drug at 150 min. A total of four AMB concentrations were tested: 4.0 µg/ml (MIC determined in CLSI), 2.0, 1.0 and 0.5 µg/ml (concentrations above MIC determined in CLSI). Ten hyphae were repeatedly tested for each group of drug concentration. As controls, another ten hyphae were observed for 210 min without AMB addition.

Definition and statistical analysis of data The dynamic response curves of *Fusarium solani* hypha to growth control and various concentrations of amphotericin B were plotted after calculating the median growth hypha value for each 5-minute interval. The median growth value was used instead of the mean value due to high variability of the measurements obtained for each hypha in each of the three periods.

141 In order to obtain growth rate inhibition, the parameters originated from the BCT®
 142 testing were defined as follows:

- 143 1. Pre-GR: the median value of hyphal growth rates ($\mu\text{m}/\text{min}$) in the pre-exposure
 144 period (0-30 min). It is the initial growth rate of hyphae in RPMI before AMB is
 145 added.
- 146 2. Exp-GR and Exp-I%: Exp-GR is the median value of hyphal growth rates ($\mu\text{m}/\text{min}$)
 147 when AMB is maintained (30-150 min). Exp-I%: the inhibitory ratio of hyphal
 148 growth rate in the exposure period (Exp-GR) was calculated as $(\text{Pre-GR} - \text{Exp-GR})/\text{Pre-GR} \times 100$.
 149
- 150 3. Post-GR and Post-I%: Post-GR is the median value of the hyphal growth rates
 151 ($\mu\text{m}/\text{min}$) after AMB is removed (150-210 min). Post-I%: the inhibitory ratio of the
 152 hyphal growth in the post-exposure period (Post-GR) was calculated as $(\text{Pre-GR} - \text{Post-GR})/\text{PreGR} \times 100$.
 153

154 For final analysis, the median growth measures obtained for each hypha in each
 155 one of the periods described above was calculated and plotted as growth rate inhibition,
 156 using the statistical software SAS System for Windows (Milliken & Johnson, 1984);
 157 (Montgomery, 1991).

158

159 RESULTS

160 The identification was confirmed by the Research Center for Pathogenic Fungi
 161 and Microbial Toxicoses, Chiba University, Japan, using molecular biology. In BLAST
 162 search, the highest sequence similarities in the ITS and D1/D2 regions were observed in
 163 *Fusarium solani*, 98.4% and 99.1%, respectively.

The MIC and MFC values of AMB against *F. solani* determined by the broth dilution method (CLSI, 2002) were the same considering 50 h reading 4.0 µg/ml.

Preparation and inoculation of this sample of *Fusarium solani* LIF 8/98 in reaction vessels for BCT[®] testing shows inoculum adjustment to 1x10⁶ conidia/10 µl for 18 to 24 h at 35°C, coated with 0.05% (W/V) poly-L-lysine (Sigma Chemical Co.; Ltd., St. Louis, Mo., U.S.A.).

Determination of fungicidal (Exp-GR=0 and Post-GR=0) and fungistatic (Exp-GR=0 and Post-GR>0) activities shows that 4.0, 2.0, 1.0 and 0.5 µg/ml had fungicidal activities (Table 1).

Dynamic response curves of *Fusarium solani* LIF 8/98, using median results instead of mean in the 0-30 (Pre-GR); 30-150 (Exp-GR); and 150-210 (Post-GR) intervals are illustrated in Figure 2.

The inhibitory hyphae growth ratios determined by BioCell-Tracer[®] for 4.0 µg/ml of AMB were 98.5% (Exp-GR) and 100.0% (Post-GR.); for 2.0 µg/ml the inhibition ratios were 98.0% (Exp-GR) and 100.0% (Post-GR.); for 1.0 µg/ml, 99.5% (Exp-GR) and 100.0% (Post-GR.) and for 0.5 µg/ml, 85.1% (Exp-GR) and 97.8% (Post-GR).

Considering MIC as the lowest concentration that produces over 95% inhibition and considering MFC as the lowest concentration that produces over 99.9% inhibition. The MIC and MFC values of AMB against *F. solani* determined by the BCT[®] system were the same, 1.0 µg/ml.

DISCUSSION

186 No standardization report on BioCell-Tracer[®] system automatic growth of
 187 *Fusarium* species was found. For *Aspergillus* species, there are only some reports in the
 188 literature (Matsuoka et al., 1990; Yamada et al., 1992; Oh et al., 1993; Oh et al., 1995;
 189 Taguchi et al., 1995; Iida et al., 1999; Ansheng et al., 1999).

190 Ansheng Li et al., evaluating *Aspergillus* strains, coated culture vessels with
 191 0.01% PLL for adherence of $1 \times 10^4/10\mu\text{l}$ spores (Ansheng et al., 1999). Taguchi et al.
 192 coated culture vessels with 0.05% PLL (Taguchi et al., 1995), the same concentration we
 193 used, to obtain adhesion of $1 \times 10^6/\mu\text{l}$ *Fusarium solani* spores. The test media used by
 194 both authors was synthetic amino acid medium (Fungal) (SAAMF). In our study we used
 195 RPMI 1640, the same medium used in CLSI methodology.

196 One disadvantage was that this system was time consuming, as just one strain can
 197 be tested for each drug concentration by a specialized, trained technician. Oh et al.
 198 pointed out that the BCT[®] method has been focusing on the statistical problem of whether
 199 one single hypha can represent the total colony (Oh et al., 1993). To solve this problem,
 200 we tested ten hyphae for each experiment and calculated the median values obtained by
 201 BCT[®]. It was important to know the growth values shown by most hyphae. We
 202 concluded that the median hyphal growth for *Fusarium solani* LIF 8/98 was around 3.5
 203 $\mu\text{m}/5\text{min}$ (Figure 2).

204 The EUCAST method for broth microdilution, standardized only for *Candida* spp,
 205 considers a 95% growth inhibition, compared with the positive controls, for AMB MIC
 206 spectrophotometer readings. Visual evaluation, recommended by the CLSI M38-A
 207 method for filamentous fungi, considers no less than 100% MIC inhibition for this
 208 antifungal drug (Rodriguez-Tudella et al., 2001; CLSI 2002). Considering above 95% in

our BCT[®] system the inhibition obtained by testing 4.0, 2.0 and 1.0 $\mu\text{g/ml}$ was statistically the same. A great difference was observed with 0.5 $\mu\text{g/ml}$, which afforded only 85.1% inhibition (Exp-GR); then MIC determined by the BCT[®] system for AMB was considered as 1.0 $\mu\text{g/ml}$. The AMB concentrations 4.0, 2.0 and 1.0 $\mu\text{g/ml}$ inhibited hyphae in 50 min and 0.5 $\mu\text{g/ml}$ of AMB inhibited hyphae in 100 min (Figure 2).

We showed almost the same values of AMB MIC and MFC for *Fusarium solani* using conidia; and two concentrations less show the same MIC and MFC values using hyphae. The same analysis to obtain MIC and MFC using pure hyphae inoculum is a significant advantage presented by this new system (Yamada et al. 1992). Our results agree in part with those of Guarro et al., who obtained considerable MIC and MFC discrepancies when the two types of inocula were used for *Cladosporium*, *Paecilomyces*, *Scopulariopsis* and *Cladophialophora* species (Guarro et al. 1997).

In this case our data suggest that hyphae are more susceptible to AMB than conidia. Some authors have reported that, in *Fusarium* infections, the hyphal wall is often less rigid, and twisted filaments are more frequent (Romano et al., 1998). The reason for the variability in MIC obtained by different methods is due to the fact that conidium is a resistant form of fungi in the environment and their metabolism is lower than hypha metabolism present in tissue. The discrepancies found between results obtained with the two types of inocula seem, to some extent, to be logical, because the cell wall composition of many fungal species is not the same under all circumstances, due to the different structural requirements of tubular and more or less spherical cells (Guarro et al., 1997). We also agree with this author for the reason that there are no reports about

231 different *Fusarium* inoculum in the literature to compare with our results (Guarro et al.,
232 1997).

233 This study was good to measure the *Fusarium solani* hypha growth, determining
234 the MIC and MFC, the fungistatic and fungicidal effect values at the same time, as well
235 as how long the *Fusarium solani* hypha takes to be inhibited by AMB.

236 Our findings lead us to conclude that antifungal MICs vary between conidia and
237 hyphae of *Fusarium solani*. Hypha showed more sensibility than conidia to polienic
238 antifungal drug.

239

240 **ACKNOWLEDGEMENTS**

241 This work was supported by grants from FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do
242 Estado de São Paulo), Brazil. A. B. A. Teixeira is a PhD program student supported by
243 grants from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior),
244 Brazil. We thank the Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicoses,
245 Chiba University, Japan for the training program. We also thank Luzia L. Fernandes for
246 technical support.

247

248 **REFERENCES**

- 249 Ansheng, Li., Taguchi, H., Miyaji, M., Nishimura, K., Shaoxi, W., 1999. Study on the
250 hyphal responses of *Aspergillus fumigatus* to the antifungal agent by Biocell-Tracer.
251 Mycopathologia 148: 17-23
- 252 Bezjak, V., 1985. Standardization of a hyphal inoculum of Aspergilli for amphotericin B
253 susceptibility testing. J. Clin. Microbiol. 21: 509-512.

- 254 Committee for Clinical Laboratory institute. 2002. Reference Method for broth dilution
 255 antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi; approved
 256 standard, NCCLS document M38-A. National Committee for Clinical Laboratory
 257 Standards, Wayne, Pa.
- 258 Espinel-Ingroff, A., Boyle, K., Sheehan, D.J., 2001. Vitro antifungal activities of
 259 voriconazole and reference agents as determined by NCCLS methods: Review of the
 260 literature. *Mycopathologia* 150: 101-115
- 261 Guarro, J., Llop, C., Aguilar, C., Pujol, I., 1997. Comparison of *in vitro* antifungal
 262 susceptibilities of conidia and hyphae of filamentous fungi. *Antimicrob. Agents*
 263 *Chemother.* 41(12): 2760-2762
- 264 Iida, Y., Oh, K., Saito, M., Matsuoka, H., Kurata, H., Natsume, M., Abe, H., 1999.
 265 Detection of antifungal activity in *Anemarrhena asphodeloides* by sensitive BCT method
 266 and isolation of its active compound. *J. Agric. Food Chem*, 47: 584-587
- 267 Katsu, M., Kidd, S., Ando, A., Moretti-Branchini, M.L., Mikami, Y., Nishimura, K.,
 268 Meyer, W., 2004. The internal transcribed spacers and 5.8S rRNA gene show extensive
 269 diversity among isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *FEMS Yeast*
 270 *Research.* 4: 377-388.
- 271 Kartzman, C. P., Robnett, C. J., 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous
 272 yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences.
 273 *Antonie Leeuwenhoek* 73: 331-371.

- 274 Kuzucu, C., Rapino, B., McDermott, L., Hadley, S., 2004. Comparison of the semisolid
275 agar antifungal susceptibility test with the NCCLS M38-P broth microdilution test for
276 screening of filamentous fungi. *J Clin Microbiol* 42 (3): 1224-1227
- 277 Matsuoka, H., Yoshikazu, Ii., Takekawa, Y., Teraoka, T., 1990. Evaluation of antifungal
278 volatile compounds on the basis of the elongation rate of a single hypha. *Appl Environ*
279 *Microbiol* 56 (12): 3779-3784
- 280 Milliken, G.A. & Johnson, D.E. *Analysis of Messy Data. Volume I: Designed*
281 *Experiments*. New York: Van Nostrand Reinhold Company. 1984. p.
- 282 Montgomery, D. C., *Design and Analysis of Experiments*. 3rd ed. New York: John Wiley
283 & Sons. 1991. p.
- 284 Oh, K., Matsuoka, H., Nemoto, Y., Sumita, O., Takatori, K., Kurata, H., 1993.
285 Determination of anti-*Aspergillus* activity of antifungal agents based on the dynamic
286 growth rate of a single hypha. *Appl Microbiol Biotechnol* 39: 363-367
- 287 Oh, K., Yang, Hc., Matsuoka, A., Yamamoto, Kurata, H., 1995. Combined effect of
288 amphotericin B and flucytosine on hypha growth of *Candida albicans* estimated at a
289 single hypha level. *J Med Vet Mycol* 33: (3): 01-04
- 290 Ostrosky-Zeichner L., Marrm K, A., Rex, J H., Cohen, S. H., 2003. Amphotericin B:
291 Time for a new “Gold Standard”. *Clin Infect Dis* 37: 415-425
- 292 Rodriguez-Tudela, J. L., Berenguer, J., Martinez-Suarez, J. V., Sanchez, R., 1996.
293 Comparison of a spectrophotometric microdilution method with RPMI 2% glucose with

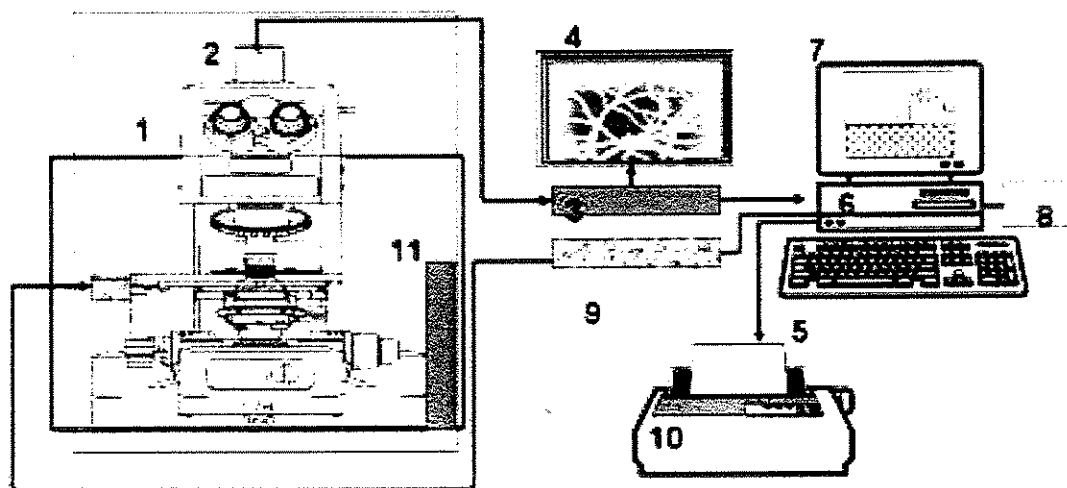
- 294 the National Committee for Clinical Laboratory Standards reference macrodilution
 295 method M27-P for *in vitro* susceptibility testing of amphotericin B, flucytosine and
 296 fluconazole *against Candida albicans*. Antimicrob. Agents Chemother 40 (9): 1998-2003
- 297 Romano, C., Miracco, C., Difonzo, E.M. 1998. Skin and nail infections due to *Fusarium*
 298 *oxysporum* in Tuscany, Italy. Mycoses 41: 433-437.
- 299 Rombaux, E., Bertrand, B., Delos, M., Doyen, 1996. Lethal disseminated *Fusarium*
 300 infection with sinus involvement in the immunocompromised host: case report and
 301 review of the literature. Rhinology 34: 237-241
- 302 Sugiura, Y.; Barr, J. R.; Barr, D. B., Brock, J. W., Elie, C. M., Ueno, Y., Patterson, D. G.
 303 J., Potter, M. E., Reiss, E. 1999. Physiological characteristics and mycotoxins of human
 304 clinical isolates of *Fusarium* species. Mycol. Rev. 103(11):1462-1468
- 305 Taguchi, H., Miyaji, M., Nishimura, K., Xu Min-Li, 1995. Study on the synergistic effect
 306 of amphotericin B and 5-fluorocytosine on the growth rate of single hyphae of
 307 *Aspergillus fumigatus* by a Biocell-tracer system. Mycoscience 36: 341-344
- 308 Yamada, S.; Cao, J., Sumita, O., Kirasawa, K., Kurata, H., Oh, K., Matsuoka, H., 1992.
 309 Automatic antifungal activity analyzing system on the basis of dynamic growth process
 310 of a single hypha. Mycopathologia, 118: 65-69

311 **LEGENDS**

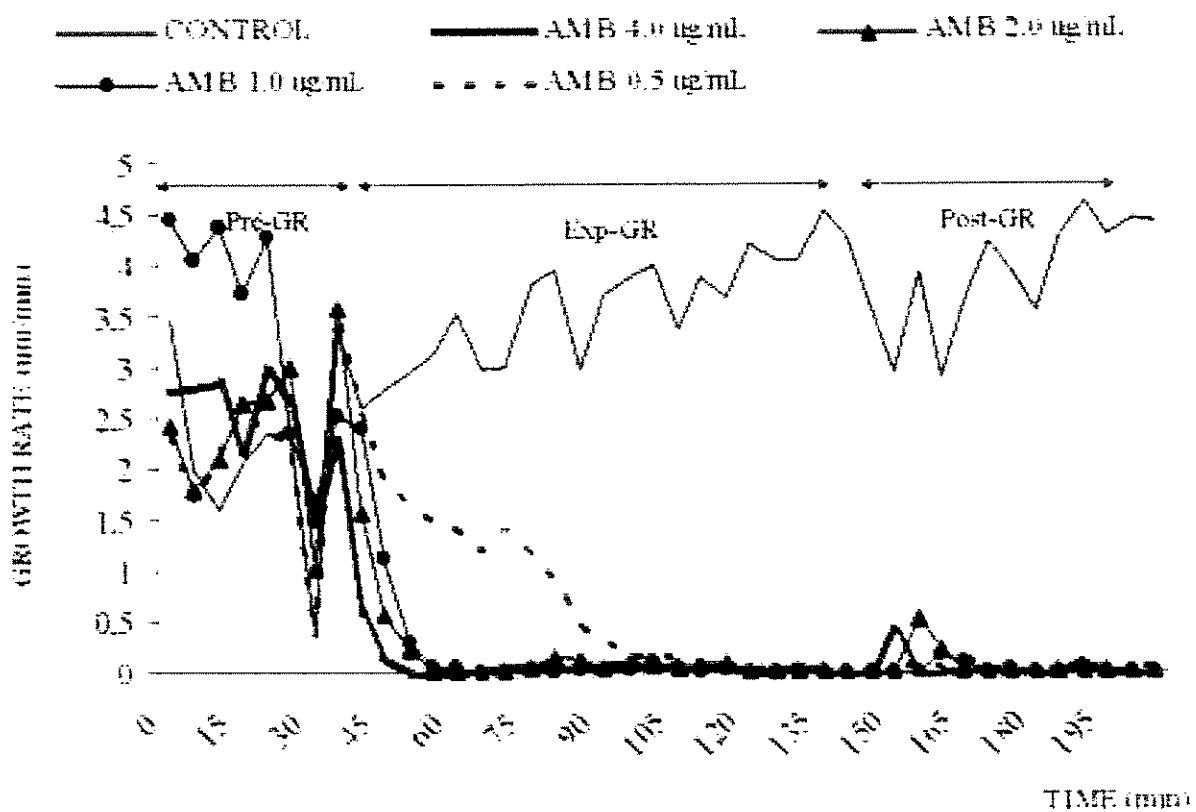
312 Figure 1: BioCell-Tracer®: 1. Microscope; 2. CCD camera; 3. Image memory board; 4.
313 TV monitor, 5. Keyboard, 6 Microcomputer, 7. Computer display, 8. Hard disk, 9.
314 Automatic stage controller, 10. Printer, 11. Temperature control

315 Table 1: Median of hyphal growth ($\mu\text{m}/5\text{min}$) for *F. solani* in pre-exposure period (Pre-
316 GR), exposure period (Exp-GR) to different concentrations of amphotericin B, and in
317 post-exposure period (Post-GR) obtained by the BCT system.

318 Figure 2: Hyphal growth curve during all experimental periods (pre-exposure period: 0-
319 30 min; exposure period: 30-150 min; post-exposure period: 150-210 min) of *Fusarium*
320 *solani* with various concentrations of amphotericin B



Antifungal drug	Antifungal drug concentration $\mu\text{g}/\text{ml}$	Growth in period (days) = 10		
		Pre-GR	Exp-GR	Post-GR
Amphotericin B	2.0	1.16	0.12	0
	1.2	1.22	1.02	0
	0.5	2.15	0.61	0
	0.3	0.29	1.04	0.05



3.2 - Artigo 2

Mycophatologia (2005) 116 (4):291-296

Artigo publicado

Evaluation of *Fusarium solani* hyphae and conidia susceptibility to amphotericin B and itraconazole: study of a clinical case

A.B.A. Teixeira¹, M.L. Moretti², P. Trabasso², A. von Nowakonski¹, F.H. Aoki², A.C. Vigorito³, M. Miyaji⁴, K. Nishimura⁴, H. Taguchi⁴ & A.Z. Schreiber¹

¹Clinical Pathology Department, State University of Campinas, São Paulo, Brazil; ²Infectious Diseases Division, State University of Campinas, São Paulo, Brazil; ³Hematology Division, School of Medical Sciences, State University of Campinas, São Paulo, Brazil; ⁴Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicosis, Chiba University, Japan

Received 14 February 2005; accepted in revised form 25 May 2005

Abstract

Fusarium species are hyaline moulds belonging to the hyalohyphomycosis group that are usually found in the soil and plants. This organism has emerged as a cause of disseminated invasive disease. The correlation between *in vitro* value and clinical efficacy is low and many patients remain unresponsive to treatment despite *in vitro* susceptibility. We determined growth control for *Fusarium solani* using the BioCell-Tracer[®] system that measures the growth rate of a single fungal hypha, and the effect of different concentrations of amphotericin B and itraconazole. The MIC for these two drugs was also determined by a broth microdilution technique, using RPMI 1640. Different MICs for amphotericin B were obtained by the two different methods. This paper describes a case of infection due to *Fusarium solani* in an allogeneic bone marrow transplanted patient, the microbiological diagnostic, antifungal susceptibility tests for conidia and hypha and clinical correlation.

Key words: Amphotericin B, BioCell-Tracer[®], *Fusarium solani*, itraconazole, microdilution

Introduction

Fungi of the genus *Fusarium* are non-dematiaceous hyaline moulds belonging to the hyalohyphomycosis group that are saprophytes commonly found in the soil, pathogenic for plants [1–3]. *Fusarium* species are widely present in the environment. It has been suggested that airborne conidia might invade the respiratory tract with primary lung or sinus localisation or inoculated through a skin disruption, such as an indwelling central venous catheter, a wound or a burn [4].

Recently, *Fusarium* species have emerged as opportunistic fungal pathogens in the leukaemia, cancer or AIDS patients [5]. These infections have usually been limited to superficial mycoses, but

recently the number of deep tissue and disseminated infections has greatly increased, particularly in patients with underlying immunosuppressive conditions [2]. *Fusarium* species now represent the second most frequent mould-caused invasive fungal infections in this latter population [6].

F. solani, *F. oxysporum*, *F. chlamydosporum* and *F. moniliforme* have all been associated with human disseminated infections [1]. Invasive fusariosis is untreatable by current antifungal therapy [5]. Most *Fusarium* species are resistant to available chemotherapy, thus early diagnosis is of prime importance [5]. The prognosis for invasive fusariosis is poor, with a mortality rate reaching 70–80% of disseminated cases. Systemic antifungal agents demonstrate poor efficiency both *in vitro* and *in vivo*. Lipid

formulations of amphotericin B seem to be more effective *in vivo* than conventional amphotericin B, with a response rate of 82% ABLC [4].

Disseminated fusariosis is almost always fatal despite antifungal therapy in the setting of persistent profound neutropenia. The recovery of adequate neutrophil levels is the most important factor in the resolution of fusarial infection [7]. The survival rate was 76% for patients who recovered from neutropenia, as opposed to practically zero for persistently neutropenic patients [4].

The differentiation of *Fusarium* species from other filamentous fungal opportunists is important to establish the correct clinical diagnosis, in view of their different susceptibilities to antifungal drugs [5]. It is necessary to measure the susceptibility of causative fungi to antifungal agents and several methods have been reported, including microdilution [8]. The clinical application of MICs can be also questioned because the current techniques for moulds, using inocula consisting of conidia, measure the MIC necessary to inhibit cells which are often not the morphological form of the causative fungus seen *in vivo* [9]. For this purpose, new MIC testing methods for filamentous fungi are being sought. The BioCell-Tracer® is a new apparatus which automatically traces hyphal tips and determines their growth rate [10].

This paper describes a case of infection due to *Fusarium solani* in an allogeneic bone marrow transplanted patient, the microbiological diagnostic, antifungal susceptibility tests for conidia and hypha and clinical correlation.

Case report

A 23-year-old pregnant woman affected by chronic myeloid leukaemia (CML) received allogeneic bone marrow transplantation using foetal umbilical cord blood in August 1997. During the pre-engraftment phase, no clinical or microbiologic infections were diagnosed. Acute graft vs. host disease was not observed. Swab cultures from the oral cavity, nose, urethra and rectum were taken from the patient. These specimens were cultured for fungal organisms and the results were negative. Development of fever occurred on day +2 after transplant. Amphotericin B desoxycholate 1 mg/kg/d were started on day +12. Fever persisted

despite empirical antimicrobial therapy. Blood, urine and catheter cultures until day +20 were all negative for bacteria and fungi. On day +21 the patient developed myalgia and generalised erythematous papules. Fever persisted despite amphotericin B therapy and two new blood cultures were collected. On day +23, after 48 h incubation, Bact/Alert® pointed as positive. Acridine-orange stain permitted the observation of structures suggestive of fungi further identified as *Fusarium* species on +27. Skin lesion, with positive histopathology for hypha, when cultured in Sabouraud Dextrose Agar slants grew *Fusarium* species after 5 days of incubation. The patient died of septicaemia caused by *Fusarium solani*, 1 month after the transplant despite 18 days of antifungal treatment.

Materials and methods

Microorganism isolation and identification

Two aerobic bottles of blood cultures were collected and incubated at 35 °C on automatic Bact/Alert® (Biolab Merieux) equipment. Gram and Acridine-orange stains were performed from positive bottles. Cultures were performed from the Bact/Alert® positive bottles and skin biopsies in Sabouraud Dextrose agar slants at room temperature. The species was identified using standard morphologic criteria after subculture by microscopic and macroscopic examination [11], in addition to molecular identification. DNA was extracted by GentLE™ (TaKaRa, Oosaka, Japan). The ribosomal DNA internal transcribed ITS1-5.8S-ITS2 sequences and D1/D2 domain region sequence of the large-subunit (26S) rDNA were analyzed using following PCR primer pairs: ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACA-AGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') for ITS region, and 26SS(AAA CCA ACA GGG ATT GCC TC) and 26Sa (GTG GCT TAA AGT CAT TAC GCC) for D1/D2 domain [12, 13].

Broth microdilution test

In vitro susceptibility testing to antifungal drugs such as amphotericin B and itraconazole was

performed by the broth microdilution method in RPMI 1640 medium (Sigma) supplemented with both L-glutamine and 0.165 morpholinepropane-sulfonic acid (MOPS), pH 7.0 [8]. The inocula contained 1×10^4 conidia/ml final concentration. Minimal inhibitory concentrations (MIC) of the drugs were recovered after 48 h of incubation at 35 °C. MIC was defined as the lowest concentration of the drug allowing no growth in duplicate determination.

Preparation for monitoring by BioCell-Tracer® system

Plastic tissue culture dishes (35×10 mm, NY, USA) were used as culture vessels. The conidial cells from 7-day cultures maintained in potato dextrose agar slants (PDA) at 25 °C were harvested with sterile distilled water. The resulting mixture of conidia and hyphae was transferred to a sterile tube and was vortexed for 1 min. Heavy suspension particles were allowed to settle for 3–5 min. and the upper homogeneous suspension was collected for inoculum adjustment to 1×10^6 conidia/ml by use of Thoma's haemocytometer. Ten μ l (10^6 conidia) of the suspension were dropped into the centre of a culture vessel bottom coated with 0.05% (W/V) poly-L-lysine (Sigma Chemical Co.; Ltd., St. Louis, MO., USA). The vessel was kept for 50 min at room temperature then gently washed with 1 ml of sterile distilled water. By this procedure, conidia not adhering to the poly-L-lysine were washed out. After addition of 2 ml of RPMI into the culture vessel, it was incubated for 24 h at 35 °C. Then, an appropriate hypha that was growing horizontally at the vessel bottom was selected and monitored by the BioCell-Trace® system (Hidan Co., Ltd., Chiba, Japan). BCT® can detect the growth rate change of single hypha at every 30 s to a precision of $0.1 \mu\text{m min}^{-1}$. Its growth rate was measured for about 5–5 min (e.g., A.B.A. Teixeira, article in preparation).

Results

The blood bottles on Bact/Alert® were found positive after 48 h incubation. The Gram stain was negative but Acridine-orange stain permitted the observation of structures suggestive of fungi (Figure 1). Strains isolated from blood cultures

and tissue biopsies were identified as *Fusarium* by fast-growing colony, attaining a diameter of 8 cm after 8 days at 25 °C on PDA. The colonies appeared cotton-like white and bluish brown tinges and the appearance of banana-shaped short macroconidia on microscopic examination. *F. solani* was identified to the species level by the presence of sporodochial conidiophores, intercalary chlamydospores with hyphae and conidia, oval microconidia forming false wet heads and monophialides with a rather distinct collarette obtained from mycelia grown on potato dextrose agar [11]. The identification was confirmed using molecular biology by the Research Centre for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicosis, Chiba University, Japan. In BLAST search, the highest sequence similarities in ITS and D1/D2 regions were observed in *Fusarium solani* by 98.4% and 99.1%, respectively.

The MIC value of AmB against *F. solani* determined by the broth dilution method was $2.0 \mu\text{g/ml}$, although the inhibitory ratio of hyphae growth determined by BioCell-Trace® for this concentration to AmB was 99.50% during exposure to drugs (Exp-GR) and 99.95% after exposure to drugs (Post-GR). For $1.0 \mu\text{g/ml}$ the inhibition ratio was 90.37% (Exp-GR) and 99.19% (Post-GR); for $0.5 \mu\text{g/ml}$ of AmB, 97.21% (Exp-GR) and 98.97% (Post-GR). The MIC values of Itraconazole against *F. solani* determined by the broth dilution method was $128.0 \mu\text{g/ml}$. The inhibitory ratio of the hyphae growth determined by BioCell-Trace® for this concentration to Itraconazole was 12.94% (Exp-GR) and -2.64% (Post-GR) (Figure 2).

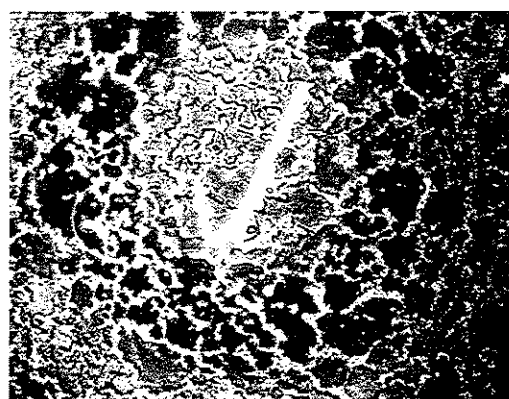


Figure 1. Structures of *Fusarium solani* with Acridine-orange stain.

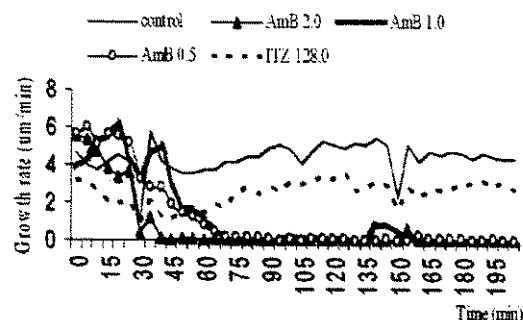


Figure 2. Dynamic response curves of *Fusarium solani* to various concentrations of amphotericin B and Itraconazole.

Discussion

Nucci et al. (2004) characterized the epidemiology and prognostic factors of invasive fusariosis in hematopoietic stem cell transplant recipients: the median time period between transplantation and diagnosis of fusariosis was 48 days, the median age is 22 years, more likely to have chronic myeloid leukaemia or aplastic anemia, received an MRD transplant, and to be neutropenic at the time of diagnosis of fusariosis [14]. We detected

filamentous fungi fungaemia on day +23 and identified the causative agent *Fusarium* spp, on day +27. The patient was a 22 years old female affected by chronic myeloid leukemia (CML) received allogeneic bone marrow transplantation and not developed acute graft vs. host disease.

The sensitivity of blood cultures varies according to the use of antifungal agents and the species of causative organism. Unless these agents are inactivated in culture bottles, conventional blood cultures might produce false-negative results. The culture bottles contain resins able to remove antibacterial agents, but they were ineffective for removing antifungal agents [15]. We evaluated here the possibility of rapid detection of filamentous fungi in automated blood culture system despite the constant temperature and the necessity to perform Acridine-orange for every false negative blood culture observed by Gram strain.

Amphotericin B seems to have the highest *in vitro* activity, with about 50% of isolates being susceptible to this drug and MIC for 90% of the strains tested ranging from 1.0 to 4.0 µg/ml for invasive fusariosis [4]. In our results, the MIC was 2.0 µg/ml of AmB to *Fusarium solani*. The

Inhibitory growth
ratio BCT® (%)

	Pre-GR	Post-GR
Control	-8.96%	-7.39%
AmB 2.0	99.50%	99.95%
AmB 1.0	98.37%	99.19%
AmB 0.5	97.21%	98.97%
ITZ 128.0	12.94%	-2.64%

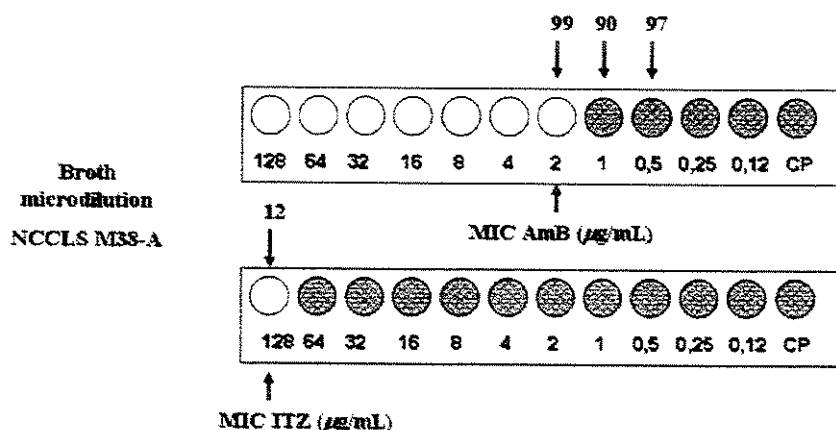


Figure 3. Comparison of data obtained by NCCLS broth microdilution test and inhibition rates obtained by BCT® system.

pharmacokinetic of AmB is not completely understood. Peak serum concentrations of AmB are 1.5–2.0 mg/l and the drug is widely distributed. Tissue concentrations, on the other hand, do not follow those in the serum [16].

Teixeira et al. (2003) reported a case of *Chaetomium* systemic infection where the patient received amphotericin B desoxycholate and was cured after a 3.0 gm total dose [17].

New azoles, including voriconazole, posaconazole and ravuconazole, might be promising and provide alternative therapy. *In vitro* studies are encouraging, but clinical data are insufficient to allow firm conclusions to be drawn [4].

The recommended dosis of Amphotericin B for treatment of fusariosis is 3–5 mg/kg/d [18]. The clinical failure observed in this case could be attributed to the low dose administered or to the low susceptibility to the conidial form of the fungus to the drug. Unfortunately the correlation between *in vitro* values and clinical efficacy is low and many patients remain unresponsive to treatment despite *in vitro* susceptibility [4].

Our data indicate that hyphae monitored using BCT[®] system are more susceptible than conidia (Figure 3). However, all these techniques use inocula consisting exclusively of conidia, which are usually not the morphological form of the infective fungus manifested *in vivo*, even though several genera, such as *Acremonium*, *Fusarium*, and *Paecilomyces*, are able to occasionally produce conidia *in vivo* [19].

Acknowledgements

We thank FAPESP and the Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicosis, Chiba University, Japan. Ana Beatriz Alkmim Teixeira is a doctoral degree student supported by grants from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)–Brazil. We also thank Luzia L. Fernandes for technical support.

References

1. Raad I, Hachem R. Treatment of central venous catheter-related fungemia due to *Fusarium oxysporum*. Clin Infect Dis 1995; 20: 709–711.
2. Castellá G, Cano J, Guarro J, Cabañes FJ. DNA fingerprinting of *Fusarium solani* isolates related to cutaneous infection in a sea turtle. Med Mycol 1999; 37: 223–226.
3. Raad I, Tarrand J, Hanna H, Albitar M, Janssen E, Boktour M, Bodey G, Mardani M, Hachem R, Kontoyiannis D, Whimbey E, Rolston K. Epidemiology, Molecular Mycology and Environmental sources of *Fusarium* infection in patients with cancer. Infect Control Hosp Epidemiol 2002; 23(9): 532–537.
4. Letscher-Bru V, Campos F, Waller J, Randriamahazaka R, Candolfi E, Herbrecht R. Successful outcome of treatment of a disseminated infection due to *Fusarium dimerium* in a leukemia patient. J Clin Microbiol 2002; 40(3): 1100–1102.
5. Sugiura Y, Barr JR, Barr DB, Brock JW, Elie CM, Ueno Y, Patterson DGI, Potter ME, Reiss E. Physiological characteristics and mycotoxins of human clinical isolates of *Fusarium* species. Mycol Rev 1999; 103(11): 1462–1468.
6. Nutti M, Anaissie E. Cutaneous infection by *Fusarium* species in healthy and immunocompromised host: implications for diagnosis and management. Clin Infect Dis 2002; 35: 909–920.
7. Yildiran T. *Fusarium* fungemia in severely neutropenic patients. Mycoses 1998; 41: 467–469.
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi. Approved standard M38-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards 2002; Wayne, PA.
9. Bezjak V. Standardization of a hyphal inoculum of *Aspergilli* for amphotericin B susceptibility testing. J Clin Microbiol 1985; Apr: 509–512.
10. Taguchi H, Miyaji M, Nishimura K, Xu Min-Li. Studied on the synergistic effect of amphotericin B and 5-fluorocytosine on the growth rate of single hyphae of *Aspergillus fumigatus* by a Biocell-tracer system. Mycoscience 1995; 36: 341–344.
11. Gerlach W, Nirenberg H. The Genus *Fusarium*: a Pictorial Atlas. Institut für Mikrobiologie Berlin-Dahlem: Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft. 3-489-20900-1. 1982; 363–368.
12. Katsu M, Kidd S, Ando A, Moretti-Branchini ML, Mikami Y, Nishimura K, Meyer W. The internal transcribed spacers and 5.8S rRNA gene show extensive diversity among isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex. FEMS Yeast Res 2004; 4: 377–388.
13. Kartzman CP, Robnett CJ. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. Antonie Leeuwenhoek 1998; 73: 331–371.
14. Nucci M, Marr KA, Queiroz-Telles F, Martins CA, Trabasso P, Costa S, Voltarelli JC, Colombo AL, Imhof A, Pasquini R, Maiolino A, Souza CA, Anaissie E. *Fusarium* infection in hematopoietic stem cell transplant recipients. Clin Infect Dis 2004; 38: 1237–1242.
15. Kami M, Machida U, Okuzumi K, Matsumura T, Mori SI, Hori A, Kashima T, Kanda Y, Takaue Y, Sakamaki H. Effect of fluconazole prophylaxis on fungal blood cultures: an autopsy-based study involving 720 patients with hematological malignancy. Br J Haematol 2002; 117: 40–46.
16. Ostrosky-Zeichner L, Marr KA, Rex JH, Cohen SH. Amphotericin B: time for a new "Gold Standard". Clin Infect Dis 2003; 37: 415–425.

17. Teixeira ABA, Trabasso P, Moretti ML, Aoki FH, Vigorito AC, Miyaji M, Mikami Y, Takada M, Schreiber AZ. Phaeohyphomycosis caused by *Chaetomium globosum* in an allogeneic bone marrow transplant recipient. *Mycopathologia* 2003; 156: 309-312.
18. Samuel R, Truant AL, Suh B. Cumitech 42, Infections in Hemopoietic Stem/Cell Transplant Recipients. In: Truant AL, ed. Coordinating. ASM Press, Washington, DC, 2005.
19. Guarro J, Llop C, Aguilar C, Pujol I. Comparison of *in vitro* antifungal susceptibilities of conidia and hyphae of

filamentous fungi. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41(12): 2760-2762.

Address for correspondence: Dr. Angelica Zaninelli Schreiber, Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Cidade Universitária Zeferino Vaz, Cx. Postal 6142, CEP 13083-970, Campinas, São Paulo, Brazil
Phone: +55-19-3289-3273; Fax: +55-19-3788-9434
E-mail: zaninele@fcm.unicamp.br

3.3 - Trabalho completo 3

45th ICAAC 2005, Washington, DC, EUA.

Abstract publicado nos anáís do congresso

STUDY ON THE HYPHAL RESPONSES OF *FUSARIUM* SPECIES TO THE AMPHOTERICIN B AND ITRACONAZOLE BY BIOCELL-TRACER®

A.B.A. TEIXEIRA¹, M.L. MORETTI², P. TRABASSO², K. NISHIMURA³, H. TAGUCHI³, A.Z. SCHREIBER¹.

¹Clinical Pathology Department, ²Infectious Diseases Division, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, São Paulo, Brazil and the ³Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicoses, Chiba University, Japan.

Corresponding author: Dr. Angélica Zaninelli Schreiber

Departamento de Patologia Clínica; Faculdade de Ciências Médicas; Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.

Cidade Universitária Zeferino Vaz, Cx. Postal 6142, CEP 13083-970

Campinas, São Paulo, Brazil. Phone: 55-19-3289-3273; Fax: 55-19-3788-9434.

E-mail: zaninele@fcm.unicamp.br

Abstract

Background: BioCell-Tracer[®] (BCT) system has been considered as a useful method to evaluate activity of antifungal drugs on filamentous fungi. BCT[®] can detect the growth rate change of a single hypha at every 30s to a precision of $0.1 \mu\text{m min}^{-1}$. The minimal inhibitory concentrations (MICs) of several antifungal agents can be determined based on the growth rate of a single hypha. Sensitivity of antifungal activity detected of this system was 100-fold higher than that of conventional methods. There is no report about automatic growth evaluation for *Fusarium* sp by BCT[®] system. **Methods:** The hyphal responses to amphotericin B (AMB) and itraconazole (ITZ) of *F. solani* (3) and *F. oxysporum* (1) isolates were studied with a BCT[®] system. The numerical data were recorded as the original growth rate (Pre-GR), the growth rate under the antifungal agents effect (Exp-GR) and the growth rate after antifungal agents were removed (Post-GR). Based on above numerical data, the inhibitory rates in the exposure and post exposure periods were calculated as the exposure inhibition (Exp-I%) and post exposure inhibition (Post I%) values. For final analysis, the median growth measure obtained for each hypha in each one of the periods above was calculated using the SAS System for Windows. **Results:** It was found there were variable inhibitory rate values (I%) in individual hyphae corresponding to three different AMB concentrations 2.0, 1.0 and $0.5 \mu\text{g/ml}$ and itraconazole $128.0 \mu\text{g/ml}$. The median of hyphal growth to *F. solani* strains were 3.4, 4.3 and $1.0 \mu\text{m/5min}$, while to *F. oxysporum* was $6.5 \mu\text{m/5min}$. **Conclusion:** We concluded that hyphal growth rate and the sensitivity to AMB and ITZ were variable in different species of *Fusarium* and can also vary for different strains of the same specie.

Key words: *Fusarium* sp; BioCell-Tracer[®], amphotericin B, itraconazole, hyphal response

Introduction

Fungi of the genus *Fusarium* are non-dematiaceous hyaline moulds belonging to the hyalohyphomycosis group that are saprophytes commonly found in the soil and important mycotoxin producers [Raad et. al, 2002; Castellá et. al, 1999; Raad & Hachen, 1995; Sander et. al, 1998].

Recently the number of deep tissue and disseminated infections has greatly increased, particularly in patients with underlying immunosuppressive conditions [Castellá et. al, 1999; Eljaschewitschet et. al, 1996; Letscher-Bru et. al, 2002]

The *Fusarium* species that most frequently cause human infections are *F.solani*, *F. oxysporum*, *F. chlamydosporum* and *F. verticillioides* [Raad et. al, 1995, Sander et. al, 1998].

Invasive fusariosis is highly resistant and often respond poorly to systemic antifungal therapies that demonstrate poor efficiency both *in vitro* and *in vivo* [Sigiura et. al, 1999; Romano et. al, 1998; Letscher-Bru et. al, 2002].

It is necessary to measure the susceptibility of causative fungi to antifungal agents and several methods have been reported, including microdilution using inocula consisting of conidia [NCCLS, 2002], which are often not the morphological form of the causative fungus seen *in vivo* [Bezjak et. al, 1985].

The BioCell-Tracer® (Hidan Co., Ltd, Kashiwa, Japan) is a new apparatus which automatically traces hyphal tips and determines their growth rate [Taguchi et. al, 1995]. BioCell-Tracer® (BCT) system (Figure 1, 2) has been considered as a useful method to evaluate activity of antifungal drugs on filamentous fungi [Ansheng et. al, 1999]. BCT® can detect the growth rate change of a single hypha at every 30s to a precision of $0.1 \mu\text{m min}^{-1}$ [Oh et al. 1993]. Therefore, a transient decrease in the growth rate of a test hypha can be detected. The sensitivity of antifungal activity detected of this system was 100-fold higher than that of conventional methods [Iida et. al, 1999]. The minimal inhibitory concentrations (MICs) of several antifungal agents can be determined based on the growth rate of a single hypha [Taguchi et. al, 1995]. There is no report about automatic growth evaluation for *Fusarium* sp by BCT® system.

This study describes how many micrometers the hypha of *Fusarium* spp grew in 5 minuters measuring the hyphal growth without interference; observing the hyphal responses to antifungal drug and measuring the hyphal re-growth after the antifungal drug was removed. And the variable distributions of the inhibitory ratios of the *Fusarium* spp hyphal growth rates from each concentration of AMB and itraconazole.

Methods

The hyphal responses to amphotericin B (AMB) and itraconazole (ITZ) of *F. solani* (3) and *F. oxysporum* (1) isolates were studied by the BCT® system.

Preparation for monitoring by BioCell-tracer® system

Plastic tissue culture dishes (Corning® Cell BIND® Surface 35mm Culture Dish, Product 3294, NY, USA) were used as culture vessels. The conidial cells from 7-day culture slant were maintained in potato dextrose agar (PDA; Difco, Detroit, Michigan, USA) at 25°C, and were harvested in sterile distilled water. The resulting mixture of conidia and hyphae was transferred to a sterile tube and vortexed for 1 min. Heavy particles of the suspension were allowed to settle for 3 to 5 min and the upper homogeneous suspension was collected for inoculum adjusting to 1×10^6 conidia/ml with a Thoma haemocytometer counting. A ten μ l (10^6 conidia) volume of the suspension was dropped onto the center of a culture vessel coated with 0.05% (w/v) poly-l-lysine (Sigma Chemical Co.; Ltd., St. Louis, Mo., U.S.A.). The vessel was kept for 50 min at room temperature then gently washed with 1 ml of sterile distilled water. The conidia not adhered to the poly-l-lysine were washed out by this procedure. After addition of 2 ml of RPMI 1640 into the culture vessel, it was incubated at 35°C for 24h. Then, an appropriate hypha growing horizontally on the bottom of the vessel was selected and monitored by the BCT system (Hidan Co. Ltd.). The hyphal growth rate was measured for about 5 min.

Automatic system for the analysis of the hyphal growth rate

The apparatus was able to trace the tip of a growing hypha with a growth rate of 0.5 to 20 μ m/min. At each measurement, the two-dimensional brightness pattern around the marker was analyzed to determine the position of the apex, which was then plotted. The growth rate was calculated by a computer program from the growth distance during the measuring interval [Oh et. al, 1993].

Definition and statistical analysis

The experimental BCT process was designed for 3h and 30 min with three phases: 0-30 min - pre-exposure period (Pre-GR) to measure hyphal growth without interference; 30-150 min - exposure period (Exp-GR) to observe hyphal responses to antifungal drug in RPMI

medium added at 30 min; 150-210 min - post-exposure period (Post-GR) to measure hyphal re-growth after the antifungal drug was removed by replacing the RPMI with no drug at 150 min. For growth rate inhibition, the parameters originated from the BCT testing were defined as following (Table 2): Exp-I%: the inhibitory ratio of the hyphal growth rate in exposure period (Exp-GR) was calculated as $(\text{Pre-GR} - \text{Exp-GR})/\text{Pre-GR} \times 100$; Post-I%: the inhibitory ratio of the hyphal growth in post exposure period (Post-GR) was calculated as $(\text{Pre-GR} - \text{Post-GR})/\text{Pre-GR} \times 100$.

For final analysis, the median of the growth measurements obtained for each hypha in each of the periods described above was calculated and plotted as growth rate inhibition using the statistical software SAS System for Windows.

A total of three concentrations of amphotericin B were tested: AMB (2.0, 1.0 and 0.5 $\mu\text{g/ml}$) and itraconazole (128.0 $\mu\text{g/ml}$). Ten hyphae were repeatedly tested for each group of drug concentrations. As controls, another 10 hyphae were observed for 210 min without addition of antifungal drugs.

Results

The median of hyphal growth for *F. solani* strains were 3.4, 4.3 and 1.0 $\mu\text{m}/5\text{min}$, while for *F. oxysporum* it was 6.5 $\mu\text{m}/5\text{min}$ (Table 1, Figure 2).

Dynamic response curves of *Fusarium* spp. strains in the Pre-GR, Exp-GR and Post-GR periods for different concentrations of drugs are illustrated in Table 1 and Figure 3, 4, 5, 6, 7.

It was found that there were variable inhibitory rate values (I%) for individual hyphae corresponding to three different AMB concentrations 2.0, 1.0 and 0.5 $\mu\text{g/ml}$ and itraconazole 128.0 $\mu\text{g/ml}$. The Exp-I% and Post-I% inhibitory hyphal growth ratios determined by the BCT for each concentration of AMB and itraconazole are shown in Table 2, in the statistical analysis section.

Discussion

There is no report in the literature on measurement of *Fusarium* spp. hypha increase in 5 minutes. We found different values of growth rate for different strains of the same species: for *F. solani* strains they were 3.4, 4.3 and 1.0 $\mu\text{m}/5\text{min}$, while to *F. oxysporum* it was 6.5 $\mu\text{m}/5\text{min}$.

Comparing hypha growth using AMB and ITZ antifungal drugs in post-exposure periods, *Fusarium* spp grew much better in contact with 128.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ITZ, than with different concentrations of AMB. Sander et al. 1998 described *Fusarium* strains that are highly resistant to itraconazole.

Varying susceptibilities to amphotericin B were reported; some *Fusarium* strains were found to be highly resistant to amphotericin B and itraconazole [Eljaschewitsch et. al, 1996; Sander et. al, 1998]. Our results agree in parts with Eljaschewitsch et al. 1996, almost all strains of *Fusarium* spp. shows $\geq 95\%$ inhibition *in vitro* using AMB and $\leq 80\%$ inhibition using ITZ.

Sander et al. 1998, observed that amphotericin B is more active against *F. solani* than *F. oxysporum*. It was found that the hyphal sensitivity and tolerance to AMB were variable in different species of *Fusarium* spp. Sigiura et. al. 1999 described the differentiation of *Fusarium* species from other filamentous fungal opportunists is important to establish the correct clinical diagnosis, in view of their different susceptibilities to antifungal drugs. This could be attributed because *Fusarium* sp hyphal wall is often less rigid and ribbon-like or twisted filamentous are more frequent [Romano et. al, 1998].

Conclusions

The BCT system is a very good apparatus to measure how much the hypha can grow, in micrometers, in a specific period. BCT give us much more information about fungi inhibiting to antifungal drugs than conventional methods.

We concluded that hyphal growth rate and the sensitivity to AMB and ITZ were variable in different species of *Fusarium* and can also vary for different strains of the same species.

REFERENCES

- Ansheng Li, Taguchi H, Miyaji M, Nishimura K, Shaoxi W. 1999. Study on the hyphal responses of *Aspergillus fumigatus* to the antifungal agent by Biocell-Tracer. *Mycopathologia* **148**: 17-23
- Bezjak, V., 1985. Standardization of a hyphal inoculum of Aspergilli for amphotericin B susceptibility testing. *J. Clin. Microbiol.* **21**: 509-512.
- Castellá G, Cano J, Guarro J, Cabañes FJ. DNA fingerprinting of *Fusarium solani* isolates related to cutaneous infection in a sea turtle. 1999. *Med. Mycology* **37**: 223-226.
- Eljaschewitsh, J., Sandford, J., Kathrin, T., Horbach, I., Ruf, B. 1996. Port-a-cath-related *Fusarium oxysporum* infection in an HIV-infected patient: treatment with liposomal amphotericin B. *Mycoses* **39**: 115-119.
- Iida, Y., K. Oh, M. Saito, H. Matsuoka, H. Kurata, M. Natsume and H. Abe. 1999. Detection of antifungal activity in *Anemarrhena asphodeloides* by sensitive BCT method and isolation of its active compound. *J. Agric. Food Chem.* **47**: 584-587.
- Letscher-Bru V, Campos F, Waller J, Randriamahazaka R, Candolfi E, Herbrecht R. 2002. Successful outcome of treatment of a disseminated infection due to *Fusarium dimerium* in a leukemia patient. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 1100-1102.
- National Committee For Clinical Laboratory Standards. 2002. Reference Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi; approved standard, NCCLS document M38-A. National Committee For Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
- Raad I, Tarrand J, Hanna H, Albitar M, Janssen E, Boktour M, et. al, 2002. Epidemiology Molecular Mycology and Environmental sources of *Fusarium* infection in patients with cancer. *Infect Control and Hosp Epidemiol* **23**: 532-537.
- Raad I., Hachen R. 1995 Treatment of central venous catheter-related fungemia due to *Fusarium oxysporum*. *Clin. Infect. Dis.* **20**: 709-711.

Romano, C., Miracco, C., Difonzo, E.M. 1998. Skin and nail infections due to *Fusarium oxysporum* in Tuscany, Italy. *Mycoses* **41**: 433-437.

Sander, A., Beyer, U., Amberg, R. 1998. Systemic *Fusarium oxysporum* infection in an immunocompetent patient with an adult respiratory distress syndrome (ARDS) and extracorporeal membrane oxygenation (ECMO). *Mycoses* **41**: 109-111.

Sugiura Y, Barr JR, Barr DB, Brock JW, Elie CM, Ueno Y, Patterson DGJ, Potter ME, Reiss E. 1999. Physiological characteristics and mycotoxins of human clinical isolates of *Fusarium* species. *Mycol. Rev.* 103: 1462-1468.

Taguchi H, Miyaji M, Nishimura K, Xu Min-Li. 1995. Studied on the synergistic effect of amphotericin B and 5-fluorocytosine on the growth rate of single hyphae of *Aspergillus fumigatus* by a Biocell-tracer system. *Mycoscience* **36**: 341-344.

Tables

Table 1: Hyphal growth for numerical data from BCT testing

Table 2: Variable distributions of inhibitory ratios of *Fusarium* spp hyphal growth rates in the exposure and post-exposure periods.

Figures

Figure 1: Photography of BCT[®] system.

Figure 2: BioCell -Tracer[®]: 1. Microscope; 2. CCD camera; 3. Image memory board; 4. TV monitor, 5. Keyboard, 6 Microcomputer, 7. Computer display, 8. Hard disk, 9. Automatic stage controller, 10. Printer, 11. Temperature control

Figure 3: Control hyphal growth curves of different *Fusarium* spp. strains in the Pre-GR, Exp-GR and Post-GR periods.

Figure 4: Inhibitory hyphal growth curves of *Fusarium* spp. strains in the Pre-GR, Exp-GR and Post-GR periods for 2.0 µg/ml amphotericin B

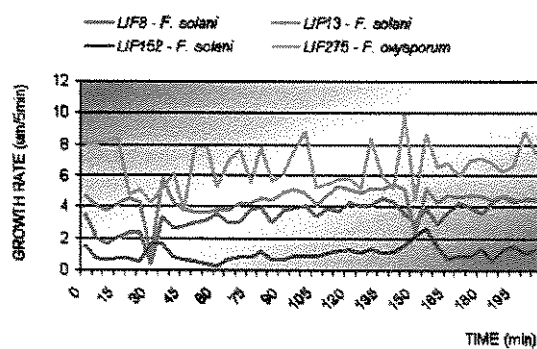
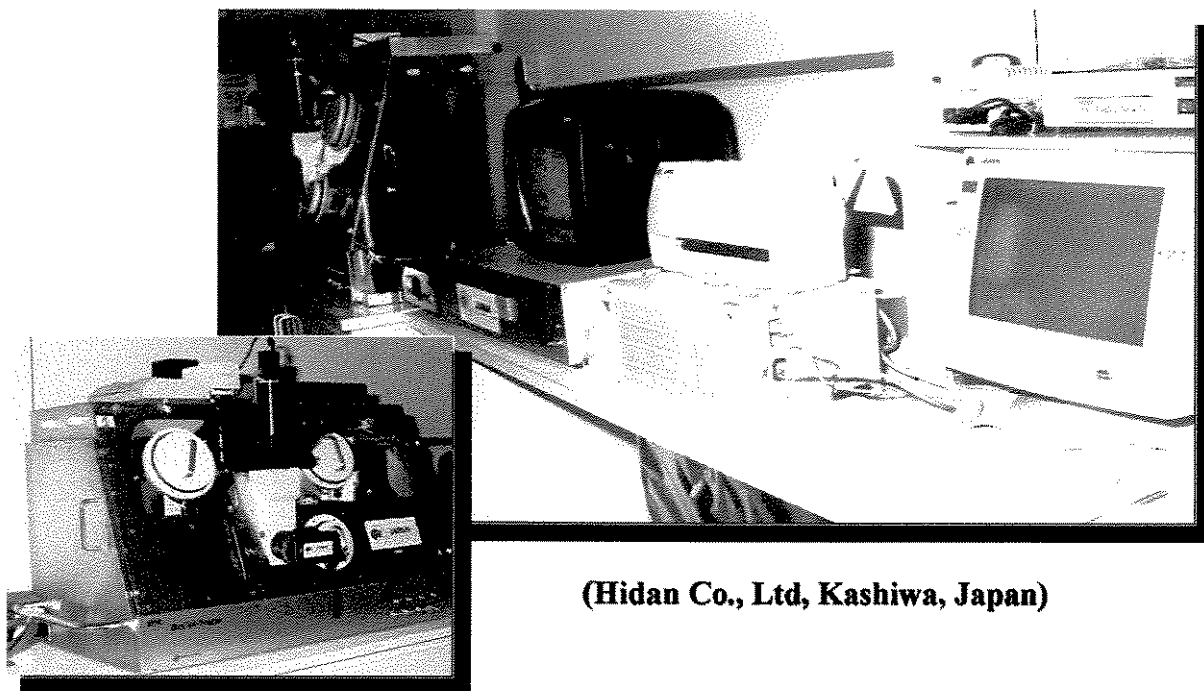
Figure 5: Inhibitory hyphal growth curves of *Fusarium* spp. strains in the Pre-GR, Exp-GR and Post-GR periods for 1.0 µg/ml amphotericin B

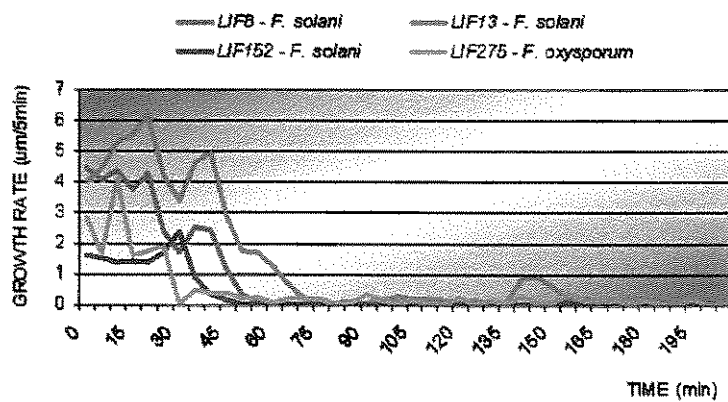
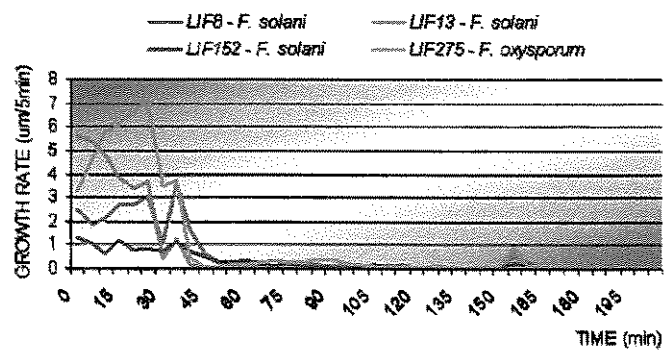
Figure 6: Inhibitory hyphal growth curves of *Fusarium* spp. strains in the Pre-GR, Exp-GR and Post-GR periods for 0.5 µg/ml amphotericin B

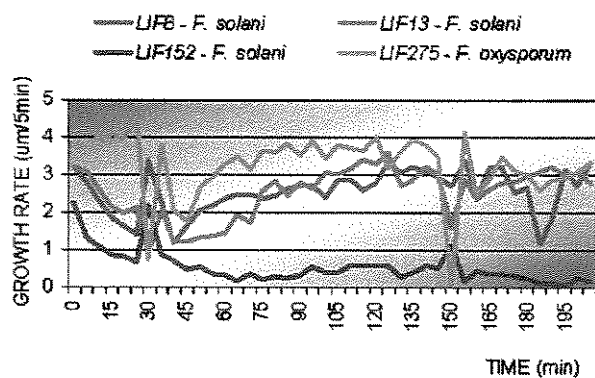
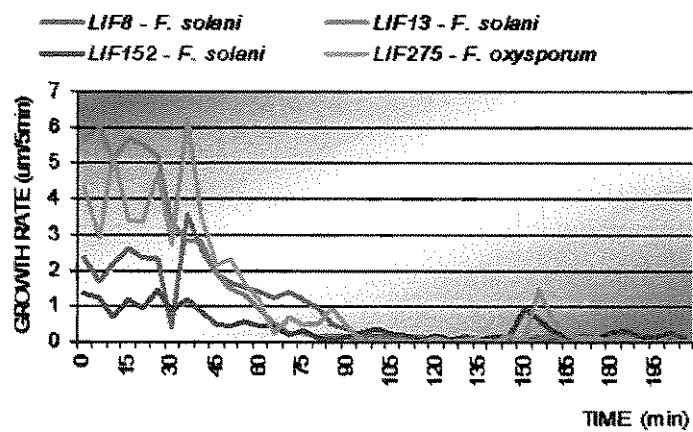
Figure 7: Inhibitory hyphal growth curves of *Fusarium* spp. strains in the Pre-GR, Exp-GR and Post-GR periods for 128.0 µg/mL itraconazole

Microorganism (µm ² /min)	Control	AMB 2.0 (µg/ml) Exp-GR – Post-GR	AMB 1.0 (µg/ml) Exp-GR – Post-GR	AMB 0.5 (µg/ml) Exp-GR – Post-GR	ITZ 128.0 (µg/ml) Exp-GR – Post-GR
LIF 8 <i>F. solani</i>	3.4	0.32 – 0.06	0.36 – 0.02	0.79 – 0.05	2.56 – 2.66
LIF 13 <i>F. solani</i>	4.3	0.08 – 0.05	1.01 – 0.09	0.67 – 0.05	2.39 – 2.74
LIF 152 <i>F. solani</i>	1.0	0.17 – 0.03	0.16 – 0.01	0.31 – 0.27	0.50 – 0.29
LIF 275 <i>F. oxysporum</i>	6.5	0.41 – 0.10	0.14 – 0.09	0.96 – 0.20	6.34 – 6.82

AMB (µg/ml)	n	The Exp-4% values				The Post-4% values			
		0%	<80%	80-95%	>95%	0%	<80%	80-95%	>95%
2.0	4	0	0	1	3	0	0	0	4
1.0	4	0	0	1	3	0	0	0	4
0.5	4	0	1	2	1	0	0	1	3
ITZ 128 (µg/ml)	4	0	4	0	0	0	4	0	0







3.4 - Manuscrito 4

Medical Mycology

submetido em 12 de dezembro de 2005

Susceptibility testing of *Aspergillus* spp to Amphotericin B and Itraconazole by hyphal response study

Ana Beatriz Alkmim Teixeira,¹ Maria Luiza Moretti,¹ Keiko Nishimura,² Hideaki Taguchi,² Angélica Zaninelli Schreiber^{1*}

¹School of Medical Sciences, State University of Campinas, São Paulo, Brazil¹ and
Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicoses, Chiba University, Japan²

* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Cidade Universitária Zeferino Vaz, Cx. Postal 6142, CEP 13083-970 Campinas, São Paulo, Brazil. Phone: 55-19-32893273. Fax: 55-19-37889434.

E-mail: zaninele@fcm.unicamp.br

<http://mc.manuscriptcentral.com/tmy> Email: brasaikin@aol.com

Summary

Invasive aspergillosis is one of the most severe forms of fungal infections seen in immunosuppressed patients. The antifungal drugs of choice for the treatment of invasive aspergillosis have been amphotericin B and itraconazole. Several reports have described *in vitro* tolerance or resistance of *Aspergillus* species to antifungal therapy that correlate with therapeutic failure. Antifungal susceptibility testing of filamentous fungi has therefore become more important. Since most infections caused by filamentous fungi are characterized by the presence of hyphal elements in the tissue, the monitoring of hyphal susceptibility to antifungal agents might be of high clinical interest. The minimal inhibitory concentrations (MICs) of several antifungal agents can be determined based on the growth rate of a single hypha. In the present study, we measured hypha increase of a clinical isolates of *A. flavus* (1), *A. terreus* (1) and *A. fumigatus* (2) quantified the hyphal growth without interference; and observed hyphal responses after addition of different concentrations of amphotericin B and itraconazole using BioCell-tracer[®] system. The median of hyphal growth to *A. flavus* 1.63, *A. fumigatus* 5.93 and 8.71 and *A. terreus* 4.61 $\mu\text{m}/5\text{min}$. It was found that hyphal growth rate and the sensitivity to amphotericin B and itraconazole were variable in different species of *Aspergillus* and can also vary for different strains of the same specie.

Key words: *Aspergillus* spp, BioCell-tracer, susceptibility test, amphotericin B, itraconazole.

<http://mc.manuscriptcentral.com/tmy> Email: irasaikin@aol.com

Introduction

Invasive aspergillosis (IA) is becoming one of the most severe forms of the fungal infections in immunosuppressed patients affecting 4.5% of patients in bone marrow transplant (BMT) units and 20% of allogenic BMT patients [1, 2].

The antifungal drugs of choice for treatment of IA have been amphotericin B (AMB) and itraconazole (ITZ). Several reports have described *in vitro* tolerance or resistance of *Aspergillus* species to antifungal therapy that correlate with therapeutic failure. AMB resistance appears to be particularly frequent among isolates of *Aspergillus terreus* [3- 6].

Antifungal susceptibility testing of filamentous fungi has become more important given the recognition of the drug-resistant organisms and the availability of therapies other than AMB [3].

It is necessary to measure the susceptibility of causative fungi to antifungal agents and several methods have been reported, including microdilution using inocula consisting of conidia [7]. Most infections caused by filamentous fungi are characterized by the presence of hyphal elements in tissue [8]. Therefore, it seems appropriate to develop reliable methods for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi with hyphal inocula [8].

The BioCell-Tracer[®] (BCT) (Hidan Co., Ltd, Kashiwa, Japan) is an apparatus which automatically traces hyphal tips and determines their growth rate [9]. BCT can detect the change of growth rate of a single hypha at every 30 second with a precision of 0.1 μm /min. Therefore, a transient decrease in the growth rate of a test hypha can be detected [10].

<http://mc.manuscriptcentral.com/tmmy> Email: krasaikin@aol.com

There are only some reports in the literature about automatic growth evaluation for *Aspergillus* sp by BCT[®] system [9-15].

This system has potential application in estimation of minimal inhibitory concentrations of several antifungal agents determined based on the growth rate of a single hypha and determination of fungicidal (Exp-GR=0 and Post-GR=0) and fungistatic (Exp-GR=0 and Post-GR>0) activities [9, 12].

The numerical data were recorded as the original growth rate (Pre-GR), the growth rate under the antifungal agents effect (Exp-GR) and the growth rate after antifungal agents were removed (Post-GR). Based on above numerical data, the inhibitory rates in the exposure and post exposure periods were calculated as the exposure inhibition (Exp-I%) and post exposure inhibition (Post I%) values. For final analysis, the median growth measure obtained for each hypha in each one of the periods above was calculated using the SAS System for Windows.

In the present study, we observed direct hypha increase of a clinical isolate of *A. flavus* (1), *A. fumigatus* (2) and *A. terreus*(1) and quantified the hyphal growth without interference; and hyphal responses after addition of amphotericin B and itraconazole using the BCT system.

Material and methods

Isolates

Four clinical *Aspergillus* isolates were tested: *A. flavus* [LIF 38/99], *A. fumigatus* [LIF124/01, LIF 320/02] and *A. terreus* [LIF 108/03]. The isolates were obtained from

<http://mc.manuscriptcentral.com/tmmy> Email: irasaikin@aol.com

the collection of Department of Clinical Pathology, School of Medical Sciences, State University of Campinas, São Paulo, Brazil.

Broth microdilution test

In vitro susceptibility tests to amphotericin B (Bristol-Myers Squibb, Woerden, The Netherlands) and itraconazole (Janssen Pharmaceutica B.V., Tilburg, The Netherlands), were performed by the broth microdilution method according to CSLI M38-A [7]. The inocula contained 1×10^3 conidia/ml final concentration. Minimal inhibitory concentrations (MIC) of the drugs were obtained after 48h of incubation at 35°C. MIC was defined as the lowest concentration of the drug allowing no growth in duplicate determination.

Monitoring by the BioCell-tracer® system

Plastic tissue culture dishes (Corning® Cell BIND® Surface 35mm Culture Dish, Product 3294, NY, USA) were used as culture vessels. The conidial cells from 7-day culture slant were maintained in potato dextrose agar (PDA; Difco, Detroit, Michigan, USA) at 25°C, and were harvested in sterile distilled water. The resulting mixture of conidia and hyphae was transferred to a sterile tube and was vortexed for 1 min. Heavy particles of the suspension were allowed to settle for 3 to 5 min, and the upper homogeneous suspension was collected for inoculum adjusting 1×10^3 conidia/ml with a Thoma haemocytometer counting. Five μ l (10^3 conidia) of the suspension was dropped on to the center of a culture vessel coated with 0.02% (w/v) poly-l-lysine (Sigma). The vessel was kept for 50 min at room temperature, and then gently washed with 1 ml of sterile distilled water. The conidia not adhered to the poly-l-lysine were washed out by this procedure. After addition of 2 ml of RPMI 1640 into the culture vessel, it was

<http://mc.manuscriptcentral.com/tmm> Email: iresaikin@aol.com

incubated at 35°C for 24h. Then, 10 to 20 appropriate hypha that were growing horizontally on the bottom of the vessel were selected and monitored by the BCT system. The apparatus was able to trace the tip of a growing hypha with a growth rate of 0.5 to 20 $\mu\text{m}/\text{min}$. At each measure, two-dimensional brightness pattern around the marker was analyzed to determine the position of the apex, which was then plotted. The growth rate was calculated by a computer program from the growth distance during the measuring interval [10].

A total of three concentrations from each antifungal drug (the MIC determined in CLSI and concentrations above or below) were tested for each *Aspergillus* strain. Ten hyphae were repeatedly tested for each group of drug concentration. As controls, another 10 hyphae were observed for 210 min without addition of antifungal drug.

Definition and statistical analysis

The experimental process in BCT was designed for 3h and 30 min with three phases: 0-30 min - pre-exposure period (Pre-GR) to measure the hyphal growth without interference; 35-150 min - the exposure period (Exp-GR) to observe the hyphal responses to antifungal drug in RPMI added at 30 min; 155-210 min - the post-exposure period (Post-GR) to measure the hyphal re-growth after the antifungal drug was removed by replacing the RPMI with no drug at 150 min. For growth rate inhibition, the parameters originated from the BCT testing were defined as following: Exp-I%: the inhibitory ratio of the hyphal growth rate in exposure period (Exp-GR) was calculated as $(\text{Pre-GR} - \text{Exp-GR})/\text{Pre-GR} \times 100$; Post-I%: the inhibitory ratio of the hyphal growth in post exposure period (Post-GR) was calculated as $(\text{Pre-GR} - \text{Post-GR})/\text{Pre-GR} \times 100$.

<http://mc.manuscriptcentral.com/tmy> Email: trasaikin@aol.com

For final analyses, the median of the growth measures obtained for each hypha in each of the periods described above was calculated and plotted as growth rate inhibition with the statistical software SAS System for Windows [16, 17].

Results

The minimal inhibitory concentration (MIC) and the minimal fungicidal concentration (MFC) values of amphotericin B and itraconazole against *Aspergillus* spp are shown in Table 1, as determined by the broth dilution method.

The median of hyphal control growth for *A. flavus* (LIF 38/99) was 2.53 and 0.14 $\mu\text{m}/5\text{min}$ measuring the hyphal growth without interference during 35-150 min and 155-210 min respectively. The maximal value of hypha growth was 7.96 $\mu\text{m}/5\text{min}$ and the minimal was 0 $\mu\text{m}/5\text{min}$ for this *A. flavus* strain. The median of hyphal control growth for *A. fumigatus* (LIF 124/01 and LIF 320/02) was 5.99 and 9.48 $\mu\text{m}/5\text{min}$ respectively measuring the hyphal growth without interference during 35-150 min, and 6.86 and 8.46 $\mu\text{m}/5\text{min}$ during 155-210 min. The maximal value of hypha growth was 9.04 and 11.58 $\mu\text{m}/5\text{min}$ and the minimal was 2.06 and 0.35 $\mu\text{m}/5\text{min}$ for these *A. fumigatus* strains. The median of hyphal control growth for *A. terreus* (LIF 108/02) was 4.82 and 3.15 $\mu\text{m}/5\text{min}$ measuring the hyphal growth without interference during 35-150 min and 155-210 min respectively. The maximal value of hypha growth was 7.86 $\mu\text{m}/5\text{min}$ and the minimal was 1.18 $\mu\text{m}/5\text{min}$ for this *A. terreus* strain.

The hyphal responses of *Aspergillus* spp to different concentrations of amphotericin B and itraconazole in the Pre-GR, Exp-GR and Post-GR periods are illustrated in table 2.

<http://mc.manuscriptcentral.com/tmy> Email: irasalkin@aol.com

It was found that there were variable inhibitory rate values (I%) for individual hyphae corresponding to three different AMB concentrations and itraconazole. The Exp-I% and Post-I% inhibitory hyphal growth ratios determined by the BCT for each concentration of AMB and ITZ are shown in Table 3, in the statistical analysis section.

The minimal inhibitory concentration (MIC) and the minimal fungicidal concentration (MFC) values of amphotericin B and itraconazole against *Aspergillus* spp determined by BCT system was considering MIC as the lowest concentration that produces over 95% inhibition, for the Exp-GR period and MFC was considering as the lowest concentration that produces over 99.9% inhibition for the Post-GR period in BCT system (Table 1).

Discussion

There is no report in the literature on measurement of hypha increase in *Aspergillus* spp. We found different values of growth rate for different strains of the same species, they were: *A. flavus* 1.63, *A. fumigatus* 5.93 and 8.71 and *A. terreus* 4.61 $\mu\text{m}/5\text{min}$. The maximal value of hypha growth was very large comparing with minimal value of hypha growth of *Aspergillus* strains. Our study concluded that hypha growth rate were variable in different species of *Aspergillus* and can also vary for different strains of the same specie.

The hyphal responses of *Aspergillus* spp to different concentrations of amphotericin B and itraconazole were possible to define several other parameters to express the growth process of hyphae. The fungistic effects (Post-GR > Exp-GR) were observed for both *A. fumigatus* strains using 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ to amphotericin B and 0.5 and

<http://mc.manuscriptcentral.com/tmy> Email: irasalkin@aol.com

0.25 $\mu\text{g/ml}$ to itraconazole were observed only for *A. fumigatus* LIF 124/01. The fungicidal effect (Post-GR < Exp-GR) was observed for all other concentrations of AMB and ITZ against *Aspergillus* spp (Table 2). The sensitivity of hyphal growth rate to AMB and ITZ were variable in different species of *Aspergillus* and can also vary for different strains of the same species.

BCT system data showed statistically similar levels of inhibition (>95%) to different doses of AMB (8.0, 4.0, 2.0 and 1.0, $\mu\text{g/ml}$) (Table 3). However, a great difference was observed in our study with 0.5 and 0.25 $\mu\text{g/ml}$ AMB, which afforded above 91.8% inhibition (Exp-GR) of hyphal growth. In the study by Sutton *et al.*, 48h MICs indicated 98% resistance to amphotericin B using conidia inocula [5]. The itraconazole concentrations 8.0, 4.0, 2.0, 0.5, 0.25 and 0.125 $\mu\text{g/ml}$ shows above 90.5% inhibition (Exp-GR) of all *Aspergillus* spp hypha growth.

Comparing hypha growth using AMB and ITZ antifungal drugs in exposure periods, *Aspergillus* spp grew better in contact with ITZ, than with different concentrations of AMB.

Manavathu *et al.* (1999) show that both germinated and ungerminated conidia of *A. fumigatus* are equally susceptible to the inhibitory and fungicidal activities of polyene and azole compounds [18]. The results of amphotericin B susceptibility studies presented by Bejak *et al.* indicated that there was no difference in MICs between conidia and hyphae of *Aspergilli* [19]. Our data suggest more sensibility of hypha when monitoring its response by exposure to amphotericin B with the BCT system relating with conidia data. In the other hand, hyphal growth monitoring by BCT showed more resistance than the conidial microdilution tests for itraconazole. The same analysis to obtain MIC and

MFC using pure hyphae inoculum is a significant advantage presented by this system [12]. Our results agree in part with those of Guarro et al., who obtained considerable MIC and MFC discrepancies when the two types of inocula were used for *Cladosporium*, *Paecilomyces*, *Scopulariopsis* and *Cladophialophora* species [8].

Our findings lead us to conclude that hyphal growth rate and the sensitivity to AMB and ITZ were variable in different species of *Aspergillus* and can also vary for different strains of the same specie. Antifungal MICs vary between conidia and hyphae of *Aspergillus* spp. Hypha showed more sensibility to the polienic antifungal drug amphotericin B and conidia seems to be more susceptible to the evaluated azole itraconazole.

Acknowledgements

This work was supported by grants from FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), Brazil. A. B. A. Teixeira is a PhD student and is supported by grants from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), Brazil. We thank Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicosis, Chiba University, Japan for BCT training program. We thank Luzia L. Fernandes for technical support.

<http://mc.manuscriptcentral.com/tmmy> Email: irasalkin@aol.com

References

1. Chazatet V, Debeaupuis JP, Sarfati J. Molecular typing of environmental and patient isolates of *Aspergillus fumigatus* from various hospital settings. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36: 1494-1500.
2. Salermo CT, Ouyang DW, Pederson TS. et al. Surgical therapy for pulmonary aspergillosis in immunocompromised patients. *Ann Thorac Surg.* 1998; 65: 1415-1419.
3. Balajee AS, Marr KA. Conidial viability assay for rapid susceptibility testing of aspergillus species. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40: 2741-2745.
4. Lass-Flörl CL, Kofler G, Kropshofer G, Hermans J, Kreczy A, Dierich MP, Niederwieser D. *In vitro* testing of susceptibility to amphotericin B is a reliable predictor of clinical outcome in invasive aspergillosis. *J. Antimicrob. Chemother.* 1998; 42: 497-502.
5. Sutton DA, Sanche SE, Revankar SG, Fothergill AW, Rinaldi MG. *In vitro* amphotericin B resistance in clinical isolates of *Aspergillus terreus*, with a head-to-head comparison to voriconazole. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37: 2343-2345.
6. Dorsthorst DTATe, Verweij PE, Meis JFGM, Punt NC, Mouton JW. *In vitro* interactions between amphotericin B, itraconazole, and flucytosine against 21 clinical *Aspergillus* isolates determined by two drug interaction models. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004; 48 (6): 2007-2013.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi;

<http://mc.manuscriptcentral.com/tmmy> Email: irasaikin@aol.com

- approved standard, CLSI document M38-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
8. Guarro J, Llop C, Aguilar C, Pujol I. Comparison of *in vitro* antifungal susceptibilities of conidia and hyphae of filamentous fungi. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997; 41: 2760-2762.
 9. Taguchi H, Miyaji M, Nishimura K, Min-Li Xu. Studied on the synergistic effect of amphotericin B and 5-fluorocytosine on the growth rate of single hyphae of *Aspergillus fumigatus* by a biocell-tracer system. *Mycoscience.* 1995; 36: 341-344.
 10. Oh K, Matsuoka H, Nemoto Y, Sumita O, Takatori K, Kurata H. Determination of anti-*Aspergillus* activity of antifungal agents based on the dynamic growth rate of a single hypha. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1993; 39: 363-367.
 11. Matsuoka H, Yoshikazu Ii, Takekawa Y, Teraoka T. Evaluation of antifungal volatile compounds on the basis of the elongation rate of a single hypha. *Applied and Environmental Microbiology.* 1990; 56(12): 3779-3784.
 12. Yamada, S, Cao J, Sumita O, Kirasawa K, Kurata H, Oh K, Matsuoka H. Automatic antifungal activity analyzing system on the basis of dynamic growth process of a single hypha. *Mycopathologia.* 1992; 118: 65-69.
 13. Oh K, Yang H C, Matsuoka A, Yamamoto, Kurata H. Combined effect of amphotericin B and flucytosine on hypha growth of *Candida albicans* estimated at a single hypha level. *Journal of Medical and Veterinary Mycology.* 1995; 33: (3) 01-04.

<http://mc.manuscriptcentral.com/tmmy> Email: irasaikin@aol.com

14. Iida Y, Oh K, Saito M, Matsuoka H, Kurata H, Natsume M, Abe H. Detection of antifungal activity in *Anemarrhena asphodeloides* by sensitive BCT method and isolation of its active compound. J. Agric. Food Chem. 1999; 47: 584-587.
15. Ansheng Li, Taguchi H, Miyaji M, Nishimura K, Shaoxi W. Study on the hyphal responses of *Aspergillus fumigatus* to the antifungal agent by Biocell-Tracer. Mycopathologia. 1999; 148: 17-23
16. Milliken GA, Johnson DE. Analysis of Messy Data. Volume I: Designed Experiments. New York: Van Nostrand Reinhold Company. 1984.
17. Montgomery DC. Design and Analysis of Experiments. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons, 1991
18. Manavathu EK, Cutright J, Pranatharthi H, Chandrasekar. Comparison study of susceptibilities of germinated and ungerminated conidia of *Aspergillus fumigatus* to various antifungal agents. J Clin Microbiol. 1999; 37 (3):858-861.
19. Bezjak V. Standardization of a hyphal inoculum of *Aspergilli* for amphotericin B susceptibility testing. J. Clin. Microbiol. 1985; 21: 509-512.

<http://mc.manuscriptcentral.com/tmmy> Email: iresaikin@aol.com

Legends

Table 1: Values of MIC and MFC to AMB and ITZ against *Aspergillus* spp using conidia and hypha inocula.

Table 2: Median of hyphal growth ($\mu\text{m}/5\text{min}$) for *Aspergillus* spp in pre-exposure period (Pre-GR), exposure period (Exp-GR) to different concentrations of amphotericin B and itraconazole and in post-exposure period (Post-GR) obtained by the BCT system.

Table 3: *Aspergillus* spp growth inhibition after exposure to various concentrations of amphotericin B and itraconazole.

<http://mc.manuscriptcentral.com/tmmy> Email: trasaikin@aol.com

Microorganisms	AMB ($\mu\text{g/ml}$)			ITZ ($\mu\text{g/ml}$)		
	MIC conidia - hypha	MFC conidia - hypha	MFC conidia - hypha	MIC conidia - hypha	MFC conidia - hypha	MFC conidia - hypha
LIF38/99 <i>A. flavus</i>	2.0 - 1.0	2.0 - 2.0	0.5 - >0.5	0.5 - >0.5	0.5 - >0.5	0.5 - >0.5
LIF124/01 <i>A. fumigatus</i>	1.0 - 0.5	1.0 - $\geq$ 1.0	1.0 - 1.0	1.0 - 1.0	1.0 - >1.0	1.0 - >1.0
LIF320/02 <i>A. fumigatus</i>	2.0 - 2.0	2.0 - $\geq$ 2.0	8.0 - >8.0	8.0 - >8.0	8.0 - >8.0	8.0 - >8.0
LIF108/03 <i>A. terreus</i>	8.0 - $\leq$ 2.0	32.0 - 8.0	0.125 - >0.5	0.125 - >0.5	0.5 - >0.5	0.5 - >0.5

Antifungal drug	Antifungal drug concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Growth in period ($\mu\text{m/5min}$)					
		LIF38/99 <i>A. flavus</i>		LIF124/01 <i>A. fumigatus</i>		LIF320/02 <i>A. fumigatus</i>	
		Pré-GR	Exp-GR Post-GR	Pré-GR	Exp-GR Post-GR	Pré-GR	Exp-GR Post-GR
Amphotericin B	8.0					7.07	0.03 0.00
	4.0					3.69	0.05 0.00
	2.0	7.45	0.00 0.00			5.74	0.03 0.02
	1.0	4.75	0.15 0.05	4.42	0.15 0.05	11.49	0.36 0.14
	0.5	7.84	0.64 0.01	8.85	0.84 0.86	4.62	2.15 2.42
	0.25			4.75	1.10 0.13		
Itraconazole	8.0					6.25	2.89 0.33
	4.0					14.01	1.49 0.83
	2.0					6.39	0.49 0.28
	1.0			16.15	0.15 0.04		
	0.5	10.19	1.16 0.13	8.85	0.84 0.86		
	0.25	5.79	2.91 0.09	5.04	3.69 4.15		
	0.125	10.74	4.00 2.52				
						2.18	0.90 0.02
						8.35	2.20 0.69
						5.97	0.84 1.79

Antifungal drug	Antifungal drug concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Inhibition ratio by period (%)					
		LIF38/99 <i>A. flavus</i> Exp-I% Post I%	LIF124/01 <i>A. fumigatus</i> Exp-I% Post I%	LIF320/02 <i>A. fumigatus</i> Exp-I% Post I%	LIF108/03 <i>A. terreus</i> Exp-I% Post I%		
Amphotericin B	8.0					99.5	100
	4.0					98.6	100
	2.0	100		99.4	99.6	96.9	99.1
	1.0	96.8	96.6	96.8	98.7		
	0.5	91.8	97.2	98.6	47.6		
	0.25		76.8	97.2			
Itraconazole	8.0			53.7	94.7		
	4.0			89.3	94.0		
	2.0			92.3	95.6		
	1.0		99.0	99.7			
	0.5	88.6	90.5	90.2		58.7	99.0
	0.25	49.7	26.7	17.6		73.6	91.7
	0.125	62.7	76.5			85.9	70.0

4 - DISCUSSÃO GERAL

4.1 - Seleção das cepas para o estudo

As cepas de *Aspergillus* spp e *Fusarium* spp, avaliadas neste estudo, foram selecionadas a partir de isolados clínicos mantidos na Micoteca do Setor de Micologia do Laboratório de Microbiologia da Divisão de Patologia Clínica do HC-Unicamp no período de 1997 a 2003 (anexo 3). Como critério de escolha foram selecionadas cepas provenientes de casos de infecções confirmadas, prováveis ou possíveis, segundo as definições de IFI baseados nos critérios da EORTI/NIH conforme documento que se encontra detalhado no anexo 1 (MARR et al, 2002).

4.2 - Testes de microdiluição em caldo

De acordo com TUDELLA et al (2001), uma cepa é considerada microbiologicamente resistente quando a CIM é mais elevada que o habitual para esta espécie.

Frente a anfotericina B, a CIM determinada pelo CLSI M38-A para *Aspergillus* e *Fusarium*, variou de 0,5 a 2,0 µg/ml. Para *Aspergillus terreus*, especificamente, variou de 2,0 a 16,0 µg/ml.

Comparando os valores da CIM, determinados neste estudo pela microdiluição em caldo, com os valores da CIM preconizados pelo documento CLSI, foi possível considerar todas as cepas de *Aspergillus* e *Fusarium* estudadas como sensíveis microbiologicamente, frente a anfotericina B (Tabela 4).

Este antifúngico parece ter alta atividade *in vitro*, onde 50% dos isolados são suscetíveis a esta droga e a CIM de 90% das cepas testadas variou entre 1,0 a 4,0 µg/ml para isolados de fusariose invasiva (LETSCHER-BRU et al., 2002).

No estudo de WALSH et al (2003), a média dos valores da CIM frente a ANB para *A. terreus* foi de 2,0 µg/ml. SUTTON et al (1999) encontrou resultado similar, com 80% das cepas com CIMs entre 2,0 e 4,0 µg/ml. Em nosso estudo os valores da CIM para *A. terreus* frente a ANB foi mais alto que os valores encontrados por estes autores (SUTTON et al., 1999; WALSH et al., 2003) (Tabela 4).

Frente ao itraconazol os valores da CIM no documento M 38-A variaram entre 0,0313 e >8,0 µg/ml, sendo assim, as cepas de *Aspergillus* estudadas, mostraram ser microbiologicamente sensíveis e as cepas de *F. solani* e *F. oxysporum* mostraram ser microbiologicamente resistentes (CLSI, 2002) (Tabela 5).

O CLSI não relata valores da CIM para voriconazol. No estudo de ESPINEL-INGROFF et al. (2001) os valores da CIM para 97 cepas de *A. flavus* e 183 cepas de *A. fumigatus* variaram entre 0,03 a 2,0 µg/ml e 0,03 a 8,0 µg/ml frente ao voriconazol. Deste modo, a cepa LIF 38/99 de *A. flavus* pode ser considerada resistente e as cepas LIF 124/01 e 320/02 consideradas microbiologicamente sensíveis (Tabela 4). Segundo SUTTON et al. (1999) e LASS-FLORL et al. (2005) os valores da CIM para 90% das cepas de *Aspergillus terreus* variaram entre 0,125 - 0,25 µg/ml e 1,0 - 2,0 µg/ml respectivamente frente ao voriconazol (SUTTON et al., 1999; LASS-FLORL et al., 2005). No estudo de ESPINHEL-INGROFF et al. (2001) variaram entre 0,06-2,0 µg/ml. Sendo assim, a cepa LIF 108/03 de *A. terreus* com CIM de 4,0 µg/ml pode ser considerada microbiologicamente resistente frente a este antifúngico. Segundo ESPINEL-INGROFF et al (2001) os valores da CIM para 27 cepas de *F. oxysporum* variaram entre 0,25 a > 8,0 µg/ml e para 65 cepas de *F. solani* variaram entre 0,25 a 16 µg/ml (ESPINEL-INGROFF et al., 2001). Assim, todas as cepas de *Fusarium* spp do estudo foram consideradas microbiologicamente sensíveis frente ao voriconazol.

4.2.1 - Dose e Concentração sérica dos antifúngicos avaliados

Clinicamente a resistência de uma cepa existe quando esta continua crescendo e produzindo sintomatologia apesar da concentração do fármaco ser máxima. Para definir a resistência clínica, deve-se conhecer a CIM da droga frente o microorganismo e a concentração sérica obtida do antifúngico de acordo com a dose administrada (TUDELLA et al., 2001).

Ao contrário do que acontece com os antibacterianos, a correlação exata entre dose e concentração sérica nos diversos tecidos, para antifúngicos, ainda não é bem conhecida (GROLL, et al, 2001). Exceção para fluconazol e terbinafina.

A dosagem de anfotericina B usualmente recomendada em IFI é de 1,0 mg/ Kg/ dia e de 1,0 a 1,25 mg/ Kg/ dia se paciente neutropênico (GILBERT et al, 2005) até 3,0-5,0 mg/ Kg/ dia (SAMUEL et al, 2005). Os dados disponíveis relatam para ANB, concentrações séricas entre 1,5 e 2,0 mg/l após administração de 5mg/Kg, com larga distribuição no organismo (RICHARDSON e WARNOCK, 1998). Por outro lado, a concentração da droga no tecido não é a mesma encontrada no soro (OSTROSKY-ZEICHNER et al., 2003).

A dosagem usualmente recomendada para itraconazol é de 200 mg/dia/12 dias (GILBERT et al, 2005) até 100-500 mg/dia (MAERTENS e BOOGAERTS, 2005). A concentração sérica relatada após administração de cápsula de 100 mg é de 0,1 a 0,2 mg/l (RICHARDSON e WARNOCK, 1998).

Para voriconazol, a concentração sérica relatada é de 2,0 a 6,0 µg/ml (ESPINEL-INGROFF et al., 2001), e a dose de administração recomendada é de 6 mg/Kg/12 em 12h e a dose de manutenção 4 mg/Kg/12 em 12h (GILBERT et al, 2005) até 200 mg de 12 em 12 horas (DOWELL et al., 2005).

4.2.2 - Cepa padrão

Neste estudo, não foi possível utilizar cepas padrão de fungos filamentosos, para acompanhamento dos resultados. Nos testes de microdiluição os controles foram avaliados com cepas padrão de leveduras. Para os testes no BCT[®] ainda não foram estabelecidos valores para cepas padrão. Foi possível correlacionar os valores das CIMs das cepas padrão preconizadas pelo documento CLSI M38-A com os valores das CIMs avaliadas em nosso estudo.

Segundo o CLSI M 38-A os valores da CIM de ANB para cepa padrão *Aspergillus flavus* ATCC 204304 variaram entre 0,5-4,0 µg/ml, para ITZ entre 0,2-0,5 µg/ml e para voriconazol entre 0,5-4,0 µg/ml. Sendo compatíveis com os valores da CIM para cepa LIF 38/99 de *A. flavus*. Para a cepa *A. fumigatus* ATCC 204305, as CIMs de ANB variaram de 0,5-2,0 µg/ml e de ITZ entre 0,12-1,0 µg/ml. Ainda não há valores estabelecidos da CIM de voriconazol frente a *A. fumigatus*, segundo o documento CLSI M38-A (CLSI, 2002). Os valores de CIM obtidos de ANB foram compatíveis para as cepas de *A. fumigatus* LIF124/01 e LIF 320/02. E o valor de CIM obtido de itraconazol foi mais alto para a cepa LIF320/02 (Tabela 4, 5, 6).

4.3 - Avaliação Dinâmica de Crescimento

No sistema BCT foi possível observar o crescimento das hifas em tempo real bem como o seu comportamento frente aos antifúngicos. Durante o processo de infecção *Fusarium* spp apresentam a parede das hifas menos rígidas e com filamentos retorcidos (ROMANO et al., 1998). KURTZ et al. (1994) estudaram o efeito de lipopeptídeos de *A. fumigatus*, sugerindo que a quantidade de diferentes compostos celulares poderia variar quando diferentes formas do fungo estão em contato com os agentes antifúngicos (KURTZ et al. 1994). WEI-YUN ZHU e GOODAY (1992) têm demonstrado que existem diferenças na característica física de hifas jovens em comparação com as hifas maduras. Essas diferenças podem causar variações de sensibilidade ou resistência no uso de antifúngicos. Foi reportado que hifas jovens de *Botrytis cinerea* e *Mucor rouxii* crescem devagar e apresentam menor suscetibilidade aos agentes antifúngicos do que as hifas maduras (WEI-YUN ZHU e GOODAY, 1992; ANSHENG, et al, 1999). Em nosso estudo foi possível observar, no decorrer do experimento, que as hifas jovens de *Fusarium* cresceram mais rápido e foram menos susceptíveis aos agentes antifúngicos do que as hifas maduras. A princípio, esta diferença poderia estar influenciando nos valores de CIM avaliados, sendo mimetizada, pela análise estatística com a mediana (comunicação pessoal).

4.3.1 - Padronização do inóculo

O inóculo para os testes no BCT não é quantitativo como na metodologia de microdiluição em caldo, CLSI M38-A. Seu tamanho não interfere no crescimento das hifas e tão pouco na determinação da concentração inibitória mínima, pois o crescimento das hifas é avaliado individualmente pela mediana do crescimento em $\mu\text{m}/5 \text{ min}$. A padronização só é realizada para determinar o tamanho de inóculo e o tempo necessário de incubação do mesmo para um adequado crescimento inicial das hifas (Pré-Exp > 0).

Cepas de *Aspergillus* apresentaram crescimento inicial ideal após 24h de incubação de $5\mu\text{l}$ do inóculo contendo 10^3 conídios/ μl . No trabalho de ANSHENG et al (1999), a concentração necessária foi de 10^4 conídios/ μl (ANSHENG et al., 1999) (Anexo 4, Tabela 2). As cepas de *Fusarium* apresentaram melhor crescimento inicial após 48 h de incubação de $10\mu\text{l}$ do inóculo contendo 10^4 conídios/ μl . Foi possível reduzir o tempo de incubação das cepas de *Fusarium* de 48 horas para 24 horas quando uma concentração maior de conídios, em torno de 10^6 células, foi inoculada na placa (anexo 4, tabela 3). Observou-se que a umidade do ar interfere no crescimento do inóculo de *Fusarium* spp para, posteriormente, ser avaliado no sistema BCT. Em dias frios, onde a umidade do ar foi baixa, cepas de *Fusarium* cresceram em 24 horas. Em dias mais quentes onde a umidade do ar foi alta, foram necessárias 48 horas. Em experimentos realizados no Japão, onde o inverno é úmido, as cepas de *Fusarium* cresceram em 48 horas (comunicação pessoal). Foi possível observar que o inóculo ideal, pode variar com o tempo de crescimento 10^4 (48 a 72 h) e 10^6 (24 a 48 h) conídios/ μl .

4.3.2 - Preparação do Teste

O crescimento das hifas no sistema BCT é longitudinal e para realizar a sua medição foi necessário que as hifas permanecessem fixadas à placa plástica. O seu descolamento da placa impossibilita a realização do teste que mede o crescimento da hifa por contraste de cores. Ao microscópio, as hifas adquirem coloração azul e a placa plástica com o meio RPMI adquire coloração branca. O aparelho mede o deslocamento da

coloração azul (hifa) sobre a coloração branca (placa). Para a fixação das hifas na placa foi necessária a impregnação do material plástico com poli-L-lisina (PLL), um polímero químico que facilita a adesão de células em substratos sólidos com >70.000 mol (SIGMA, PRODUCT INFORMATION). ANSHENG et al (1999), avaliando espécies de *Aspergillus*, utilizou PLL 0,01%, para fixação dos esporos (ANSHENG et al., 1999). Nas condições deste estudo, houve melhor fixação das hifas na placa, com 0,02% de PLL para *A. terreus* e *A. fumigatus* e 0,05% de PLL para *A. flavus* (Anexo 4, Tabela 2). Para espécies de *F. solani* e *F. oxysporum* a concentração ideal de PLL foi uma constante PLL 0,05% (Anexo 4, Tabela 3).

Diferentemente da literatura onde TAGUCHI et al (1995) e ANSHENG et al (1999) utilizam meio SAAMF, neste trabalho o meio utilizado para teste, foi RPMI 1640 (TAGUCHI et al., 1995; ANSHENG et al., 1999). A temperatura de incubação prévia para inóculos de cepas de *Aspergillus* e de *Fusarium* foi de 35°C, de acordo com o “Clinical and Laboratory Standard Institute” no intuito de permitir comparações com o método padrão do documento M38-A (CLSI, 2002)(Anexo 4, Tabela 2 e 3).

As concentrações de antifúngicos avaliadas nos testes realizados no BCT tiveram como ponto de partida os resultados de CIMs obtidos nos testes de microdiluição em caldo. De modo geral, foram avaliadas as concentrações inibitórias mínimas e até mais duas diluições abaixo, para todas as cepas. Após avaliação dos resultados, para algumas cepas, foi necessária a avaliação de mais números de concentrações (abaixo ou acima).

4.3.3 - Medida de crescimento das hifas

Não há relatos na literatura sobre a padronização do sistema automatizado de avaliação dinâmica de crescimento BioCell-tracer® para cepas de *Fusarium* sp. Por sua vez, para espécies de *Aspergillus*, os existentes, são bastante restritos, visto que, até o momento, há somente cinco equipamentos disponíveis no mundo (MATSUOKA et al., 1990; YAMADA et al., 1992; OH et al., 1993^{a,b}; OH et al., 1995; TAGUCHI et al., 1995; IIDA et al., 1999; ANSHENG et al., 1999).

O tempo de experimento para as cepas de *Aspergillus* spp e *Fusarium* spp no BCT® foi padronizado em 3h30m. Sendo os 30m iniciais considerados como controle (Pré), 2h com adição do antifúngico (Exp) e 1h final após a retirada da droga e com adição do meio RPMI 1640 (Pós). Não havendo alteração dos resultados em um tempo de experimento mais prolongado (Figura 2). ANSHENG et al (1999) utilizou para *A. fumigatus* frente ao fluconazol Pré: 0-12 min, Exp: 12-130 e Pós: 130-180 (ANSHENG et al, 1999). YAMADA et al (1992) e OH et al (1993) utilizou para *A. niger* frente a vários antifúngicos Pré: 0-30 min, Exp: 30-90 e Pos: 90-150 (YAMADA et al., 1992; OH et al., 1993^b)

No BCT foi possível calcular quantas micra uma hifa de *Fusarium* e *Aspergillus* spp poderiam crescer em 5 minutos. Foi possível também encontrar diferentes velocidades de crescimento de diferentes cepas da mesma espécie e de espécies diferentes. Não há nenhum relato na literatura sobre o crescimento de hifas destes fungos e sua inibição na presença de antifúngicos (Tabela 7, 8).

Comparando o crescimento de hifas na presença dos antifúngicos ANB e ITZ em períodos de pós-exposição, *Fusarium* spp cresceu muito melhor na presença de 128,0 µg/ml de ITZ, do que nas diferentes concentrações de ANB. SANDER et al. (1998) descreveu que espécies de *Fusarium* são altamente resistentes ao itraconazol. Os dados deste trabalho confirmam as informações do autor (SANDER et al, 1998). O autor demonstrou que a ANB foi mais ativa contra *F. solani* do que frente a *F. oxysporum*. O crescimento das hifas e sua inibição frente a ANB e ITZ foram variáveis para diferentes espécies de *Fusarium* e *Aspergillus* spp e podem também variar para diferentes cepas da mesma espécie (Tabela 7, 8).

No acompanhamento de crescimento das hifas de *Aspergillus* e *Fusarium* spp expostas a várias concentrações de anfotericina B foi observado efeito fungistático para *F. solani* LIF 152/01 e *A. fumigatus* LIF 320/02 frente a 0,5 µg/ml. Nas demais concentrações ocorreu efeito fungicida frente a ANB onde o crescimento da hifa na fase de exposição à droga foi maior do que o obtido na fase de pós exposição (Tabela 7, 8).

Por sua vez, para várias concentrações de ITZ foi observado efeito fungistático para as cepas de *F. solani* LIF 8/98 e LIF 13/97 frente a 128,0 µg/ml, *A. terreus* LIF 108/03 frente a 0,125 µg/ml e *A. fumigatus* LIF 124/01 frente a 0,25 e 0,5 µg/ml onde o crescimento da hifa na fase de exposição à droga foi menor do que na fase de pós-exposição. Para as demais cepas ocorreu efeito fungicida frente a este antifúngico (Tabela 7, 8).

A concentração de 1,0 µg/ml de voriconazol demonstrou efeito fungistático para a cepa de *A. terreus*.

4.3.4 - Análise estatística dos dados

OH et al. (1993) têm indicado que a metodologia do BCT[®] apresenta um problema estatístico questionando se uma única hifa poderia representar o comportamento de toda a colônia (OH et al., 1993^b). Para solucionar este problema, foram avaliadas, no mínimo, dez hifas em cada experimento e calculados os valores da média e mediana dos dados obtidos pelo BCT[®]. Valorizando assim, o padrão de crescimento demonstrado pela maioria das hifas.

A avaliação matemática, ou estatística, dos dados fornecidos por este equipamento, também foram objeto de estudo e bastante trabalho, que ficaram aos cuidados do Serviço de Estatística da Comissão de Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas, que muito colaborou nas diferentes tentativas de tradução e interpretação dos resultados.

4.3.5 - Determinação da taxa de inibição de crescimento das hifas

Foi reportado por ELJASCHEWITSCH et al. (1996) uma variação na suscetibilidade de algumas cepas de *Fusarium* spp sendo estas mais resistentes a ANB e ao ITZ (ELJASCHEWITSCH et al., 1996; SANDER et al, 1998). Nossos resultados são concordantes com ELJASCHEWITSCH et al. 1996 para ITZ, onde foram obtidas taxa de inibição de ≤80% para quase todas as cepas de *Fusarium* spp e discordante para ANB, onde foram obtidas taxa de inibição de ≥95% para a maioria das cepas de *Fusarium* spp (Artigo 3).

Foi possível observar que, mesmo em concentrações mais baixas de antifúngicos para as quais, o teste com conídios revelou resistência microbiológica, as taxas de inibição de crescimento de hifas, apresentam valores altos.

Utilizando as medianas das taxas de inibição, foi possível observar maior concordância da inibição de crescimento com o aumento da concentração da droga, do que quando avaliou-se apenas o resultado das médias. Nas publicações MATSUOKA et al., 1990; YAMADA et al., 1992; OH et al., 1993^{a,b}; OH et al., 1995; TAGUCHI et al., 1995; IIDA et al., 1999; ANSHENG et al., 1999, foram relatados valores de media.

4.4 - Correlação entre os testes de microdiluição e avaliação de crescimento de hifas

A avaliação visual, recomendada pelo método CLSI M38-A para fungos filamentosos, considera nada menos que 100% de inibição da CIM para os testes com ANB (RODRIGUEZ-TUDELLA et al., 1996; CLSI, 2002). O método EUCAST para a técnica de microdiluição em caldo, padronizado somente para *Candida* spp, considera uma inibição do crescimento de 95%, comparada com o controle positivo, para leituras no espectrofotômetro de CIM de ANB. Segundo MOREIRA, L.S. (2002) as cepas de *Candida albicans* que apresentaram taxa de inibição acima de 70% no modelo BCT[®], tiveram os valores da CIM relacionados a sensibilidade ao fluconazol, e quando os valores foram abaixo de 20% de inibição, essas CIMs foram associadas a resistência (MOREIRA, L.S. 2002).

Foi possível determinar a concentração inibitória mínima pelo BCT após o cálculo da taxa de inibição de crescimento de cada cepa estudada frente a cada uma das concentrações de antifúngico. A percentagem de inibição considerada como CIM foi de 95% para todas as drogas. Pelo BCT, é possível determinar a taxa de inibição (TI) para cada concentração de antifúngico em teste, inclusive para concentrações abaixo da CIM.

MANAVATHU et al. (1999) demonstrou que os conídios germinados e não germinados de *A. fumigatus* apresentaram a mesma suscetibilidade inibitória e fungicida frente aos compostos poliênicos e azólicos (MANAVATHU et al., 1999). Os resultados de

suscetibilidade para ANB apresentados por BEJAK et al. (1985) indicaram que não houve nenhuma diferença nos valores das CIMs entre conídios e hifas de *Aspergillus* spp (BEJAK et al., 1985).

De modo geral, em nosso estudo os valores da CIM de ANB, pela técnica de microdiluição em caldo, utilizando conídios de *Aspergillus* spp, foram mais altos do que os valores da CIM de ANB para hifas obtidos no sistema BCT, considerando-se as medianas dos resultados. Já os valores da CIM de ITZ para conídios de *Aspergillus* spp foram mais baixos que os valores da CIM de ITZ para hifas pelo BCT, mesmo para a cepa LIF 124/01 *A. fumigatus*. O mesmo ocorreu com a variação dos valores da CIM de voriconazol para conídios de *Aspergillus terreus* spp (Tabela 6).

Nossos dados sugerem que a forma de hifas é mais susceptível à ANB, considerando-se as medianas dos resultados, e mais resistente ao ITZ do que os conídios para espécies de *Aspergillus* spp.

As discrepâncias encontradas entre os resultados obtidos com os dois tipos de inóculo para as cepas de *Fusarium* spp, parecem ser óbvias, segundo GUARRO et al. (1997) devido a composição da parede celular de muitas espécies de fungos não ser a mesma, sob diferentes circunstâncias, diferenças estruturais existentes, de células tubulares à mais ou menos esféricas, e também por não haver nenhum relatório sobre diferentes inóculos de *Fusarium* spp na literatura para comparação (GUARRO et al., 1997).

Para conídios das cepas de *Fusarium* spp, os valores da CIM de ANB pela técnica de microdiluição em caldo foram os mesmos ou mais altos do que os valores da CIM de ANB para hifas de *Fusarium* spp pelo sistema BCT®. Já os valores da CIM de ITZ para conídios das cepas de *Fusarium* spp foram os mesmos que os valores da CIM de ITZ para hifas pelo BCT® (Tabela 5).

Os dados de mediana, sugerem que as hifas são praticamente iguais frente ao ITZ ou levemente mais suscetíveis à ANB do que os conídios, para espécies de *Fusarium* spp (Tabela 4, 5, 8). A razão para a variabilidade dos valores da CIM obtidos por métodos diferentes pode ser porque o conídio é a forma resistente dos fungos no ambiente e seu metabolismo é mais baixo do que o metabolismo da hifa presente no tecido.

GUARRO et al. (1997) obteve considerável discrepância nos valores da CIM e CFM quando diferentes tipos de inóculos foram utilizados para espécies de *Cladosporium*, *Paecilomyces*, *Scopulariopsis* e *Cladophialophora* (GUARRO et al., 1997). Todas as cepas de *Aspergillus* e *Fusarium* spp avaliadas pela microdiluição em caldo resultaram no mesmo valor da CIM e CFM de ANB, ITZ e voriconazol. Exceto a cepa de *A. terreus* em que a CFM variou em duas concentrações mais altas do que a CIM de a ANB e ITZ (Tabela 4, 5, 6).

Comparando os valores da CIM e CFM avaliados pelas duas metodologias houve melhor correlação entre os valores de ITZ do que de ANB frente às cepas de *Aspergillus* spp e *Fusarium* spp (Tabela 4, 5).

4.5 - Correlação dos resultados com morte ou sobrevida dos pacientes

Segundo LASS-FLORL et al. (1998), a letalidade de pacientes infectados por *Aspergillus* spp pode ser preconizada pelo teste de suscetibilidade *in vitro* frente à anfotericina B. A maioria dos pacientes obteve sucesso no tratamento quando os valores da CIM foram $< 2,0 \mu\text{g/ml}$ de ANB. Enquanto que, quando a CIM foi $\geq 2,0 \mu\text{g/ml}$ a maioria dos pacientes foram a óbito por infecção fúngica. Para os demais antifúngicos, não há parâmetros na literatura, para avaliação frente a fungos filamentosos.

Considerando os antifúngicos administrados aos pacientes incluídos neste estudo e os resultados obtidos pelas duas metodologias empregadas, segue-se uma tentativa de estabelecimento de correlação.

Cepa LIF 8/98 *F. solani*: paciente fez uso de fluconazol e anfotericina B e foi a óbito. De acordo com a Tabela 4, os dados de CIM de ANB para conídios e a média da taxa de inibição de crescimento das hifas, estariam de acordo com este resultado, a mediana indica duas diluições abaixo, tanto para CIM quanto para CFM. Os demais fatores envolvidos, tais como interações medicamentosas, condições gerais do paciente, distribuição e acúmulo de droga nos tecidos, não estão sendo considerados.

Cepa LIF 13/97 *F. solani*: paciente fez uso de ANB e todos os testes de suscetibilidade apontaram, com exceção da mediana de CIM para hifas, CIM e CFM 2,0 - $\geq 2,0 \mu\text{g/ml}$ de ANB, que pode ser associado à falha terapêutica e óbito, como descrito no artigo 2.

Cepa LIF 152/01 *F. solani*: paciente fez uso de ANB e ITZ. A tabela 4 aponta CIM e CFM de $1,0 \mu\text{g/ml}$ de ANB pelo método de diluição em caldo e mediana dos resultados obtidos com hifas no BCT. Assim, o sucesso terapêutico obtido não poderia ser atribuído ao ITZ, onde todos os testes apontaram resultados de $\geq 128 \mu\text{g/ml}$, mas sim à ANB.

Cepa LIF 275/02 *F. oxysporum*: apenas uma dose de ANB foi administrada ao paciente, assim sendo, embora todas as concentrações inibitórias e fungicidas estejam acima de $2,0 \text{ g/ml}$ não é possível correlacioná-las com o óbito.

Para as cepas de *Fusarium* spp quando o valor da CIM de ANB foi de $2,0 \mu\text{g/ml}$ (LIF 8/98, 13/97) foi observada falha terapêutica e quando a CIM foi de $1,0 \mu\text{g/ml}$ (LIF 152/01) foi observado sucesso terapêutico em ambos os métodos. Neste caso, para 3 pacientes foi possível observar boa correlação entre as 2 metodologias empregadas e o resultado clínico.

SANDER et al. 1998, descreveu que espécies de *Fusarium* sp apresentaram alta resistência ao itraconazol. Dados preliminares demonstraram que uma CIM $> 8,0 \mu\text{g/ml}$ frente ao itraconazol para fungos filamentosos está diretamente associada à resistência clínica (CLSI, 2002).

Neste trabalho, os valores da CIM de ITZ foram de $128 \mu\text{g/ml}$ em ambos os métodos, frente aos quatro isolados de *Fusarium* spp. Dos quatro pacientes relacionados, três foram a óbito tendo como causa fusariose confirmada. O paciente que obteve sucesso terapêutico foi o da cepa LIF 152/01 de *F. solani* que recebeu itraconazol mas cuja cepa apresentou o menor valor de CIM frente a ANB.

Cepa LIF 38/99 *A. flavus*: paciente fez uso de ANB. A CIM de ANB foi de 2,0µg/ml para conídios, enquanto que o dado da mediana obtido para hifas foi de 1,0µg/ml e foi obtida a cura.

Cepa LIF 124/01 *A. fumigatus*: paciente fez uso de ANB e ITZ. Embora os testes tenham apontado concentrações inibitórias mínimas por diluição em caldo e mediana por BCT® igual a 1,0µg/ml, a média por BCT® revela CIMs acima de 1,0µg/ml para ITZ, que não foi suficiente para debelar a infecção. Instaurada a terapêutica com ANB, cuja CIM foi $\leq 1,0\mu\text{g/ml}$ por diluição em caldo e mediana de crescimento de hifas por BCT®, foi obtida a cura.

Neste estudo, os valores da CIM para ANB frente às 2 cepas de *Aspergillus* spp (LIF 38/99, LIF 124/01) foram abaixo de 2,0 µg/ml, a primeira pela técnica do BCT e a segunda após avaliação com as duas metodologias. Ambos os pacientes obtiveram sucesso terapêutico. Neste caso, levando-se em consideração o valor de CIM, a técnica do BCT foi a que melhor se correlacionou com o resultado.

Cepa LIF 320/02 *A. fumigatus*: paciente recusou o tratamento, portanto a correlação não pode ser tentada.

Cepa LIF 108/03 *A. terreus*: tomando-se em consideração apenas os dados obtidos para ANB, independentemente da técnica, estes poderiam indicar o mau prognóstico. No entanto, o paciente foi transferido de serviço médico para receber voriconazol, cujos resultados estão na tabela 6, sendo os obtidos com hifas os mais compatíveis com falha terapêutica. Ainda foi administrada caspofungina, que não foi possível avaliar *in vitro*.

Para três isolados de *Aspergillus* spp a CIM foi $\leq 1,0 \mu\text{g/ml}$ de ITZ por CLSI M38-A e para um por BCT®. Destes três pacientes dois tiveram alta e um foi a óbito. Não foi possível correlacionar os valores da CIM com nenhum destes eventos, frente ao itraconazol.

LASS-FLORL et al., 1998 relatam que *A. terreus* apresenta altos valores da CIM frente a anfotericina B e, portanto baixa sobrevida (LASS-FLORL et al., 1998). Tem sido documentada uma baixa atividade fungicida de anfotericina B e voriconazol frente ao

Aspergillus terreus (ESPINELL-INGROFF, 2003). Para a cepa LIF 108/03 de *A. terreus* que apresentou pela microdiluição em caldo CIM 8,0 de ANB e por BCT®, CIM $\geq 2,0 \mu\text{g/ml}$ o paciente foi a óbito sendo uma das causas “Aspergilose invasiva”. Neste caso poderia se considerar que houve correlação do óbito com as duas metodologias. E ao contrário, em outros dois estudos colaborativos foi documentado a correlação de baixos valores da CIM de ANB frente à *A. terreus* com resistência clínica em modelos de laboratório com neutropenia persistente e aspergilose (ESPINHELL-INGROFF, 2003), sendo concordante com os dados por nós obtidos pelo sistema BCT® onde o valor da CIM foi $\leq 2,0 \mu\text{g/ml}$.

De modo geral, para tratamentos com antifúngicos, a correlação entre os valores *in vitro* do teste de suscetibilidade e a evolução clínica é baixa, sendo que muitos pacientes não respondem ao tratamento (LETSCHER-BRU et. al, 2002). A falta de anotações completas no prontuário do paciente, demora para aquisição (autorização para) do antifúngico, instauração da terapêutica e transferência do paciente para outros serviços em busca do tratamento, dificultam ainda mais a tentativa de correlação com a clínica.

Os fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* spp e *Fusarium* spp apresentaram características individuais de crescimento e suscetibilidade, sendo praticamente inviável a sua correlação de espécie a espécie e, até mesmo, entre cepas da mesma espécie. Independente da metodologia utilizada para realização do teste de suscetibilidade ou da forma fúngica avaliada para inóculo nos testes de suscetibilidade, as cepas devem ser avaliadas separadamente, caso a caso, se possível, ao longo do tratamento clínico, uma vez que cada cepa deve ser considerada única.

5 - CONCLUSÃO GERAL

- Quando comparados os valores da CIM determinados neste estudo pela microdiluição em caldo com os valores da CIM preconizados pelo documento CLSI, foi possível considerar todas as cepas de *Aspergillus* e *Fusarium* estudadas como sensíveis microbiologicamente, frente a anfotericina B. As cepas de *Aspergillus* mostraram ser microbiologicamente sensíveis e as cepas de *Fusarium* mostraram ser microbiologicamente resistentes frente ao itraconazol. De acordo com a literatura disponível, todas as cepas de *Fusarium* spp e *A. fumigatus* deste estudo podem ser consideradas microbiologicamente sensíveis frente ao voriconazol e as cepas de *A. flavus* e *A. terreus* resistentes.
- A velocidade de crescimento das hifas e sua taxa de inibição frente a ANB e ITZ foram variáveis para diferentes espécies de *Fusarium* e *Aspergillus* spp também variaram para diferentes cepas da mesma espécie.
- Os dados deste trabalho sugerem que a forma de hifas é mais susceptível à anfotericina B, considerando-se as medianas dos resultados, e mais resistente ao itraconazol do que os conídios para espécies de *Aspergillus* spp.
- Dados da mediana de crescimento sugerem que as hifas são praticamente iguais frente ao itraconazol ou são levemente mais suscetíveis a anfotericina B do que os conídios para espécies de *Fusarium* spp.
- Levando em consideração a mediana dos valores da CIM, as cepas de *Aspergillus* spp. e *Fusarium* spp. são mais sensíveis do que os conídios frente a anfotericina B. Levando em consideração a média dos valores da CFM, as hifas são mais resistentes que os conídios; e muito variados quando se avalia a mediana frente a anfotericina B.
- Frente ao itraconazol, os valores de CIM e CFM para hifas de *Aspergillus* spp. e *Fusarium* spp. são maiores do que para conídios independente da utilização da média ou mediana

- Para 3 pacientes, portadores das cepas de *Fusarium* spp, foi possível observar boa correlação entre as 2 metodologias empregadas e os eventos de óbito ou cura frente a anfotericina B.
- Para 2 pacientes portadores das cepas de *A. flavus* e *A. fumigatus* que obtiveram sucesso terapêutico a técnica do BCT foi a que melhor se correlacionou com o resultado frente a anfotericina B.
- Não foi possível correlacionar os valores das CIMs obtidas por microdiluição em caldo e BioCell tracer[®] os eventos de óbito ou cura, frente ao itraconazol.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, S.H.; LOPES, J.O.; CURY, A.E. Teste de suscetibilidade aos antifúngicos: Por que, quando e como realizar. **News lab**, 25: 2000.
- ANSHENG, Li.; TAGUCHI, H.; MIYAJI, M.; NISHIMURA, K.; SHAOXI, W. Study on the hyphal responses of *Aspergillus fumigatus* to the antifungal agent by Biocell-Tracer. **Mycopathologia**, 148: 17-23, 1999.
- ARNOW, P.M.; SADIGH, M.; COSTAS, C.; WEIL, D.; CHUDY, R.- Endemic and epidemic aspergillosis associated with In-hospital replication of *Aspergillus* organisms. **J. Infect. Dis**, 164: 998-1002, 1991.
- AUFREAUD-BROWN, A.; BROWN, D.W.; HOLDEN, D.W. Comparison of virulence between clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus*. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis**, 17(11): 778-780, 1998.
- BADDLEY, J.W.; PAPPAS, P.G. Antifungal Combination Therapy. **Drugs**, 65(11): 1461-1480, 2005.
- BALAJEE, A. S.; MARR, K. A. Conidial viability assay for rapid susceptibility testing of *Aspergillus* species. **J. Clin. Microbiol**, 40: 2741-2745, 2002.
- BARTIZAL, C.; ODDS, F.C. Influences of methodological variables on susceptibility testing of caspofungin against *Candida* species and *Aspergillus fumigatus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 47(7): 2100-2107, 2003.
- BEZJAK, V. Standardization of a hyphal inoculum of *Aspergilli* for amphotericin B susceptibility testing. **J. Clin. Microbiol**, 21(4): 509-512, 1985.
- CARVALHAES, J. **Micologia Médica**, 1.ed., Rio de Janeiro (R.J), Control lab, 1999.
- CARVALHO, A. C. A.; RUTHES, H. I.; MAIA, M.; YANA, D.; SATO, M. T.; MOREIRA, H.; FERNANDES-BORDIGNON, G.; QUEIROZ-TELLES, F. Ceratite fúngica no estado do Paraná- Brasil: aspectos epidemiológicos, etiológicos e diagnósticos. **Ver. Iberoam. Micol**, 18: 76-78, 2001.

CASTELLÁ, G.; CANO, J.; GUARRO, J.; CABAÑES, F.J. DNA fingerprinting of *Fusarium solani* isolates related to cutaneous infection in a sea turtle. **Med. Mycology**, 37: 223-226, 1999.

CHAZATET, V.; DEBEAUPUIS, J.P.; SARFATI, J.; LORTHOLARY, J.; RIBAUD, P.; SHAH, P.; CORNET, M.; THIEN, H.V.; GLUCKMAN, E.; BRUCKER, G.; LATGÉ, J.P. Molecular typing of environmental and patient isolates of *Aspergillus fumigatus* from various hospital settings. **J. Clin. Microbiol**, 36: 1494-1500, 1998.

CHRYSSANTHOU, E. *In vitro* susceptibility of respiratory isolates of *Aspergillus* species to itraconazole and amphotericin B. acquired resistance to itraconazole. **Scand J Infect Dis**, 29: 509-512, 1997.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. 1997. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast; approved standard, NCCLS document M27-A. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, Pa.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. 1998. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi; proposed standard, NCCLS document M38-P. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, Pa.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi; approved standard, NCCLS document M38-A. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, Pa.

CONSIGNY, S.; DHEDIN, N.; DATRY, A.; CHOQUET, S.; LEBLOND, V.; CHOSIDOW, O. Successful Voriconazole Treatment of Disseminated *Fusarium* Infection in an Immunocompromised Patient. **Clin Infect Dis**, 37(15): 311-313, 2003.

CORMICAN, M.G.; PFALLER, M.A. Standardization of antifungal susceptibility testing. **J. Antimicrob. Chemother**, 38(4): 561-578, 1996.

- DEBEAUPUIS, J.P.; SARFATI, J.; CHAZALET, V.; LATGÉ, J.P. Genetic diversity among clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus*. **Infect. Immun**, 65(8): 3080-3085, 1997.
- DENNING, D.W. Therapeutic outcome in invasive aspergillosis. **Clin. Infect. Dis**, 23(3): 608-615, 1996.
- DOWELL, J.A.; SCHRANZ, J.; BARUCH, A.; FOSTER, G. Safety and pharmacokinetics of coadministered voriconazole and anidulafungin. **J Clin Pharmacol**, 45(12) 1373-1382, 2005.
- DRUTZ, D.J. *In vitro* antifungal susceptibility testing and measurement of levels of antifungal agents in body fluids. **Rev. Infect. Dis**, 9(2): 392-397, 1987.
- ELJASCHEWITSCH, J.; SANDFORDT, J.; TINTELNOT, K.; HORBACH, I.; RUF, B. Port-a-cath-related *Fusarium oxysporum* infection in an HIV-infected patient: treatment with liposomal amphotericin B. **Mycoses**, 39: 115-119, 1996.
- ESPINEL-INGROFF, A. *In vitro* activity of the new triazole voriconazole (UK- 109, 496) against opportunistic filamentous and dimorphic fungal and common and emerging yeast pathogens. **J. Clin. Microbiol**, 36(1):198-202, 1998.
- ESPINEL-INGROFF, A.; BOYLE K, SHEEHAN, D.J. In-Vitro antifungal activities of voriconazole and reference agents as determined by CLSI methods: Review of the literature. **Mycopathologia** 150: 101-115, 2001.
- ESPINEL-INGROFF, A. Utility of mould susceptibility testing. **Curr Opin Infect Dis**, 16: 527-532, 2003.
- GILBERT, D.N.; MOELLERING, R.C.; ELIOPOULOS, G.M.; SANDE, M.A. **The Sanford Guide to Antimicrobiol Therapy**, 35th The sanford guide to antimicrobiol therapy, INC, Hyde Park, EUA, 2005.
- GROLL, A.H.; PISCITELLI, S.C.; WALSH, J. Antifungal Pharmacodynamic: Concentration-Effect Relationships in vitro and in vivo. **Pharmacotherapy** 21(8s): 133s-148s, 2001.

GUARRO, J.; LLOP, C.; AGUILAR, C.; PUJOL, I. Comparison of *in vitro* antifungal susceptibilities of conidia and hyphae of filamentous fungi. **Antimicrob. Agents Chemother**, 41(12): 2760-2762, 1997.

GUARRO, J.; RUBIO, C.; GENE, J.; CANO, J.; GIL, J.; BENITO, R.; MORANDERIA, M. J.; MIGUEZ, E. Case of Keratitis Caused by na Uncommon *Fusarium* species. **J. Clin. Microbiol**, 41(12): 5823-5826, 2003.

HOFLING-LIMA, A. L.; FORSETO, A.; DUPRAT, J. P.; ANDRADE, A.; SOUZA, L. B.; GODOY, P.; FREITAS, D. Estudo laboratorial das micoses oculares e fatores associados às ceratites. **Arq. Brás. Oftalmol**, 68(1): 21-7, 2005.

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

IWEN, P.C.; MS; M(ASCP); SM(AAM); CLS/M.; DAVIS, J.C.; MD; REED, E.C.; WINFIELD, B.A. ; MN; CIC; HINRICHS, S.H.; MD.- Airborne fungal spore monitoring in a protective environment during hospital construction, and correlation with an outbreak of invasive aspergillosis. **Infect. Control Hosp. Epidemiol**, 15(5): 303-306, 1994.

JAWETZ, M.A., BROOKS, G.F.; BUTEL, J.S.; ORNSTON, L.N. **Microbiologia Médica** 20º Ed, Rio de Janeiro, R.J., Guanabara Koogan, 1998. p 420-443.

JENSEN, J.P.; MEIS, J.F.; BLIJLEVEN, N.M.; van't WOUT, J.W. Economic evaluation of voriconazole in the treatment of invasive aspergillosis in the Netherlands. **Curr Med Res Opin**, 21(10): 1535-1546, 2005.

JENSEN, T.G.; GAHRN-HANSEN, B.; ARENDRUP, M.; BRUUN, B. *Fusarium* fungaemia in immunocompromised patients. **Clin Microbiol Infect**, 10: (6) 499-501, 2004.

KALE, P.; JOHNSON, L.B. Second-generation azole antifungal agents. **Drugs Today**, 41(2): 91-105, 2005.

KAUFFMAN, C.A. New antifungal agents. **Semin. Respir. Crit. Care Méd**, 25(2): 233-239, 2004.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; DOWELL, V.R.Jr.; SOMMERS, H.M. **Diagnóstico Microbiológico Texto e Atlas Colorido** 2. Ed., São Paulo-S.P., Panamericano, 1993. p 537-599.

KWON-CHUNG, K.J.; BENNETT, J.E. **Medical Mycology**. Philadelphia, London, Lea & Febiger, 1992.

KURTZ, MB., HEATH, I.B.; MARRINAN, J.; DREIKORN, S.; ONISHI, J; DOUGLAS, C. Morphological effects of lipopeptides against *Aspergillus fumigatus* correlate with activities against (1,3)-beta-D-glucan synthase. *Antimicrob Agents Chemother* 38 (7): 1480-1489, 1994

KUZUCU, C.; RAPINO, B.; Mc DERMOTT, L.; HADLEY, S. Comparison of the semisolid agar antifungal susceptibility test with the NCCLS M38-P Broth Microdilution Test for screening of filamentous fungi. *J. Clin. Microbiol*, 42(3): 1224-1227, 2004.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C. **Micologia Médica: Fungos, Actinomicetos e Algas de Interesse Médico**. 3.ed., São Paulo (S.P), Sarvier, 1991.p 31-58.

LASS-FLORL, C. L.; KOFLER, G.; KROPSHOFER, G.; HERMANS, J.; KRECZY, A.; DIERICH, M. P.; NIEDERWIESER, D. *In vitro* testing of susceptibility to amphotericin B is a reliable predictor of clinical outcome in invasive aspergillosis. *J. Antimicrob. Chemother*, 42: 497-502, 1998.

LASS-FLORL, C. L.; RIEF, A.; LEITNER, S.; SPETH, C.; WURZNER, R.; DIERICH, M. P. *In vitro* activities of amphotericin B and voriconazole against aleurioconidia from *Aspergillus terreus*. *Antimicrob. Agents Chemother*, 49 (6): 2539-2540, 2005.

LEENDERS, A.C.A.P.; van BELKUM, A.; BEHRENDT, M.; LUIJENDIJK, A.; VERBRUGH, H.A. Density and molecular epidemiology of *Aspergillus* in air and relationship to outbreaks of *Aspergillus* Infection. *J. Clin. Microbiol*, 37(6):1752-1757, 1999.

LETSCHER-BRU V, CAMPOS F, WALLER J, RANDRIAMAHAZAKA R, CANDOLFI E, HERBRECHT R. Successful outcome of treatment of a disseminated infection due to *Fusarium dimerium* in a leukemia patient. *J Clin Microbiol* 40(3): 1100-1102, 2002.

MAERTENS, J.; BOOGAERTS, M. The place for itraconazole in treatment. **J. Antimicrob. Chemother**, 56 (S1) i33-i38, 2005.

MANAVATHU, E. K., CUTRIGHT, J., PRANATHARTHI, H., CHANDRASEKAR. Comparative study of susceptibilities of germinated and ungerminated conidia of *Aspergillus fumigatus* to various antifungal agents. **J Clin Microbiol** 37 (3):858-861, 1999

MARR, K. A.; CARTER, R. A.; CRIPPA, F.; WALD, A.; COREY, L. Epidemiology and outcome of mould infection in hematopoietic stem cell transplant recipients. **Clin Infect Dis**, 34: 909-917, 2002

MATSUOKA, H.; YOSHIKAZU II, TAKEKAWA, Y.; TERAOKA, T. Evaluation of antifungal volatile compounds on the basis of the elongation rate of a single hypha. **Applied and Environmental Microbiology**, 56(12): 3779-3784, 1990.

MOREIRA, L.S. **Estudo da atividade de drogas antifúngicas através de curvas de crescimento de *Candida albicans* utilizando sistema automatizado Biocell-Tracer**. Campinas, 2003. (Tese - Mestrado - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas).

OH, K. MATSUOKA, H., SUMITA, O; TAKATORI, K.; KURATA, H. Automatic evaluation of antifungal volatile compound on the basis of the dynamic growth process of a single hypha. **Appl Microbiol Biotechnol** 38(6):790-794, 1993^a.

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

OH, K.; YANG, H.C.; MATSUOKA, A.; YAMAMOTO, KURATA, H. Combined effect of amphotericin B and flucytosine on hypha growth of *Candida albicans* estimated at a single hypha level. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, 33: (3) 01-04, 1995.

OSTROSKY-ZEICHNER, L.; MARR, K.A.; REX, J.H.; COHEN, S.H. Amphotericin B: Time for a New Gold Standard. **Clin. Infect. Dis**, 37: 415-425, 2003.

- PUJOL, I.; GUARRO, J.; GENÉ, J.; SALA, J. – *In vitro* antifungal susceptibility of clinical and environmental *Fusarium* spp. strains. **J. Antimicrob. Chemother**, 39: 163-167, 1997.
- PRAJNA, N. V.; JOHN, R. K.; NIRMALAN, P. K.; LALITHA, P.; SRINIVASAN, M. A randomised clinical trial comparing 2% econazole and 5% natamycin for the treatment of fungal keratitis. **Br. J. Ophthalmol**, 87: 1235-1237, 2003.
- RAAD, I.; HACHEN, R. Treatment of central venous catheter-related fungemia due to *Fusarium oxysporum*. **Clin. Infect. Dis**, 20: 709-711, 1995.
- RAAD, I.; TARRAND, J.; HANNA, H.; ALBITAR, M.; JANSSEN, E.; BOKTOUR, M. et al. Epidemiology, Molecular Mycology, and Environmental sources of *Fusarium* infection in patients with cancer. **Infect Control and Hosp Epidemiol**, 23(9): 532-537, 2002.
- RICHARDSON, M.D.; WARNOCK, D.W. Fungal Infection-Diagnosis and Management, 2th Blachwell Sciences Ltd, Malden, EUA.
- RODRIGUEZ-TUDELLA, J.L.; BERENGUER, J; MARTINEZ-SUAREZ, J.V.; SANCHEZ, R. Comparison of a spectrophotometric microdilution method with RPMI 2% glucose with the Clinical and Laboratory Standards institute macrodilution method M27-P for *in vitro* susceptibility testing of amphotericin B, flucytosine and fluconazole against *Candida albicans*. **Antimicrob. Agents Chemother** 40 (9): 1998-2003, 1996
- RODRIGUEZ-TUDELLA, J.L.; RODERO, L.; ESTRELLA, M.C.; CÓRDOBA, S. Determinación de la Resistencia a los Antifúngicos en el Laboratorio. In: III Curso Hispano-Argentino de Micología Médica. Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, S.P., 2001.
- ROMANO, C.; MIRACCO, C.; DIFONZO, E.M. Skin and nail infections due to *Fusarium oxysporum* in Tuscany, Italy. **Mycoses**, 41: 433-437, 1998.
- SALERMO, C.T.; OUYANG, D.W.; PEDERSON, T.S.; LARSON, D.M.; SHAKE, J.P.; JOHNSON, E.M.; MADDAUS, M.A. Surgical therapy for pulmonary Aspergillosis in immunocompromised patients. **Ann Thorac Surg**, 65: 1415-1419, 1998.

SAMUEL, R.; TRUANT, A.L.; SUH, B. Cumitech 42, Infections in hemopoietic stemcell transplant recipients. In Truant al, ed. Coordinating. ASM Press, Washington, DC, 2005.

SANDER, A.; BEYER, U.; AMBERG, R. Systemic *Fusarium oxysporum* infection in an immunocompetent patient with an adult respiratory distress syndrome (ARDS) and extracorporeal membrane oxygenation (ECMO). **Mycoses**, 41: 109-111, 1998.

SHEEHAN, D.J.; HITCHCOCH, C.A.; SIBLEY, C. M. Current and emerging azole antifungal agents. **Clin. Microb. Ver**, 12(1): 40-79, 1999.

SIDRIM, JJC.; MOREIRA, J.L.B. **Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica**. Rio de Janeiro, RJ, Guanabara Koogan AS, 1999.

SIGMA, PRODUCT INFORMATION: banco de dados. Disponível em: [http:// www.sigmaaldrich.com/sigma/product%20information%20sheet/p1274pis.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/sigma/product%20information%20sheet/p1274pis.pdf)

SOARES, M.M.S.R.; RIBEIRO, M.C.; AMARAL, M.E.C.; TEIXEIRA, A.B.A.; ANTONELLI, L.R.V.; CASTRO, L.C.M.- Micota do ar na cidade de Campinas. **Rev. Bioikos PUC-Campinas**, 11(1,2): 33-39, 1997.

SUGIURA, Y.; BARR, J.R.; BARR, D.B.; BROCK, J.W.; ELIE, C.M.; UENO, Y. PATTERSON, D.G.J.; POTTER, M.E.; REISS, E. Physiological characteristics and mycotoxins of human clinical isolates of *Fusarium* species. **Mycol. Rev**, 103(11):1462-1468, 1999.

SUTTON, D. A., S. E. SANCHE, S. G. REVANKAR, A. W. FOTHERGILL AND M. G. RINALDI. *In vitro* amphotericin B resistance in clinical isolates of *Aspergillus terreus*, with a head-to-head comparison to voriconazole. **J. Clin. Microbiol**. 37: 2343-2345. 1999.

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

Te DORSTHORST, D.T.A.; VERWEIJ, P.E.; MEIS, J.F.G.M.; PUNT, N.C.; MOUTON, J.W. In Vitro Interations between amphotericin B, itraconazole, and flucytosine against 21

clinical *Aspergillus* isolates determined by two drug interaction models. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(6): 2007-2013, 2004).

TEIXEIRA, A.B.A. **Identificação e avaliação de suscetibilidade a antifúngicos de fungos filamentosos isolados a partir de espécimes clínicos de pacientes com malignidades hematológicas e transplantados de medula óssea e sua correlação com isolados ambientais.** Campinas, 2001. (Tese - Mestrado - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas).

TEIXEIRA, A.B.A.; SILVA, M.; LYRA, L.; LUZ, E.A.; UNO, J.; MIYAJI, M.; NISHIMURA K.; SCHREIBER, A.Z. Antifungal susceptibility and pathogenic potential of environmental isolated filamentous fungi compared with colonizing agents in immunocompromised recipients. *Mycopathologia*, 160: 129-135, 2005^a.

TEIXEIRA, A.B.A.; MORETTI, M.L.; TRABASSO, P.; von NOWAKONSHI, A.; AOKI, F.H.; VIGORITO, A.C.; MIYAJI, M.; NISHIMURA K.; TAGUCHI, H.; SCHREIBER, A.Z. Evaluation of *Fusarium solani* hyphae and conidia susceptibility to amphotericin B and itraconazole: study of a clinical case *Mycopathologia*, 116 (4):291-296, 2005^b.

VARTIVARIAN, S.E.; ANAÏSSIE, E.J.; BODEY, G.P. Emerging fungal pathogens in immunocompromised patients: classification, diagnosis and management. *Clin. Infect. Dis*, 17(2): 487-491, 1993.

VERGHESE, S.; MARIA, C.F.; MULLASERI, A.S.; ASHA, M.; PADMAJA, P.; PADHYE, A.A. *Aspergillus* endocarditis presenting as femoral artery embolism. *Mycoses*, 47: 252-256, 2004.

WALSH, T. J.; PETRAITIS, V.; PETRAITIENE, R.; FIELD-RIDLEY, A.; SUTTON, D.; GHANNOUM, M. et al. Experimental pulmonary aspergillosis due to *Aspergillus terreus*: pathogenesis and treatment of an emerging fungal pathogen resistant to amphotericin B. *J. Infect. Dis*, 188: 305-319, 2003.

WEI-YUN ZHU, GOODAY, G.W. Effects of nikkomycin and echinocandin on differentiated and undifferentiated mycelia of *Botrytis cinerea* and *Mucor rouxii*. **Mycol. Res**, 96(5): 371-377, 1992.

WOODS, G.L.; DAVIS, J.C.; VAUGHAN, W.P. Failure of the sterile air-flow component of a protected environment detected demonstration of *Chaetomium* species colonization of four consecutive immunosuppressed occupants. **Infect Control Hospital Epidemiol**, 9(10): 451-456, 1988.

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

* ABNT/NBR 6023 (AGO 2002)

7 - BIBLIOGRAFIA DE NORMATIZAÇÃO

Normas, Procedimentos e Orientações para Publicação de Dissertações e Teses. Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, 2004.

Elaboração de Trabalhos Científicos, Trabalho de Conclusão de Curso: Monografia, Dissertação e Tese. Seção de Referência – Diretoria de Serviços ao Público, Biblioteca Central, SBU - Campinas, 2003.

8 - ANEXOS

Definições de Aspergilose e Fusariose

- **Invasiva confirmada:** exame histopatológico e cultura do tecido positiva para *Aspergillus* spp e *Fusarium* spp.

- **Invasiva provável:** paciente com fator de risco (neutropenia, uso de esteróide e DEVH), acompanhado de sinais e sintomas sugestivos de aspergilose invasiva e ou imagem radiológica e ou tomografia compatível e cultura de espécimes clínicos não estéril como: escarro, swab nasal, secreção traqueal positiva para *Aspergillus* spp e *Fusarium* spp.

- **Invasiva possível:** paciente com fator de risco (neutropenia, uso de esteróide e DEVH), acompanhado de sinais e sintomas sugestivos de aspergilose invasiva e ou imagem radiológica e ou tomografia compatível.

Sinais e sintomas sugestivos de aspergilose invasiva: febre, dor plerítica, quadro neurológico e sinusite.

Febre: temperatura axilar $\geq 37,8^{\circ}\text{C}$

Hipotermia: temperatura axilar $\leq 35^{\circ}\text{C}$

Neutropenia: contagem de neutrófilos ≤ 500 células/ mm^3

Neutropenia grave: contagem de neutrófilos < 100 células/ mm^3

(MARR et al, 2002)

Histórico resumido dos pacientes

LIF 8/98: paciente do sexo feminino, 64 anos, com antecedentes de cirurgia e quimioterapia por adenocarcinoma de ovário, tendo evoluído para leucemia mielóide aguda. A broncoscopia revelou discreto processo inflamatório de mucosa brônquica. Em 20/11/98 a cultura de lavado broncoalveolar foi positiva para *Fusarium* sp, iniciando uso de anfotericina B 50 mg/dia mas foi a óbito em 22/11/98.

LIF13/97: paciente do sexo feminino, 22 anos, com queixa de emagrecimento de 6 kilos em 30 dias, queda de cabelo, hematomas pelo corpo e dor óssea. Foi diagnosticada leucemia mielóide crônica. O exame anátomo-patológico de biópsia cutânea do braço esquerdo revelou presença de elementos fúngicos em 29/08/97. A paciente passou a receber 60mg/dia de anfotericina B. Em 31/08/97 a hemocultura foi positiva para *Fusarium* sp e em 02/09/97 a paciente foi a óbito tendo como causa infecção por *Fusarim* sp.

LIF 152/01: paciente do sexo masculino, 15 anos, desde os 5 meses de idade com diagnóstico de cistinose evoluindo para insuficiência renal crônica. Passou a fazer hemodiálise e diálise peritoneal em casa. Foi internado no serviço de pediatria com febre e sinais de infecção peritoneal. A cultura de liquido peritoneal revelou crescimento de *Fusarium* sp. Foi adicionado itraconazol à bolsa de diálise sem sucesso. Foi administrada anfotericina B, IV, 0,5 mg/Kg/22 dias em dias alternados resultando em cura da peritonite fúngica.

LIF 275/02: paciente do sexo masculino, 20 anos, com diagnóstico de leucemia mielóide aguda, apresentou processo inflamatório em fossa ilíaca esquerda. Em 30/07/02, tinha contagem de leucócitos igual a 700 células/mm³ e hemocultura positiva para *Fusarium* sp. Inicia-se o tratamento com anfotericina B 50 mg/dose, no entanto, o paciente vai a óbito.

LIF 38/99: paciente do sexo masculino, 31 anos, com leucemia mielóide crônica, submetido a transplante de medula óssea alogênico em 15/04/99. Após avaliação de colonização com cultura positiva para *Aspergillus flavus* isolado de swab nasofaríngeo,

apresentou imagem radiológica e broncoscopia compatível com abscesso pulmonar. Cultura de lavado broncoalveolar revelou a presença de *Aspergillus flavus*. O paciente respondeu bem ao tratamento com anfotericina B 3550 mg.

LIF 124/01: paciente do sexo feminino, 40 anos, com deficiência de fagocitose, apresentando queixa de dor torácica, fez drenagem de tórax e foi tratada com itraconazol 200 mg/dia/2 meses. Em 29/01/01 cultura de secreção de pleurostomia foi positiva para *Aspergillus fumigatus*. Em 03/07/01 pneumotórax evoluiu para fístula pulmonar por *Aspergillus*. A paciente foi tratada com anfotericina B 1375 mg durante dois meses e evoluiu para cura.

LIF 320/02: paciente do sexo masculino, 43 anos, com adenocarcinoma de laringe há 4 meses, chega ao serviço com queixa de dor torácica. A broncoscopia confirmou a presença de bola fúngica em lobo pulmonar superior esquerdo. A cultura de escarro foi positiva para *Aspergillus fumigatus*. O tratamento foi feito com anfotericina B 25 a 50 mg/dia. O paciente abandonou o tratamento por intolerância ao uso de anfotericina B.

LIF 108/03: paciente do sexo masculino, 22 anos, com leucemia mieloide aguda, submetido a transplante de medula óssea alogênico em 07/10/03. Em 26/11/02 resultado de tomografia apresenta opacidade pulmonar irregular com predomínio nas bases, derrame pleural bilateral e lesão focal hepática. Em 29/11/02 a biópsia apresentou diagnóstico definido de DEVH crônica. Em 18/01/03 a hemocultura foi positiva para *Aspergillus terreus* e em 23/01/03 a cultura de catéter também foi positiva para *A. terreus*. O paciente começou a fazer uso de anfotericina B, 50 mg em dias alternados. A dose de anfotericina B passou para 85 mg por dia após a confirmação de infecção fúngica conjuntamente com 50 mg de caspofungina. O paciente foi transferido para o Hospital Vera Cruz para receber voriconazol. Em 06/03/03 a hemocultura foi negativa e confirmada em 24/04/03. Em 03/07/03 a pesquisa para fungos na urina também foi negativa. Em 15/07/03 o paciente foi a óbito por leucemia mielóide aguda com recidiva de neuroma após transplante alogênico sendo a Aspergilose disseminada outra condição significativa que contribuiu para o óbito.

Cepas selecionadas para estudo

Cepa	Identificação	Material Clínico	Idade	Sexo	Clínica	Doença de base	Definição da infecção fúngica*	Tratamento	Evolução
LIF 8/98	<i>Fusarium solani</i>	Lavado broncoalveolar	64	FEM	Hematologia	Leucemia mielóide aguda	Fusariose confirmada	Fluconazol: 200 mg/dia Anfotericina B: 50 mg/dia	ÓBITO
LIF 13/97	<i>Fusarium solani</i>	Sangue	23	FEM	Hematologia/ Transplante de Medula óssea	Leucemia mielóide crônica	Fusariose confirmada	Anfotericina B: 60mg/dia	ÓBITO
LIF152/01	<i>Fusarium solani</i>	Líquido peritoneal	15	MASC	Pediatria	Insuficiência renal crônica	Fusariose confirmada (peritonite fúngica)	Itraconazol, Anfotericina B: 0,5mg/Kg/22dias alternados	ALTA/ CURA
LIF275/02	<i>Fusarium oxysporum</i>	Sangue	20	MASC	Hematologia	Leucemia mielóide aguda	Fusariose confirmada	Anfotericina B: 50mg/dia (1 dose)	ÓBITO
LIF 38/99	<i>Aspergillus flavus</i>	Lavado broncoalveolar	31	MASC	Transplante de Medula óssea	Leucemia mielóide crônica	Aspergilose invasiva possível	Anfotericina B: 3550mg	ALTA/ CURA
LIF124/01	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Secreção de pleurostomia	40	FEM	Pneumologia	Deficiência de fagocitose	Aspergilose invasiva possível	Anfotericina B: 1375 mg Itraconazol: 200mg/dia/2mês	ALTA/ CURA
LIF320/02	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Lavado brônquico	43	MASC	Moléstias infecciosas	Câncer de laringe/Bola fúngica	Aspergilose invasiva possível	Anfotericina B 25 a 50 mg/dia	ABANDONO
LIF108/03	<i>Aspergillus terreus</i>	Sangue	22a	MASC	Hematologia/ Transplante de Medula óssea	Leucemia mielóide aguda	Aspergilose invasiva confirmada	Anfotericina B: 85 mg/dia. Caspofungina 50 mg/dia	ÓBITO

* As definições de IFI foram baseados nos critérios da EORT/NIH CID 2002 conforme documento que encontram-se detalhados no anexo 1(MARR et al, 2002).

**PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO DE ESPÉCIES DE *Aspergillus* E *Fusarium* PARA
AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DAS HIFAS PELO SISTEMA
AUTOMATIZADO BIOCELL-TRACER®**

Tabela 2 - Padronização do teste para as cepas de *Aspergillus* spp no sistema automatizado BioCell-Tracer®

Parâmetros avaliados	Parâmetros obtidos para os microrganismos			
	<i>A. terreus</i> (108/03)	<i>A. flavus</i> (38/99)	<i>A. fumigatus</i> (124/01)	<i>A. fumigatus</i> (320/02)
tempo de crescimento prévio da cultura fúngica	7 dias a TA	7 dias a TA	7 dias a TA	7 dias a TA
concentração ideal de Poli-l-Lisina	0,02%	0,05%	0,02%	0,02%
concentração do inóculo em 10µl	10 ³ conídios	10 ³ conídios	10 ³ conídios	10 ³ conídios
tempo e temperatura de incubação prévia com RPMI	18 à 24 h a 35°C	18 à 24 h a 35°C	18 à 24 h a 35°C	18 à 24 h a 35°C
temperatura de execução do teste	35°C	35°C	35°C	35°C

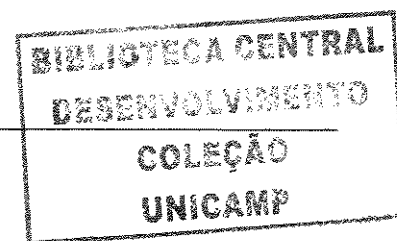


Tabela 3 - Padronização do teste para as cepas de *Fusarium* spp no sistema automatizado BioCell-Tracer®

Parâmetros avaliados	Parâmetros obtidos para os microrganismos			
	<i>F. solani</i> (8/98)	<i>F. solani</i> (13/97)	<i>F. solani</i> (152/01)	<i>F. oxysporum</i> (275/02)
tempo de crescimento prévio da cultura fúngica	7 dias a TA	7 dias a TA	7 dias a TA	7 dias a TA
concentração ideal de Poli-L-Lisina	0,05%	0,05%	0,05%	0,05%
concentração do inóculo em 10µl	10 ⁴ conídios	10 ⁶ conídios	10 ⁶ conídios	10 ⁶ conídios
tempo e temperatura de incubação prévia com RPMI	48 à 72 h a 35°C	24 à 48 h a 35°C	24 à 48 h a 35°C	24 à 48 h a 35°C
temperatura de execução do teste	35°C	35°C	35°C	35°C

**AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E DA
CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM) PELO MÉTODO DE
MICRODILUIÇÃO EM CALDO (CLSI M38-A, 2002) E PELO SISTEMA
BIOCELL-TRACER DAS CEPAS DE *Aspergillus spp* E *Fusarium spp*. ISOLADAS
DE PACIENTES**

Tabela 4 - Valores de concentração inibitória mínima (CIM) e valores de média e mediana de concentração fungicida mínima (CFM) de anfotericina B, frente as cepas selecionadas para o estudo.

Cepa		CIM ($\mu\text{g/ml}$)		CFM ($\mu\text{g/ml}$)	
		Conídio	Hifa*	Conídio	Hifa [#]
LIF8/98	<i>F. solani</i>	4,0	>4,0 (a) 1,0 (b)	4,0	>4,0 (a) 1,0 (b)
LIF13/97	<i>F. solani</i>	2,0	2,0 (a) $\leq 0,5$ (b)	2,0	>2,0 (a) 2,0 (b)
LIF152/01	<i>F. solani</i>	1,0	>2,0 (a) 1,0 (b)	1,0	>2,0 (a) 1,0 (b)
LIF275/02	<i>F. oxysporum</i>	2,0	>2,0 (a) 2,0 (b)	2,0	>2,0 (a) >2,0 (b)
LIF38/99	<i>A. flavus</i>	2,0	>2,0 (a) 1,0 (b)	2,0	>2,0 (a) 2,0 (b)
LIF124/01	<i>A. fumigatus</i>	1,0	>1,0 (a) 0,5 (b)	1,0	>1,0 (a) >1,0 (b)
LIF320/02	<i>A. fumigatus</i>	2,0	>2,0 (a) 1,0 (b)	2,0	>2,0 (a) >2,0 (b)
LIF108/03	<i>A. terreus</i>	8,0	8,0 (a) $\leq 2,0$ (b)	32,	8,0 (a) 4,0 (b)

Leitura dos testes: conídios 100% (CLSI, 2002) *hifa valor da CIM pelo BCT considerando $\geq 95\%$ de inibição, [#]hifa valor da CFM pelo BCT considerando $\geq 99,9\%$ de inibição.

(a) valores de média, (b) valores de mediana.

Tabela 5 - Valores de concentração inibitória mínima (CIM) e valores de média e mediana de concentração fungicida mínima (CFM) de itraconazol, frente as cepas selecionadas para o estudo.

Cepa		CIM ($\mu\text{g/ml}$)		CFM ($\mu\text{g/ml}$)	
		Conídio	Hifa*	Conídio	Hifa [#]
LIF8/98	<i>F. solani</i>	≥ 128	>128 (a) >128 (b)	≥ 128	>128 (a) >128 (b)
LIF13/97	<i>F. solani</i>	≥ 128	128 (a) >128 (b)	≥ 128	>128 (a) >128 (b)
LIF152/01	<i>F. solani</i>	≥ 128	>128 (a) >128 (b)	≥ 128	>128 (a) >128 (b)
LIF275/02	<i>F. oxysporum</i>	≥ 128	>128 (a) >128 (b)	≥ 128	>128 (a) >128 (b)
LIF38/99	<i>A. flavus</i>	0,5	>0,5 (a) >0,5 (b)	0,5	>0,5 (a) >0,5 (b)
LIF124/01	<i>A. fumigatus</i>	1,0	>1,0 (a) 1,0 (b)	1,0	>1,0 (a) >1,0 (b)
LIF320/02	<i>A. fumigatus</i>	8,0	>8,0 (a) >8,0 (b)	8,0	>8,0 (a) >8,0 (b)
LIF108/03	<i>A. terreus</i>	0,125	>0,5 (a) >0,5 (b)	0,5	>0,5 (a) >0,5 (b)

Leitura dos testes: conídios 100% (CLSI, 2002) *hifa valor da CIM pelo BCT considerando $\geq 95\%$ de inibição, [#]hifa valor da CFM pelo BCT considerando $\geq 99,9\%$ de inibição.

(a) valores de média, (b) valores de mediana.

Tabela 6 - Valores de concentração inibitória mínima (CIM) e valores de média e mediana de concentração fungicida mínima (CFM) de voriconazol, frente as cepas selecionadas para o estudo.

Cepa		CIM ($\mu\text{g/ml}$)		CFM ($\mu\text{g/ml}$)	
		Conídio	Hifa [*]	Conídio	Hifa [#]
LIF8/98	<i>F. solani</i>	2,0		2,0	
LIF13/97	<i>F. solani</i>	1,0		1,0	
LIF152/01	<i>F. solani</i>	1,0		1,0	
LIF275/02	<i>F. oxysporum</i>	2,0		2,0	
LIF38/99	<i>A. flavus</i>	4,0		4,0	
LIF124/01	<i>A. fumigatus</i>	4,0		4,0	
LIF320/02	<i>A. fumigatus</i>	2,0		2,0	
LIF108/03	<i>A. terreus</i>	4,0	>4,0 (a) >4,0 (b)	4,0	>4,0 (a) >4,0 (b)

Leitura dos testes: conídios 100% (CLSI, 2002) *hifa valor da CIM pelo BCT considerando $\geq 95\%$ de inibição, #hifa valor da CFM pelo BCT considerando $\geq 99,9\%$ de inibição.

(a) valores de média, (b) valores de mediana.

AValiação DO CRESCIMENTO DAS HIFAS DE *Aspergillus spp* E *Fusarium spp*. ISOLADAS DE PACIENTES E SUA INIBIÇÃO FRENTE A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ANTIFÚNGICOS PELO SISTEMA BioCell tracer

Tabela 7 - Valores de média (a) e da mediana (b) de crescimento e taxa de inibição de crescimento das hifas de *Aspergillus spp* pela técnica do BioCell-tracer frente a anfotericina B e itraconazol.

Concentração dos Antifúngicos		Período de crescimento (µm/5min)											
		LIF38/89 <i>A. flavus</i>			LIF124/01 <i>A. fumigatus</i>			LIF320/02 <i>A. fumigatus</i>			LIF106/03 <i>A. terreus</i>		
		Crescimento (µm/min)			Crescimento (µm/min)			Crescimento (µm/min)			Crescimento (µm/min)		
Antifúngicos	Concentração (µg/mL)	Pré	Exp	Pos	Pré	Exp	Pos	Pré	Exp	Pos	Pré	Exp	Pos
		Taxa de inibição (%)			Taxa de inibição (%)			Taxa de inibição (%)			Taxa de inibição (%)		
ANB	8,0	(a)											
	(b)												
	4,0	(a)											
	(b)												
	2,0	(a)	6,59	0,56	0,01	91,5	99,6						
	(b)	7,45	0,0	0,0	100	100							
	1,0	(a)	4,51	0,43	0,05	90,4	98,8	4,24	0,03	0,05			
	(b)	4,75	0,15	0,05	96,8	98,9	4,42	0,15	0,05				
	0,5	(a)	7,91	1,83	0,19	76,8	97,5	6,61	1,67	0,11			
	(b)	7,84	0,64	0,01	91,8	99,8	6,84	0,19	0,09				
ITZ	8,0	(a)											
	(b)												
	4,0	(a)											
	(b)												
	2,0	(a)											
	(b)												
	1,0	(a)											
	(b)												
	0,5	(a)	10,26	3,14	0,18	89,3	98,2						
	(b)	10,19	1,16	0,13	88,6	98,7	8,85	0,84	0,86				
VCZ	8,0	(a)											
	(b)												
	4,0	(a)											
	(b)												
	2,0	(a)	5,60	3,30	0,21	41,0	98,2	4,99	3,18	3,89			
	(b)	5,79	2,91	0,09	49,7	98,4	5,04	3,69	4,15				
	0,125	(a)	10,55	4,28	2,17	59,4	79,4						
	(b)	10,74	4,00	2,52	62,7	75,5							
	4,0	(a)											
	(b)												
VCZ	8,0	(a)											
	(b)												
	4,0	(a)											
	(b)												
	2,0	(a)											
	(b)												
	1,0	(a)											
	(b)												
	0,125	(a)											
	(b)												

Tabela 8 - Valores de média (a) e da mediana (b) de crescimento e taxa de inibição de crescimento das hifas de *Fusarium* spp pela técnica do BioCell-tracer frente a anfotericina B e itraconazol.

Antifúngicos		Concentração dos antifúngicos (µg/mL)		Ocupas Avaliadas																			
				LIF898 <i>F. solari</i>					LIF1397 <i>F. solari</i>					LIF15201 <i>F. solari</i>					LIF27502 <i>F. oxysporum</i>				
				Crescimento (µm/min)		Taxa de inibição (%)			Crescimento (µm/min)		Taxa de inibição (%)			Crescimento (µm/min)		Taxa de inibição (%)			Crescimento (µm/min)		Taxa de inibição (%)		
				Pré	Exp	Pós	Exp		Pós	Pré	Exp	Pós		Exp	Pós	Pré	Exp		Pós	Exp	Pós	Pré	Exp
ANB	4,0	(a)	2,70	0,21	0,05	92,2	98,1	4,39	0,08	0,05	98,1	98,8	0,91	0,17	0,03	81,3	96,7	5,57	0,41	0,10	92,6	98,2	
		(b)	2,78	0,04	0,00	98,5	100		4,27	0,01	0,0	99,7		100	0,89	0,02	0,0		97,7	100	5,91	0,09	0,02
	2,0	(a)	2,43	0,32	0,06	86,8	97,5	4,91	1,01	0,09	79,4	98,1	1,49	0,16	0,01	89,2	99,3	2,31	0,15	0,09	93,5	96,1	
		(b)	2,53	0,05	0,0	98,0	100		4,84	0,18	0,03	96,2		99,3	1,46	0,0	0,0		100	100	1,81	0,15	0,08
	1,0	(a)	3,87	0,36	0,02	90,6	99,4	5,51	0,60	0,05	89,1	99,0	1,12	0,31	0,27	72,3	75,8	3,97	0,96	0,20	75,8	94,9	
		(b)	4,16	0,0	0,0	100	100		5,57	0,12	0,04	97,8		99,2	1,18	0,18	0,20		84,7	83,0	3,86	0,30	0,04
	0,5	(a)	2,22	0,79	0,05	64,4	97,7	2,51	2,39	2,74	95,2	0,0	1,15	0,50	0,29	75,7	99,2	4,13	3,27	2,81	20,8	31,9	
		(b)	2,29	0,34	0,05	85,1	97,8		2,36	2,64	2,82	0,0		0,0	0,96	0,42	0,22		96,4	100	4,11	3,54	2,95
	ITZ	128	(a)	2,18	2,56	2,66	0,0	0,0	2,51	2,39	2,74	95,2	0,0	1,15	0,50	0,29	75,7	99,2	4,13	3,27	2,81	20,8	31,9
			(b)	2,08	2,59	2,69	0,0	0,0	2,36	2,64	2,82	0,0	0,0	0,96	0,42	0,22	96,4	100	4,11	3,54	2,95	13,8	28,2