



ADENILZA CRISTINA DA SILVA FONSECA

**IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DE SUSCETIBILIDADE A
ANTIFÚNGICOS DE AGENTES CAUSAIS DE MUCORMICOSE**

UNICAMP

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

ADENILZA CRISTINA DA SILVA FONSECA

**IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DE SUSCETIBILIDADE A
ANTIFÚNGICOS DE AGENTES CAUSAIS DE MUCORMICOSE**

Orientadora: Profa. Dra. Angélica Zaninelli Schreiber

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas para obtenção de título de Mestra em Ciências Médicas, área de concentração em Ciências Biomédicas

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA
DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA ADENILZA
CRISTINA DA SILVA FONSECA E ORIENTADO PELA PROFA.
DRA. ANGÉLICA ZANINELLI SCHREIBER.

* Assinatura do Orientador

UNICAMP
2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Si38i Silva Fonseca, Adenilza Cristina da, 1986-
Identificação e avaliação de suscetibilidade a antifúngicos de agentes causais de mucormicose / Adenilza Cristina da Silva Fonseca. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Angélica Zaninelli Schreiber.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Mucormicose. 2. Antifúngicos. 3. Hifas. 4. Esporos fúngicos. 5. Biologia molecular. I. Schreiber, Angélica Zaninelli, 1965-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Identification and antifungal susceptibility evaluation of mucormycosis causative agents

Palavras-chave em inglês:

Mucormycosis

Antifungal agents

Hyphae

Spores, Fungal

Molecular biology

Área de concentração: Ciências Biomédicas

Titulação: Mestra em Ciências Médicas

Banca examinadora:

Angélica Zaninelli Schreiber [Orientador]

Rinaldo Poncio Mendes

Silvia de Barros Mazon

Data de defesa: 21-07-2014

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

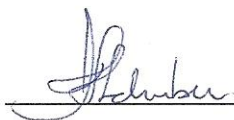
BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

ADENILZA CRISTINA DA SILVA FONSECA

Orientador (a) PROF(A). DR(A). ANGÉLICA ZANINELLI SCHREIBER

MEMBROS:

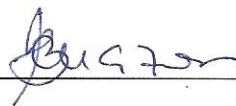
1. PROF(A). DR(A). ANGÉLICA ZANINELLI SCHREIBER



2. PROF(A). DR(A). RINALDO PONCIO MENDES



3. PROF(A). DR(A). SILVIA DE BARROS MAZON



Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas

Data: 21 de julho de 2014

DEDICO ESTE TRABALHO...

À Deus por todos os acontecimentos durante este caminho....

A minha família pelos ensinamentos de coragem, pelos conselhos e por sempre estarem do meu lado mesmo distantes....

Ao meu marido Douglas pelo amor, incentivo e apoio incondicional....

A todos os meus amigos, especialmente meus amigos de pós-graduação, sempre prontos a me ajudar.

Compartilho esta conquista com vocês.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pelo amor, confiança, apoio e compreensão nesta jornada;

Ao meu marido Douglas pela força e apoio nos momentos de dificuldade de forma incondicional;

À minha orientadora Profa. Dra. Angélica Zaninelli Schreiber pelos conselhos, ensinamentos, compreensão, paciência e pela grande oportunidade de minha vida de trabalhar ao seu lado e de tantas pessoas exemplares. Agradeço imensamente por toda a orientação concedida contribuindo tanto para o meu crescimento científico quanto pessoal.

À profa. Dra. Fernanda Simas Correa pelos ensinamentos iniciais e pela paciência.

À Profa. Dra. Ana Beatriz Alkmim Teixeira-Loyola que me ajudou sempre em todos os momentos que eu mais precisava, principalmente com os experimentos realizados com o Biocell - Tracer®, no esclarecimento de dúvidas e ensinamentos transmitidos. Agradeço muito pela co-orientação na elaboração do artigo e deste trabalho.

A todos os docentes do Mestrado em Ciências Médicas/FCM/UNICAMP pela dedicação e conhecimentos transmitidos.

Aos todos os meus colegas de graduação e pós-graduação pelo companheirismo e troca de informações durante as disciplinas do curso e em especial Michela Ferrari, Franqueline Reichert, Marcela Souza, Isabela Hadadd, Laís e Pâmela, pela amizade, pela ajuda e apoio.

A todos os funcionários da Pós-Graduação em Ciências Médicas/FCM/UNICAMP e do Departamento de Patologia Clínica pelo apoio e orientações.

A todos os meus colegas do Laboratório de Microbiologia e do Laboratório de Investigação em Fungos, do Departamento de Patologia Clínica/FCM/UNICAMP, em especial Luzia Lyra e Edson, pela amizade, ensinamento, ajuda, disponibilidade, paciência e sábios conselhos. Agradeço a todos pelo apoio durante a execução deste trabalho.

A todos os funcionários e colegas do Laboratório de Epidemiologia Molecular e Doenças Infecciosas da FCM/UNICAMP, em especial Érvan Ribeiro, Ariane Fidelis Busso e Cibele Tararam, pela paciência, amizade, companheirismo e ajuda constante durante a execução deste trabalho. Agradeço também a profa. Dra. Maria Luiza Moretti.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

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

À Japan International Corporation Agency – JICA, pelo apoio financeiro para realização desta pesquisa.

Ao Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicosis da Universidade de Chiba, Chiba – Japão pela colaboração.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

*"Não importa onde você
parou... em que momento da
vida cansou... o que importa é
que sempre é possível e
necessário recomeçar"*

(Carlos Drummond de Andrade)

RESUMO

Introdução: Mucormicose é uma infecção oportunista invasiva causada por fungos filamentosos denominados de *Mucorales*, antes *Zygomycetes*, de difícil tratamento e, com mau prognóstico em pacientes imunocomprometidos, caracterizada por manifestações rinocerebrais, pulmonares ou disseminadas. Espécies dos gêneros *Rhizopus*, *Mucor*, *Absidia* (*Lichtheimia*) e *Rhizomucor*, são os *Mucorales* mais isolados de pacientes. São micro-organismos resistentes a voriconazol e equinocandinas *in vitro* e *in vivo*. A terapia inclui a reversão dos fatores predisponentes, retirada cirúrgica da área infectada e administração de antifúngicos, em geral, anfotericina B, de atividade terapêutica limitada e muitos efeitos colaterais. **Objetivos:** Identificação dos isolados de *Mucorales* selecionados para o estudo por metodologia clássica e técnicas moleculares; padronização da técnica de microdiluição em caldo para avaliação de suscetibilidade aos antifúngicos isolados: anfotericina B; 5-fluorocitosina; fluconazol; micafungina; itraconazol; voriconazol; miconazol e terbinafina de outros gêneros de *Mucorales* que não *Rhizopus* spp.; avaliação da Concentração Inibitória Fracional para determinação do tipo de interação que ocorre entre as combinações de antifúngicos anfotericina B x itraconazol; anfotericina B x voriconazol; terbinafina x itraconazol; terbinafina x voriconazol e terbinafina x anfotericina B; padronização da metodologia de avaliação dinâmica de crescimento para o gênero *Rhizopus* sp. e *Rhizopus oryzae* (LIF 1832), para possível estabelecimento de correlação clínico-laboratorial já que este foi isolado de um paciente em tratamento de mucormicose. **Metodologia:** Estudo realizado com 10 isolados clínicos de *Mucorales* com identificação morfológica prévia de gênero. A identificação molecular foi realizada com os iniciadores ITS1/ITS4; ITS4/ITS5 e NL1/NL4. Os testes de suscetibilidade aos antifúngicos isolados, *in vitro*, foram realizados pelo método de microdiluição em caldo (CLSI M38-A2). Os antifúngicos combinados foram analisados de acordo com a metodologia do “tabuleiro de xadrez”. Já a avaliação dinâmica de crescimento de hifas frente aos antifúngicos anfotericina B, itraconazol e terbinafina para o isolado *Rhizopus oryzae* (LIF 1832) foi realizada através do sistema Biocell-Tracer®. **Resultados:** As identificações morfológica e molecular foram discordantes para os isolados LIF 1237 e 1832, classificados morfológicamente como *Absidia* (*Lichtheimia*) sp. e *Rhizomucor* sp. e identificados como *Rhizopus oryzae* após sequenciamento de DNA. Considerando todos os isolados, as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) foram de: 8 a ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$ para micafungina, de 0,25 a 8 $\mu\text{g/mL}$ para anfotericina B, ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$ para

5-fluorocitosina, de 16 a ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$ para fluconazol, de 1 a > 8 $\mu\text{g/mL}$ para itraconazol, > 8 $\mu\text{g/mL}$ para voriconazol; de 0,25 a 4 $\mu\text{g/mL}$ para miconazol e de 0,031 a > 128 $\mu\text{g/mL}$ para terbinafina. As interações resultantes da combinação de antifúngicos foram de: 100% de sinergismo entre anfotericina B x voriconazol e anfotericina B x itraconazol; 90% de sinergismo entre terbinafina x itraconazol; 80% de sinergismo entre terbinafina x voriconazol e 100% de sinergismo para a combinação de terbinafina x anfotericina B. As taxas de inibição de crescimento das hifas do isolado *Rhizopus oryzae* (LIF 1832) frente aos valores de CIMs obtidos pelo método de microdiluição em caldo foram: 88,25% para anfotericina B; 0% para itraconazol e 98,70% para terbinafina. O teste com a combinação de concentrações séricas de itraconazol e terbinafina resultaram em 49,8% de taxa de inibição. **Conclusões:** Foi observada divergência entre identificação morfológica e molecular para dois isolados. Perfis diferentes de sensibilidade aos antifúngicos foram observados dependendo das espécies. Os antifúngicos mais ativos contra a maioria dos isolados foram anfotericina B e itraconazol. Valores de CIM bem baixos para terbinafina foram observados para *Cunninghamella bertholletiae* e *Syncephalastrum racemosum* e todos os isolados foram altamente resistentes a micafungina, 5-fluorocitosina, fluconazol e voriconazol. Os testes de antifúngicos combinados mostraram redução da CIM dos antifúngicos em associação. CIMs elevadas para terbinafina foram observadas para os isolados de *R. oryzae* e *R. stolonifer* enquanto que no teste de combinação valores baixos de CIMs foram encontrados, o que ressalta a importância da combinação de antifúngicos no manejo de mucormicose. A taxa de inibição do crescimento das hifas para o isolado LIF 1832 frente aos antifúngicos isolados sugere que hifas podem ser mais suscetíveis que esporos frente aos antifúngicos avaliados. Apesar de não muito alta, a taxa de inibição de crescimento das hifas frente à anfotericina B e à combinação das concentrações séricas de terbinafina e itraconazol pode estar favoravelmente relacionada ao desfecho clínico do paciente em tratamento de mucormicose.

Palavras-Chave (DECS): Mucormicose, antifúngicos, hifas, esporos fúngicos, biologia molecular

ABSTRACT

Introduction: Mucormycosis is an invasive opportunistic infection caused by filamentous fungi called *Mucorales* (formerly *Zygomycetes*), difficult to treat, and with poor prognosis in immunocompromised patients, characterized by rhino-cerebral, pulmonary or disseminated manifestations. Species of the genera *Rhizopus*, *Mucor*, *Absidia* (*Lichtheimia*) and *Rhizomucor* are the *Mucorales* most commonly isolated from patients and show resistance to voriconazole and echinocandins *in vitro* and *in vivo*. Therapy includes to reverse predisposing factors, surgical removal of the infected area and administration of antifungal agents, in general, Amphotericin B, with limited therapeutic activity and many side effects. **Objectives:** identification of selected *Mucorales* isolates by morphological and molecular methods; standardization of broth microdilution for antifungal susceptibility assessment of other *Mucorales* genera except *Rhizopus* to the alone antifungals: amphotericin B, fluorocytosine, fluconazole, Itraconazole, voriconazole ; miconazole and terbinafine; establish Fractional Inhibitory Concentration to determine the type of interaction that occurs between combinations of Amphotericin B/Itraconazole; Amphotericin B/Voriconazole; Terbinafine/Itraconazole; Terbinafine/Voriconazole and Terbinafine/Amphotericin B; standardization of the dynamic growth methodology for evaluation *Rhizopus* sp. and study of isolate *Rhizopus oryzae* (LIF 1832), for possible establishment of clinical-laboratory correlation this was isolated from a patient undergoing treatment for mucormycosis. **Material and Methods:** This study evaluated 10 clinical *Mucorales* isolates with previous morphological gender identification. The molecular identification was performed with primers ITS1/ITS4; ITS4/ITS5 and NL1/NL4. The antifungal susceptibility *in vitro* was performed by broth microdilution method (CLSI M38-A2). Antifungal combinations were analyzed according to the "chessboard" methodology . The dynamic evaluation of hyphal growth for the isolate *Rhizopus oryzae* (LIF 1832) for the antifungals amphotericin B, terbinafine and itraconazole, was carried through the BioCell-Tracer system. **Results:** The morphological and molecular identifications were discordant for LIF 1237 and LIF 1832 isolates, classified morphologically as *Absidia* (*Lichtheimia*) sp. and *Rhizomucor* sp. and after DNA sequencing both as *Rhizopus oryzae*. Considering all isolates, the minimum inhibitory concentrations (MICs) were 8 to ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$ for Micafungin; from 0.25 to 8 $\mu\text{g/mL}$ for Amphotericin B , ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$ for 5 – Fluorocytosine; of 16 to ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$ for Fluconazole; 1 to > 8 $\mu\text{g/mL}$ for Itraconazole; > 8 $\mu\text{g/mL}$ for Voriconazole ; 0.25 to 4 $\mu\text{g/mL}$ for Miconazole and from 0.031 to > 128 $\mu\text{g/mL}$

for Terbinafine. Interactions resulting from the combination of antifungals were: 100% synergism for Amphotericin B/Voriconazole and Amphotericin B/Itraconazole; 90% synergism between Terbinafine/Itraconazole; 80% synergism between Terbinafine/Voriconazole and 100% synergism for the combination Terbinafine/Amphotericin B. The hyphae growth inhibition rates obtained for microdilution method MIC values for *Rhizopus oryzae* (LIF 1832) were 88.25%, for Amphotericin B; 0% for itraconazole and 98.70% to terbinafine. Combined Itraconazole and Terbinafine serum concentrations showed 49.8% of growth inhibition rate. **Conclusions:** Divergence between morphological and molecular identification for two isolates was observed. Different antifungal susceptibility profiles were observed depending on the species. The most active antifungal agents were Amphotericin B and Itraconazole. MICs for Terbinafine very low were observed to the *Syncephalastrum racemosum* and *C.bertholletiae* and all isolates were highly resistant to Micafungin, 5- Fluorocytosine, Fluconazole and Voriconazole. It was possible to observe antifungal MIC reduction in combined tests. MICs high for terbinafine alone were observed to the *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus stolonifer* while in the combo test low MIC values were observed, which highlights the importance of combining antifungal drugs in the management of mucormycosis. The hypha growth inhibition rates obtained for *Rhizopus oryzae* (LIF 1832) against antifungal isolates suggest that hyphae may be more susceptible to antifungal agents against spores. Although not too high, the hyphae growth inhibition rate obtained for the combination serum achievable concentrations of Terbinafine and Itraconazole can probably be related to the clinical outcome.

Key words: Mucormycosis, antifungals, hyphae, spores, molecular biology.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1:	Regiões do rRNA: subunidade ribossomal pequena (SSU) subunidade ribossomal grande (LSU)	53
FIGURA 2:	Esquema representativo do sistema BioCell-Tracer®	57
FIGURA 3:	Fotografia do aparelho BioCell-Tracer®	58
FIGURA 4:	Monitorização do crescimento da hifa	59
FIGURA 5:	Elementos utilizados para o cálculo do crescimento de hifas	59
FIGURA 6:	Esquema de preparo da placa de microtitulação para o teste	71
FIGURA 7:	Esquema representativo da montagem e leitura da placa de microdiluição no teste de combinação de antifúngicos pelo método do “tabuleiro de xadrez”	75
FIGURA 8:	Estruturas características da morfologia do isolado de <i>Cunninghamella bertholletiae</i> (LIF 299, 300 e 301)	81
FIGURA 9:	Estruturas características da morfologia do isolado de <i>Rhizopus</i> sp. (LIF 1046, 1143 e 1455 e 1820)	82
FIGURA 10:	Estruturas características da morfologia do isolado de <i>Absidia</i> (<i>Lichtheimia</i>) sp. (LIF 1237)	82
FIGURA 11:	Estruturas características da morfologia do isolado de <i>Rhizomucor</i> sp. (LIF 1832)	83
FIGURA 12:	Estruturas características da morfologia do isolado de <i>Syncephalastrum</i> sp. (LIF 1834)	83
FIGURA 13:	Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos obtidos pela amplificação pela PCR	85

FIGURA 14:	Filogenia e comparação entre identificação morfológica e molecular para os isolados em estudo	86
FIGURA 15:	Acompanhamento de crescimento de hifas de <i>Rhizopus oryzae</i> (LIF 1832) frente ao antifúngico anfotericina B nas concentrações de 0,5; 0,25; 0,125 e 0,06 µg/mL	95
FIGURA 16:	Acompanhamento de crescimento de hifas de <i>Rhizopus oryzae</i> (LIF 1832) frente ao antifúngico terbinafina nas concentrações de 128; 64 e 32 µg/mL	95
FIGURA 17:	Porcentagem de inibição de crescimento de hifas de <i>Rhizopus oryzae</i> (LIF 1832) frente ao antifúngico anfotericina B nas concentrações de 0,5; 0,25; 0,125 e 0,06 µg/mL	96
FIGURA 18:	Porcentagem de inibição de crescimento de hifas de <i>Rhizopus oryzae</i> (LIF 1832) frente ao antifúngico terbinafina nas concentrações de 128; 64 e 32 µg/mL	96
FIGURA 19:	Acompanhamento de crescimento de hifas de <i>Rhizopus oryzae</i> (LIF 1832) frente aos antifúngicos anfotericina B, itraconazol e terbinafina nas concentrações de 0,25; 1,0 e 128 µg/mL, respectivamente	97
FIGURA 20:	Porcentagem de inibição de crescimento de hifas de <i>Rhizopus oryzae</i> (LIF 1832) frente as CIMs de anfotericina B, itraconazol e terbinafina	98
FIGURA 21:	Acompanhamento de crescimento do isolado <i>Rhizopus oryzae</i> (LIF 1832) frente a combinação de itraconazol na concentração de 0,25 µg/mL e terbinafina na concentração de 1 µg/mL.	99

LISTA DE TABELAS

TABELA 1:	Micro-organismos selecionados para o estudo	64
TABELA 2:	Quantificação do DNA extraído dos micro-organismos em estudo	84
TABELA 3:	Similaridade dos resultados entre bancos de dados disponíveis	85
TABELA 4:	Valores da concentração inibitória mínima (CIM) dos antifúngicos micafungina, anfotericina B, 5-fluorocitosina, fluconazol, itraconazol, voriconazol, miconazol e terbinafina frente aos isolados selecionados para o estudo	87
TABELA 5:	Suscetibilidade dos isolados de <i>Mucorales</i> frente a combinação de anfotericina B X itraconazol	89
TABELA 6:	Suscetibilidade dos isolados de <i>Mucorales</i> frente a combinação de anfotericina B X voriconazol	90
TABELA 7:	Suscetibilidade dos isolados de <i>Mucorales</i> frente a combinação de terbinafina x itraconazol	91
TABELA 8:	Suscetibilidade dos isolados de <i>Mucorales</i> frente a combinação de terbinafina x voriconazol	92
TABELA 9:	Suscetibilidade dos isolados de <i>Mucorales</i> frente a combinação de terbinafina x anfotericina B	93
TABELA 10:	Padronização do teste no sistema automatizado Biocell-Tracer para <i>Rhizopus oryzae</i> (LIF 1832)	94

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

µL	Microlitro
°C	Grau Celsius
µg/mL	Micrograma por mililitro
5FC	5-fluorocitosina
A	Antagonismo
AMB	Anfotericina B
ATCC	American Type Culture Collection
BCT®	BioCell-Tracer®
BLAST	Basic Local Alignment Tool
CCD	Charge Coupled Device
CIF	Concentração Inibitória Fracional
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DNA	Ácido desoxirribonucléico
Exp	Exposição ao antifúngico
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
FCZ	Fluconazol
h	Hora
I	Indiferença

IC 100	Leitura de 100% de inibição de crescimento
IC 80	Leitura de 80% de inibição do crescimento
IC50	Leitura de 50% de inibição de crescimento
ISAV	Isavuconazol
ISHAM	Internacional Society for Human and Animal Mycology
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
ITC	Itraconazol
L	Valor do crescimento da hifa
L-AMB	Anfotericina B liposomal
LEM	Laboratório de Epidemiologia Molecular
LIF	Laboratório de Investigação em Fungos
LSU	Subunidade ribossomal grande
M	Molar
MCF	Micafungina
MCZ	Miconazol
MEC	Concentração Efetiva Mínima
MEGA 5.05	Molecular Evolutionary Genetics Analysis versão 5
mg	Miligramas
min	Minutos
NaOH	Hidróxido de sódio
ng/μL	Nanograma por microlitro
nm	Nanômetros

PCR	Polimerase Chain Reaction
PLL	Poli-L-Lisina
POS	Posaconazol
Pré-Exp	Pré-exposição ao antifúngico
rDNA	DNA ribossomal
rRNA	RNA ribossomal/ribossômico
S	Sinergismo
SNC	Sistema Nervoso Central
SSU	Subunidade ribossomal pequena
T	Tipo de Interação
t_0	Tempo inicial
t_1	Tempo final
TERB	Terbinafina
UFC/mL	Unidades formadoras de colônia/mL
VOR	Voriconazol
w/v %	Massa por volume %

	Pág
RESUMO.....	XV
ABSTRACT.....	XIX
LISTA DE FIGURAS.....	XXIII
LISTA DE TABELAS.....	XXVII
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	XXIX
1. INTRODUÇÃO.....	43
1.1. Taxonomia dos Mucorales	43
1.1.1. Nomenclatura da doença Mucormicose.	44
1.2. Mucormicose.	46
1.2.1. Tratamento de Mucormicose.	48
1.2.2. Diagnóstico laboratorial da Mucormicose.	50
1.2.2.1. Identificação morfológica.....	51
1.2.2.2. Identificação molecular.....	52
1.3. Testes de suscetibilidade aos antifúngicos para fungos filamentosos	55
1.3.1. Técnica de microdiluição em caldo.....	55
1.3.2. Testes de suscetibilidade aos antifúngicos <i>in vitro</i> em combinação.....	55
1.3.3. Avaliação da suscetibilidade a antifúngicos utilizando hifas (Sistema automatizado Biocell-Tracer).....	56
2. OBJETIVOS.....	61
3. MATERIAIS E MÉTODOS	63
3.1. Local de trabalho.....	63

3.2. Micro-organismos selecionados para o estudo	63
3.2.1. Reativação dos micro-organismos.....	64
3.3. Identificação morfológica.....	64
3.4. Identificação molecular.....	64
3.4.1. Extração do DNA.....	65
3.4.2. Amplificação pela PCR utilizando Taq DNA Polimerase	66
3.4.3. Amplificação pela PCR utilizando DNA Polimerase <i>MightyAmp</i>	66
3.4.4. Reação de sequenciamento.	67
3.4.5. Análise dos dados: alinhamento e construção da árvore filogenética	68
3.5. Avaliação da suscetibilidade aos antifúngicos <i>isolados in vitro</i> pelo método de microdiluição em caldo.	68
3.5.1. Preparação do inóculo.....	68
3.5.2. Preparação do meio de cultura.....	69
3.5.3. Preparação dos antifúngicos.	69
3.5.4. Preparação da placa do teste de suscetibilidade aos antifúngicos isolados <i>in vitro</i>	70
3.5.5. Controle de qualidade.....	71
3.5.6. Leitura da concentração inibitória mínima (CIM).	71
3.6. Avaliação da suscetibilidade <i>in vitro</i> aos antifúngicos em combinação	73
3.6.1. Preparo do inóculo.....	73
3.6.2. Meio de cultura.	73
3.6.3. Preparação dos antifúngicos	73
3.6.4. Preparação da placa de combinação de antifúngicos.	74

3.6.5. Leitura do teste de combinação de antifúngicos e determinação da Concentração Inibitória Fracional (CIF).....	75
3.7. Avaliação da suscetibilidade a antifúngicos pela técnica de avaliação dinâmica de crescimento através do sistema automatizado Biocell-Tracer	76
3.7.1. Micro-organismo avaliado.....	76
3.7.2. Antifúngicos avaliados	76
3.7.3. Placas de cultura	76
3.7.4. Preparação do inóculo e monitoramento do crescimento.....	77
3.7.5. Avaliação da suscetibilidade aos antifúngicos <i>in vitro</i> pelo método de avaliação dinâmica de crescimento	77
3.7.6. Análise dos dados obtidos	79
4. RESULTADOS.....	81
4.1. Identificação dos isolados de <i>Mucorales</i>	81
4.1.1. Identificação morfológica	81
4.1.2. Identificação molecular	84
4.1.2.1. Extração do DNA.	84
4.1.2.2. Amplificação pela PCR.....	84
4.1.3. Identificação molecular e construção da árvore filogenética	85
4.2. Avaliação da suscetibilidade aos antifúngicos isolados <i>in vitro</i> pelo método de microdiluição em caldo (CLSI, M38-A2)	86
4.3. Avaliação da suscetibilidade <i>in vitro</i> aos antifúngicos em combinação.....	88
4.4. Avaliação da suscetibilidade a antifúngicos pela técnica de avaliação dinâmica de crescimento através do sistema automatizado Biocell - Tracer®.....	93

5. DISCUSSÃO	101
5.1. Identificação dos isolados de <i>Mucorales</i>	101
5.2. Testes de suscetibilidade	105
5.2.1. Avaliação da suscetibilidade aos antifúngicos isolados <i>in vitro</i> pelo método de microdiluição em caldo (CLSI, M38-A2).....	105
5.2.2. Avaliação da suscetibilidade <i>in vitro</i> aos antifúngicos em combinação	108
5.2.3. Avaliação da suscetibilidade a antifúngicos pela técnica de avaliação dinâmica de crescimento através do sistema automatizado Biocell - Tracer®	112
6. CONCLUSÕES	117
7. REFERÊNCIAS.....	119
8. ANEXOS.....	129

1. INTRODUÇÃO

1.1. Taxonomia dos *Mucorales*

A taxonomia dos agentes causais de mucormicose passou por algumas alterações nas últimas décadas com os avanços de técnicas de biologia molecular e estudos taxonômicos. Antes do estabelecimento do reino *Fungi* em 1969 por Whittaker, os agentes causais de mucormicose, entomofotoromicose e outros fungos que produziam hifas cenocíticas (asseptadas) e esporos sexuais chamados “zigósporos” eram classificados na classe dos Phycomycetes (ficomicetos). Baseando-se na similaridade morfológica das estruturas sexuais reprodutivas, três classes eram reconhecidas: Phycomycetes, Ascomycetes e Basidiomycetes (1).

Com o conhecimento sobre ciclo de vida, modos nutricionais, ultraestrutura e com base nas características evolucionárias mais próximas, os taxonomistas agruparam os fungos em seu próprio Reino (*Reino Fungi*) e como resultado das mudanças significativas na classificação, a classe dos ficomicetos foi abolida, sendo os membros dos ficomicetos reclassificados nas seguintes classes: Zygomycetes, Chytridiomycetes, Hypochytridiomycetes, Trichomycetes e Oomycetes. Posteriormente uma nova classificação aceita até a última década delimitou o reino dos fungos nos seguintes filos: Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota e Basidiomycota, sendo o filo Zygomycota constituído por *Mucorales* e Entomophthorales (2,3).

Nos últimos 15 anos, na tentativa de compreender as relações evolutivas, os taxonomistas começaram a aplicar técnicas moleculares para elucidar as linhagens fúngicas e como resultado a classificação filogenética de cada filo vem sendo revista. A primeira mudança taxonômica no filo Zygomycota foi baseada na filogenia molecular realizada em 2001 com a construção de uma árvore filogenética reclassificando o filo Zygomycota como filo Glomeromycota (4).

Em 2007, o filo Zygomycota sofreu mais mudanças taxonômicas, quando taxonomistas internacionais publicaram uma nova classificação filogenética do Reino *Fungi*, propondo realmente a eliminação do filo Zygomycota substituindo por Glomeromycota com os seguintes subfilos: Mucoromycotina, Entomophthoromycotina, Kickxellomycotina e Zoopagomycotina, já que a maioria dos estudos anteriores com a linhagem de *Mucorales* não tinha sido descrito validamente, sendo agora os *Mucorales* pertencentes ao filo Mucoromycotina (5).

1.1.1. Nomenclatura da doença Mucormicose

O nome correto da doença é ainda questionado na literatura, uma vez que novas classificações dos agentes causais foram propostas com base nas revisões taxonômicas. O primeiro caso documentado de doença causada por membros de *Mucorales* foi publicado em 1885 pelo patologista alemão Paltauf, o qual correspondia a uma infecção sistêmica com envolvimento gástrico e rinocerebral, que Paltauf descreveu como “Micose Mucorina”. No entanto, embora não conclusiva, a morfologia do agente etiológico apresentou-se mais semelhante à espécie de *Rhizopus* do que a espécie de *Mucor*. Posteriormente, o termo “Mucormicose” foi utilizado pelo patologista americano R.D. Baker para definir uma micose causada por certos membros dos *Mucorales* de acordo com Baker *apud* (1).

Quando vários membros de ficomicetos foram relatados como patogênicos para seres humanos, o nome de “Ficomucose” foi proposto para denominar micoses causadas por qualquer uma das várias espécies de ficomicetos. O termo foi útil para micoses em que o agente etiológico não foi cultivado e apenas identificado como uma espécie desconhecida de Phycomycetes em seções histopatológicas. “Ficomucose” tornou-se amplamente aceito como um nome conveniente de doença, independentemente da sua diversidade no curso clínico e etiologia (6).

No entanto, Clark (7), propôs o uso do termo “Mucormicose” para as doenças causadas por espécies de *Mucorales* para distinguir da “ficomicose subcutânea” causada por fungos pertencentes aos Entomophthorales, propondo também o termo “Entomoftoromicose” para ficomicose subcutânea.

Como o reino *Fungi* foi estabelecido e Phycomycetes foram reclassificados em Zygomycetes e outras séries de novas classes, o nome da doença “ficomicose” tornou-se obsoleto. Para concordar com as mudanças taxonômicas, Ajello (8), propôs substituir o nome por “zigomicose”. A doença foi definida como qualquer micose causada por espécies de duas ordens: *Mucorales* (*Actinomucor*, *Apophysomyces*, *Cokeromyces*, *Mortierella*, *Rhizopus*, *Rhizomucor*, *Mucor*, *Absidia*, *Cunninghamella*, *Syncephalastrum* e *Saksenaea*) e Entomophthorales (*Basidiobolus* e *Conidiobolus*). *Absidia corymbifera*, a principal espécie patogênica do gênero *Absidia*, foi recentemente transferida para o gênero *Mycoclados* como *Mycoclados corymbiferus* e, posteriormente reclassificada como *Lichtheimia corymbifera* (9).

No entanto, verifica-se que o termo “zigomicose”, tem sido cada vez mais usado como sinônimo de mucormicose ignorando a definição original por dois motivos: (a) mucormicose leva a crer que a doença é causada por *Mucor* spp., porém não é a causa mais comum da doença, e (b) algumas infecções causadas pelas espécies de Entomophthorales, embora raras, não são clinicamente distinguíveis de mucormicose clássica (1). Contrariando tal nomenclatura, “mucormicose” foi definida como doença causada por qualquer membro de *Mucorales* e não por organismos do gênero *Mucor* conforme explica Baker *apud* (1).

Alguns pesquisadores têm sugerido que o termo “mucormicose” seja denominado de “Mucoralomycosis”, para denotar que o nome representa a ordem *Mucorales* e não o gênero *Mucor*. A ordem *Mucorales* já está no subfilo Mucoromycotina de acordo com a nova classificação taxonômica. Assim questiona-se o fato do termo “mucoralomycosis” ser alterado novamente para “Mucoromycosis” uma vez que este considera o novo subfilo. Independentemente

da classificação de “Mucorales” ou “Zygomycota”, ressalta-se que as primeiras cinco letras do nome da doença mucormicose irão suportar as futuras revisões taxonômicas (1).

1.2. Mucormicose

Mucormicose é um termo usado para definir uma infecção potencialmente fatal causada por fungos filamentosos pertencentes ao Filo Glomeromycota/Subfilo Mucoromycotina, anteriormente classificados como zigomicetos, ordem *Mucorales*, sendo espécies de *Rhizopus*, a causa mais comum de infecção (1).

Os agentes da mucormicose são agentes causais de infecções oportunistas que afetam, quase uniformemente, hospedeiros imunocomprometidos. Pacientes com cetoacidose diabética são particularmente susceptíveis a mucormicose. Pacientes imunossuprimidos por quimioterapia citotóxica ou terapia por corticosteróides também são suscetíveis a mucormicose, e também são significativas causas de risco de vida em pacientes com infecções angioinvasivas com uma ampla faixa de condições imunossupressoras. Um aumento significativo na incidência de mucormicose tem ocorrido nas últimas duas décadas e verifica-se que mais estudos são necessários na tentativa de contribuir para o direcionamento do tratamento adequado, uma vez que algumas espécies de *Mucorales* apresentam perfis diferentes de suscetibilidade. Dada a crescente prevalência de diabetes, câncer, transplante de órgãos e envelhecimento da população dos Estados Unidos, o aumento da incidência de mucormicose não tem previsão de diminuição para um futuro próximo (10).

É uma infecção rara e altamente invasiva. O comprometimento em rins primitivos ou transplantados é raro e geralmente ocorre após infecção disseminada. Cetoacidose diabética, imunossupressão por quimioterapia citotóxica ou terapia por corticosteróide são fatores predisponentes. Quase todo paciente tem fatores predisponentes, sendo mais frequentes a infecção pelo vírus

da imunodeficiência adquirida humana, terapêutica com corticóides, diabetes *mellitus*, uso de antifúngicos intravenosos, etilismo e traumatismo. Também tem sido descrita em pacientes leucopênicos com doenças linfoproliferativas e após transplante de medula óssea, principalmente nas formas com comprometimento pulmonar ou forma disseminada. É encontrada em 0,5% a 1 % dos receptores de transplantes (10).

A apresentação mais frequente é na forma de doença rinoencefálica fulminante ou pneumonia necrozante com hemoptise maciça. Nas formas mais raras, como no comprometimento gastrointestinal, as manifestações variam de úlcera péptica colonizada pelo fungo até a doença infiltrativa com invasão vascular, causando trombose, infarto e colite isquêmica (11).

Considerada uma infecção incomum, mucormicose vem emergindo como o segundo modelo mais comum de infecção oportunista invasiva, após aspergilose, em pacientes com neoplasias hematológicas e receptores de transplantes apresentando um mau prognóstico nesses pacientes, com taxas de mortalidade de 90% na infecção disseminada. Espécies de *Rhizopus* causam a maioria das infecções por *Mucorales*, considerando que *Mucor*, *Rhizomucor*, e *Cunninghamella bertholletiae* são patógenos menos encontrados, sendo a espécie de *C. bertholletiae* considerada a mais patogênica. Ao contrário de outros fungos de importância médica, a epidemiologia e imunopatogenia da infecção são pouco compreendidas (12).

Antes de 1960 era quase sempre fatal, mas, após a descoberta da anfotericina B e sua ampla utilização associada ao debridamento cirúrgico, a taxa de mortalidade foi reduzida a 40%. Esta evolução potencialmente fatal se deve a uma característica específica destes fungos que é o tropismo vascular, inicialmente invadindo artérias, onde suas hifas crescem rapidamente ao longo das paredes e invadem o lúmen, causando trombose e lesões isquêmicas. Posteriormente invadem veias e vasos linfáticos. A ocorrência de mucortrombose em artérias responsáveis pela irrigação do Sistema Nervoso Central (SNC), com desenvolvimento de sinais neurológicos detectáveis no exame físico, ensombrece

o prognóstico, com rápida deterioração e morte do paciente. Frequentemente o primeiro sinal de mucormicose é uma rinorréia, geralmente unilateral, abundante, sanguinolenta e com grumos (13).

Defeitos quantitativos e funcionais em células imunes efectoras, associados com diabetes *mellitus* mal controlada e administração de corticosteróide ou outros tratamentos imunossupressores são os principais fatores predisponentes para mucormicose. Além disso, o metabolismo do ferro desempenha um papel central na patologia de mucormicose e pacientes com níveis séricos elevados de ferro tem um risco aumentado para mucormicose. O tratamento com deferoxamina, um agente quelante de ferro que age como um sideróforo e oferece suprimento de ferro para os *Mucorales*, promove o desenvolvimento de graves infecções disseminadas em modelos animais e humanos (12).

Do ponto de vista clínico, o termo mucormicose descreve infecções caracterizadas por uma ou mais manifestações de uma tríade de doenças: rinocerebral, pulmonar e doença disseminada. Características clínicas clássicas são edemas faciais, com comprometimento ocular que frequentemente evolui para doença cerebral e qualquer uma pode ser complicada por infecção pulmonar ou disseminada. Lesões necróticas também podem ocorrer. No entanto, a apresentação de mucormicose pulmonar, muitas vezes se assemelha a da aspergilose invasiva, em pacientes imunossuprimidos como os receptores de transplantes de células-tronco hematopoiéticas. Comparação de características da imagem tomográfica de mucormicose e aspergilose invasiva mostrou que múltiplos nódulos do pulmão e derrame pleural são preditores independentes de mucormicose (14).

1.2.1. Tratamento de Mucormicose

Mucorales são conhecidos por serem resistentes a voriconazol (VOR) e equinocandinas *in vitro* e *in vivo*. Estudo publicado por Perkhofer *et al.*, (15) mostrou que isavuconazol (ISAV) apresentou efeitos antifúngicos limitados contra

Mucorales. Em comparação com itraconazol, ravuconazol e voriconazol, isavuconazol demonstrou atividade parcial contra *Mucorales* apresentando Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 2 µg/mL para 11 % dos isolados de *Rhizomucor* spp. e 28% de *Rhizopus* spp. Dados semelhantes foram observados por outros autores utilizando os critérios do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, M38-A2, 2008).

Os antifúngicos anfotericina B (AMB), anfotericina B lipossomal (L-AMB) e posaconazol (POS) mostraram-se satisfatórios nas atividades *in vitro* contra *Mucorales*. O antifúngico mais ativo foi L-AMB, mas que falhou contra alguns isolados de *Rhizopus* spp. e *Cunninghamella* spp. que se mostraram suscetíveis ao POS. POS mostrou pouca atividade contra alguns isolados de *Rhizomucor* spp., *Rhizopus* spp. e *Mucor* spp. demonstrando boa atividade contra *Absidia* spp. O significado desses achados *in vitro* não é totalmente claro, uma vez que ainda não foram definidos os pontos de corte para o teste e também são relatados estudos anteriores que demonstram que a resistência micológica *in vitro* nem sempre significa fracasso terapêutico. Nenhum dos outros azóis avaliados ou caspofungina mostraram atividade contra os *Mucorales* (16).

O tratamento da mucormicose baseia-se em cinco princípios: controle das condições mórbidas subjacentes, AMB endovenosa, desbridamento cirúrgico, oxigenioterapia hiperbárica e utilização de fatores estimuladores de colônias granulocíticas. O controle das condições mórbidas subjacentes é importante, na medida em que a correção da cetoacidose e o restabelecimento da condição imunológica do paciente são fatores fundamentais na inibição da proliferação do fungo e da progressão da doença (13).

AMB continua a ser o único agente antifúngico mais indicado para o tratamento da mucormicose invasiva. Uma vez que o fungo é relativamente resistente à AMB, altas doses são necessárias, o que frequentemente resulta em nefrotoxicidade (10).

Alguns trabalhos relatam a utilização *in vivo* da combinação de antifúngicos com sucesso no tratamento de mucormicose, como por exemplo, as combinações

de AMB e terbinafina (TERB); AMB e itraconazol (ITC); AMB e voriconazol (VOR) ; TERB e ITC; TERB e VOR (17-19).

Recentemente a terapia empregando a combinação de poliênicos lipídicos e equinocandinas tem se mostrado a mais promissora. A combinação de L-AMB com micafungina (MCF) ou anidulofungina tem apresentado bons resultados. Outras opções incluem a combinação de poliênicos lipídicos com deferasirox ou POS. Combinações de TERB com POS e de caspofungina com anfotericina B, posaconazol ou itraconazol também têm sido estudadas (10, 20-23).

Equinocandinas têm atividade mínima frente a *Mucorales* em testes *in vitro*, no entanto, o teste de sensibilidade padrão pode não refletir a verdadeira atividade de equinocandinas quando combinada tanto que Ogawa (24) relata caso de sucesso terapêutico no tratamento de mucormicose rino-orbital causada por *Rhizopus oryzae* em paciente diabético em diálise com a combinação de L-AMB e MCF.

1.2.2. Diagnóstico laboratorial da Mucormicose

O diagnóstico de uma infecção fúngica tem como base a combinação de dados clínicos e laboratoriais e inclui a demonstração do fungo no material examinado pela microscopia e cultura; detecção de resposta imunológica à presença do agressor e detecção de antígenos e metabólitos de fungos nos líquidos corpóreos ou tecidos (25).

A identificação correta dos *Mucorales* é um dos principais questionamentos levantados na literatura uma vez que o diagnóstico não é simples, sendo necessária a detecção em fragmentos de biópsias de tecidos infectados e isolamento do micro-organismo para posterior identificação por métodos morfológicos e moleculares. O diagnóstico pode ser confirmado por biópsia de tecidos afetados, quando acessíveis, onde a presença de hifas largas não-septadas é demonstrada. Culturas podem ser negativas. Na maioria dos laboratórios a identificação de gênero e espécies é realizada a partir de cultura de

organismo e documentação das características morfológicas próprias sem confirmação por métodos moleculares. Lamentavelmente, o diagnóstico é muitas vezes realizado apenas na autópsia e o atraso no diagnóstico pode levar à progressão da infecção, às vezes com necessidade de desbridamentos extensos e repetidos, e cirurgias mutiladoras (14).

1.2.2.1. Identificação morfológica

A metodologia clássica de identificação utiliza a combinação de características macroscópicas e micromorfológicas com realização do exame macroscópico e microscópico das culturas, além de microcultivo em lâmina (26,27).

O exame microscópico de amostras clínicas, utilizando estudos histopatológicos ou exames diretos permite a detecção rápida, no entanto, estes métodos permitem apenas uma identificação preliminar. Identificação definitiva exige o crescimento do organismo em cultura, sendo ainda considerado o método padrão ouro para o diagnóstico laboratorial de infecções fúngicas atualmente. Embora a cultura possa demonstrar uma excelente sensibilidade e especificidade, o crescimento do agente etiológico pode levar dias ou semanas, retardando o diagnóstico e o início do tratamento apropriado. Além disso, a recuperação e a identificação precisa de fungos no laboratório clínico requer profissional experiente (28).

A histopatologia e cultura de amostras de tecido são comumente empregados para determinar o diagnóstico laboratorial de Mucormicose, mas estes métodos têm limitações significativas. O exame histopatológico do tecido infectado é subjetivo, falta sensibilidade e a identificação dos isolados em cultura é demorada. Em adição, não é incomum resultarem culturas fúngicas negativas, mesmo quando os resultados histopatológicos sugerem uma infecção por *Mucorales*, pois o processamento de amostras de tecido antes da cultura podem romper as hifas do micro-organismo, evitando assim seu crescimento. Apesar da

necessidade de métodos rápidos e sensíveis para detectar *Mucorales* em espécimes clínicos, o desenvolvimento de métodos moleculares para este grupo de fungos tem sido limitado (28).

Muitos laboratórios não identificam além do nível de gênero e a designação das espécies é frequentemente omitida na literatura médica. Alguns laboratórios consideram esta tarefa difícil principalmente quando as observações não correspondem com as descrições ou ilustrações disponíveis na literatura (29).

1.2.2.2. Identificação molecular

A introdução de métodos moleculares para o laboratório de microbiologia clínica tem levado a avanços significativos no diagnóstico das doenças infecciosas com as recentes aplicações disponíveis para a detecção e identificação de agentes fúngicos patogênicos, especialmente para aqueles micro-organismos que não são facilmente identificados por técnicas convencionais (30).

Nos últimos anos, tem sido demonstrado que a análise de sequências de ácido desoxirribonucleico (DNA), particularmente de RNA ribossômico (rRNA) fúngico, é muito útil para a identificação de *Mucorales* (31).

As espécies de *Mucorales* possuem diferenças importantes em suas respostas aos antifúngicos e sua correta identificação em infecções humanas é de grande importância. No entanto, o agente etiológico de mucormicose, em numerosos casos clínicos, não é identificado quanto à espécie, sendo comumente nomeado apenas como *Mucor* spp. (32).

A identificação molecular com a utilização de *Polimerase Chain Reaction* (PCR) ou de *primers* específicos não é facilmente adaptável à rotina nos laboratórios apenas com fins diagnósticos (33).

Na última década, a amplificação e sequenciamento de ácidos nucleicos de patógenos fúngicos evoluíram de apenas um aplicativo de pesquisa para tornarem-se valiosas ferramentas de diagnóstico clínico. As técnicas tradicionais de sequenciamento de DNA têm sido analisadas, em detalhe, em várias

publicações (28). Para identificar o micro-organismo por sequenciamento de DNA, o gene alvo deve conter as regiões altamente conservadas que podem servir como locais de ligação de iniciadores, e estas regiões conservadas devem conter regiões com variabilidade de sequência suficiente para permitir a discriminação ao nível de gêneros e espécies. Além disso, o gene alvo deve estar presente em um elevado número de cópias sempre que possível para aumentar a sensibilidade da amplificação por PCR antes da análise da sequência (28).

Para fins de diagnóstico a estrutura geral da região gênica do rRNA fúngico consiste de quatro genes ribossomais (subunidade pequena 18S, subunidade 5.8S, subunidade grande 25-28S e subunidade 5S) separados por regiões *Internal Transcribed Spacer* (ITS). Via de regra, as regiões comumente utilizadas são as regiões ITS por meio do rRNA. Os alvos mais comumente empregados nos métodos de sequenciamento são as regiões ITS1 e ITS2, entre as subunidades ribossomais 18S e 28S e a região D1-D2 (aproximadamente 600 pares de bases), constituinte da subunidade ribossomal 25-28S (34) (Figura 1).

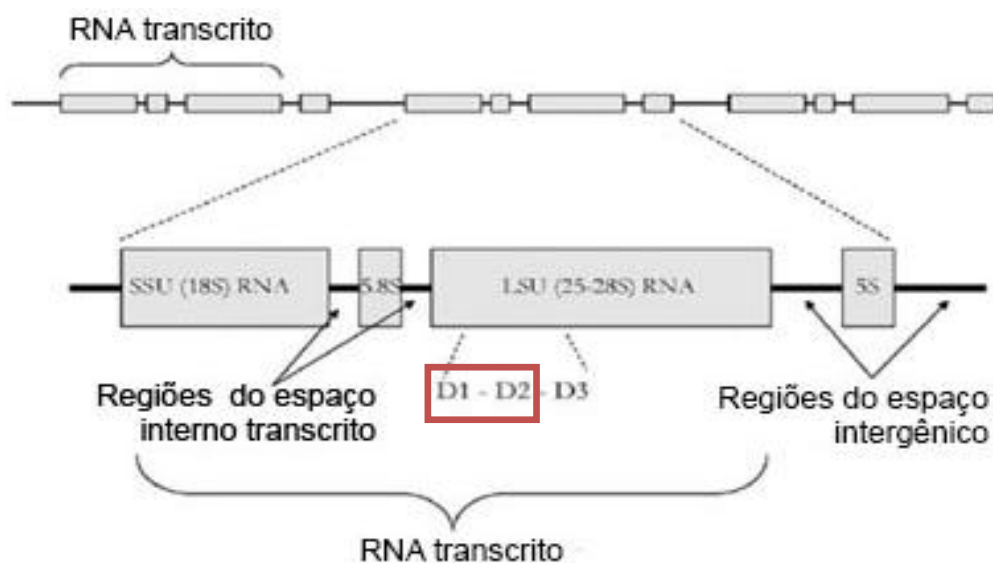


Figura 1. Regiões do rRNA: subunidade ribossomal pequena (SSU); subunidade ribossomal grande (LSU) (28).

Em alguns casos, estas regiões podem não oferecer variabilidade suficiente entre as espécies ou gêneros de fungos, e alvos alternativos têm sido utilizados. Mudanças na taxonomia dos fungos, limitações das sequências fúngicas atualmente disponíveis e falta de um consenso sobre a porcentagem de identidade necessária para identificar as amostras ao nível de gênero ou espécie tornam a identificação do fungo por meio de análise de sequência um pouco menos precisa do que a identificação de bactérias usando esta técnica (34).

Estudo com 190 isolados clínicos de *Mucorales* realizado no laboratório de ensaios fúngicos na Universidade do Texas correlacionando a identificação morfológica e a identificação molecular após o seqüenciamento do ITS do rRNA, utilizando os primers ITS5 e ITS4, evidenciou que o agente mais prevalente de mucormicose foi *Rhizopus oryzae* (44,7%) seguido por *Rhizopus microspurus* (22,1%), *Mucor circinelloides* (9,5%), *Mycoclados corymbifera* (5,3%), *Rhizomucor pusillus* (3,7%), *Cunninghamella bertholletiae* (3,2%), *Mucor indicus* (2,6%), *Cunninghamella echinulata* (1%), e *Apophysomyces elegans* (0,5%), não sendo possível a identificação no nível de espécie de 7,4% dos isolados. A correlação entre morfologia e métodos moleculares em nível de espécie foi de 92,6% e em nível de gênero foi de 100%. A análise filogenética deste estudo foi realizada através do programa MEGA 4.0 e a identificação final usando o Basic Local Alignment Tool (BLAST). Devido ao elevado grau de variabilidade nas sequências das regiões ITS, não foi possível o alinhamento de todos os genes com 100 % de confiabilidade, sendo utilizado nesta análise apenas as sequências do gene de rRNA 5.8S. Na árvore filogenética foram observadas seis clades principais representando os seguintes gêneros: *Mucor*, *Rhizopus*, *Mycoclados*, *Apophysomyces*, *Rhizomucor* e *Cunninghamella* (31).

Em seu trabalho Voigt *et al*, (35) construiu uma base de dados moleculares para 42 isolados de *Mucorales* clinicamente importantes a partir de sequências de nucleotídeos da subunidade pequena 18S do rRNA e regiões D1 e D2 da subunidade grande 28S do rRNA. Todos os pares de *primers* utilizados

demonstraram potencial para identificação rápida e precisa para espécies causadoras de mucormicoses.

A introdução de métodos moleculares no laboratório tem conduzido a avanços significativos na detecção e identificação do agente etiológico, pois reduz o tempo de identificação, aumenta a sensibilidade e contribui para o tratamento clínico adequado uma vez que, dependendo da espécie, os *Mucorales* respondem de forma diferente ao tratamento. No entanto, mais estudos são necessários na tentativa de validar e padronizar estes métodos para implantação na rotina de um laboratório para diagnóstico de infecções fúngicas (16).

1.3. Testes de suscetibilidade aos antifúngicos para fungos filamentosos

1.3.1. Técnica de microdiluição em caldo

Recentemente, um método para o teste de suscetibilidade a antifúngicos pelo método de macrodiluição e microdiluição em caldo, específico para formas de conídios de alguns fungos filamentosos, foi estabelecido pelo CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute M38-A2, 2008). O teste de suscetibilidade foi padronizado para as seguintes espécies de fungos filamentosos: *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp., *Pseudallescheria boydii* e *Sporothrix schenckii* em fase filamentosa (36).

1.3.2. Testes de suscetibilidade aos antifúngicos *in vitro* em combinação

A associação de antifúngicos tem por objetivo a redução de toxicidade de dosagens individuais e aumentar a eficácia no tratamento dependendo do tipo de interação resultante entre os antifúngicos avaliados, podendo ser sinergismo (interação positiva), antagonismo (interação negativa) e indiferença (a combinação

produz o mesmo resultado que o antifúngico mais ativo avaliado produz individualmente) (17).

O teste de suscetibilidade aos antifúngicos *in vitro* em combinação é realizado através da metodologia do "tabuleiro de xadrez" (16) para determinação da Concentração Inibitória Fracional (CIF) que define o tipo de interação entre os antifúngicos em combinação da seguinte forma: sinergismo (S) se $CIF \leq 0,5$; indiferença (I) se $0,5 < CIF \leq 4$ e antagonismo (A) $CIF > 4$ (17,37-39).

1.3.3. Avaliação da suscetibilidade a antifúngicos utilizando hifas (Sistema automatizado Biocell-Tracer®)

Dentro das controvérsias em torno da avaliação de suscetibilidade a antifúngicos, para fungos filamentosos, há questionamentos sobre se a forma conidial seria a mais adequada para esta avaliação. Os conídios são formas de resistência dos fungos filamentosos, encontrados no ar em tamanhos pequenos e em altas concentrações, fáceis de serem inalados e de germinar. 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 (40).

São poucos os relatos que correlacionam os dados da CIM e a evolução clínica dos pacientes com infecção/colonização fúngica. 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 (40-47).

O sistema automatizado "Biocell-Tracer®" (BCT) permite verificar a ação do agente antifúngico diretamente sobre as hifas de *Mucorales* em tempo real, possibilitando observar o que realmente acontece no organismo humano, uma vez que a forma de hifas é a forma predominante em tecidos de indivíduos infectados. Este conhecimento é importante, tanto para embasamento da terapêutica empírica

e avaliação de falhas terapêuticas, quanto para testes de novos antifúngicos ou produtos afins.

O método BCT propõe a análise do estágio de emergência da hifa, bem como os estágios subsequentes, para determinação da atividade antifúngica e permite o acompanhamento do crescimento, conjuntamente com registros e gráficos que são automaticamente gerados para melhor avaliação (46-50).

O sistema automatizado “Biocell-Tracer®” (Figuras 2 e 3) é constituído por uma base para as placas, um microscópio (Olympus; IMT2), uma câmara de vídeo CCD (Charge 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 aparelho de vídeo. A imagem da hifa, formada na placa, é visualizada ao microscópio e filmada pela câmara que envia a imagem para o vídeo, onde é possível observar o crescimento da estrutura em detalhes. A resolução da imagem tem alta definição e precisão analítica de $0,01 \mu\text{m}/\text{min}^{-1}$ (45,46).

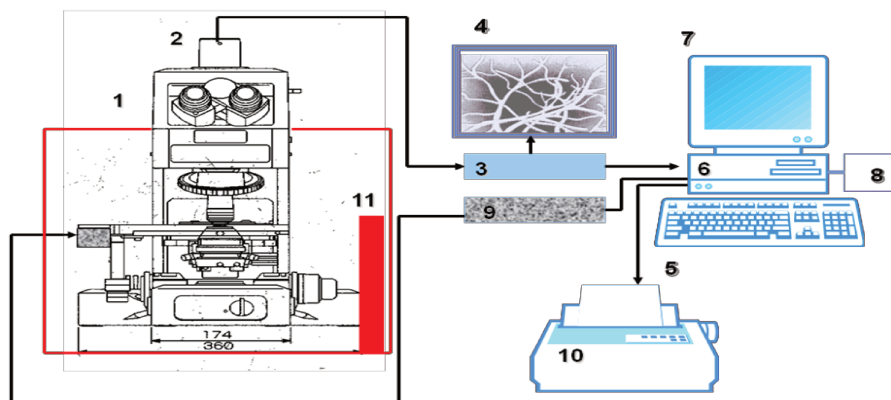


Figura 2. Esquema representativo do sistema Biocell-Tracer®: 1. Microscópio; 2. Câmera CCD; 3. Junção imagem-memória; 4. Monitor de vídeo; 5. Teclado; 6 e 7. Microcomputador e monitor; 8. Disco rígido; 9. Controle automático dos estágios; 10. Impressora; 11. Controle da temperatura; 12. Distribuidor; 13. Microcalibrador.



Figura 3. Fotografia do aparelho BioCell-Tracer®. O equipamento é constituído de um microscópio com base para as placas, uma câmara de vídeo, um televisor com aparelho de vídeo, um digitalizador de imagens e um microcomputador. No detalhe da foto, a imagem da placa que irá ser analisada dentro da câmara do equipamento.

O sistema possui ainda uma câmara de incubação onde a temperatura interna é ajustada de 10 a 50°C. 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 do antifúngico a ser avaliado. As informações obtidas geram gráficos, que podem ser analisados sozinhos ou em conjunto com outros gerados por análises posteriores (45-47). A figura 4 exemplifica a monitorização do crescimento de uma única hifa.

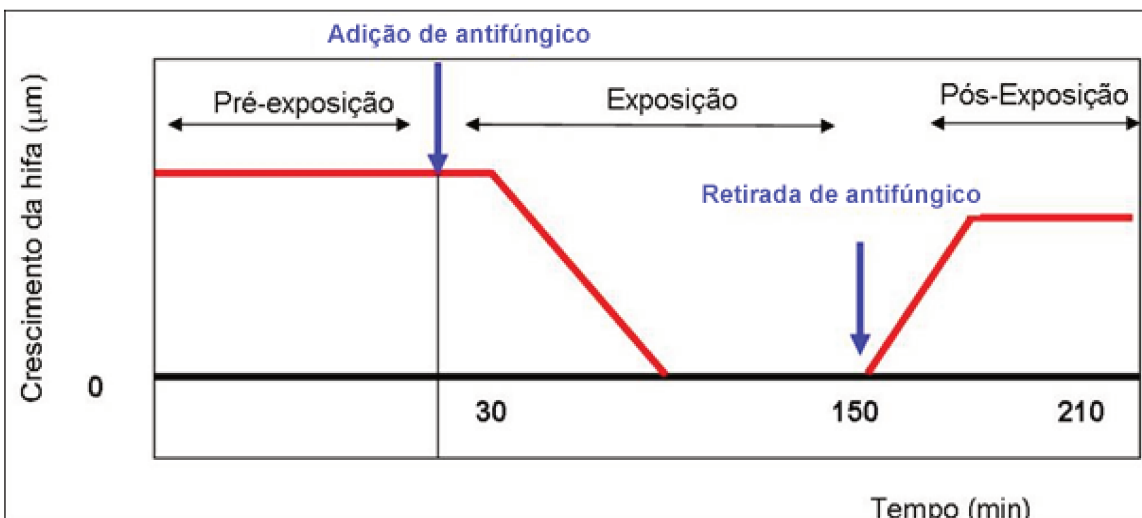


Figura 4. Monitorização do crescimento da hifa: período pré-exposição: crescimento da hifa sem a adição do antifúngico a ser testado. Período de exposição: exposição da hifa ao antifúngico em determinada concentração. Período de pós-exposição: crescimento da hifa após a retirada da concentração do antifúngico a ser avaliada.

O aparelho automaticamente calcula a média de crescimento das hifas seleccionadas para o teste. Ao final, gera o gráfico da média de crescimento das hifas analisadas. O cálculo da taxa de crescimento da hifa pelo modelo BCT[®] é automático e consiste na subtração dos tempos final (t_1) menos inicial (t_0), a cada 3 min. O intervalo de medição depende do crescimento do fungo filamentoso em estudo [$L1 = (t_1 - t_0)$, $L2 = (t_2 - t_1)$,...] (Figura 5).

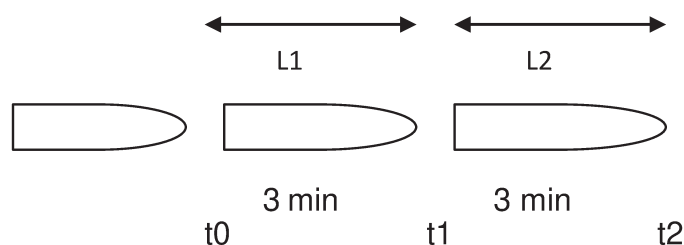


Figura 5. Elementos utilizados para o cálculo do crescimento de hifas L: valor do crescimento da hifa a cada 3 minutos; t_0 : tempo inicial dos 3 minutos, t_1 : tempo final dos 3 minutos.

A vantagem de utilizar o sistema BCT está na rapidez das análises e o sistema tem uma aplicação fundamental em pesquisa no que se refere a

determinação da CIM, a determinação da atividade fungicida, em que o valor de crescimento da hifa durante o período de exposição ao antifúngico subtraído do valor de crescimento da hifa durante o período após a retirada do antifúngico é igual a zero ($\text{Pós-Expo} = 0$) e a determinação da atividade fungistática, em que o valor de crescimento da hifa durante o período de exposição ao antifúngico subtraído do valor de crescimento da hifa durante o período após a retirada do antifúngico é maior que zero ($\text{Pós-Expo} > 0$). Uma desvantagem do sistema é que somente um isolado pode ser testado por vez (44).

Existem poucos artigos na literatura sobre a avaliação dinâmica do crescimento de fungos e sua taxa de inibição de crescimento em contato com agentes antifúngicos. Alguns estudos publicados utilizaram a metodologia BCT para alguns isolados de *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Candida* sp., fungos demáceos e dermatófitos, mostrando que a forma de hifas pode responder a concentrações mais baixas de agentes antifúngicos do que os conídios, podendo ter uma melhor relação com o efeito do tratamento antifúngico nas infecções (47-53).

Todavia até o momento não há relatos na literatura sobre a padronização do monitoramento de crescimento pelo sistema BCT para isolados de *Mucorales*, sendo importante a realização da avaliação dinâmica de crescimento principalmente para espécie de *Rhizopus oryzae* devido a alta prevalência do gênero *Rhizopus* em casos de Mucormicose, sendo capaz de contribuir para a indicação do tratamento médico adequado.

2. OBJETIVOS

- Identificação dos isolados de *Mucorales* selecionados para o estudo por metodologia clássica e identificação molecular;
- Padronização do inóculo e tempo de leitura para realização da suscetibilidade pela técnica de microdiluição em caldo frente aos antifúngicos micafungina; anfotericina B; 5-fluorocitosina; fluconazol; itraconazol; voriconazol; miconazol e terbinafina, frente a outros gêneros de *Mucorales* que não *Rhizopus* spp. ;
- Avaliação da Concentração Inibitória Fracional para determinação do tipo de interação que ocorre entre as combinações dos antifúngicos anfotericina B x itraconazol; anfotericina B x voriconazol; terbinafina x itraconazol; terbinafina x voriconazol e terbinafina x anfotericina B;
- Padronização da metodologia de avaliação dinâmica de crescimento de hifas para o gênero *Rhizopus* , visto que até o momento não existe nenhum trabalho na literatura e existe uma alta prevalência de Mucormicose por este agente etiológico.
- Avaliação dinâmica de crescimento utilizando o isolado de *Rhizopus oryzae* (LIF 1832), para possível estabelecimento de correlação clínico-laboratorial uma vez que este micro-organismo foi isolado recentemente de uma paciente com mucormicose.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Local de trabalho

O trabalho experimental foi desenvolvido no Laboratório de Investigação em Fungos da Faculdade de Ciências Médicas/Universidade Estadual de Campinas (LIF - FCM–UNICAMP) e no Laboratório de Epidemiologia Molecular e Doenças infecciosas da Disciplina de Moléstias Infecciosas da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp (LEM-FCM-UNICAMP), com assessoria do Medical Mycology Research Center – Chiba – Japão, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas / Universidade Estadual de Campinas com o número de protocolo 936/2011.

3.2. Micro-organismos selecionados para o estudo

Foram selecionados 10 isolados clínicos de *Mucorales* (Tabela 1) identificados morfollogicamente, de acordo com a literatura disponível, como: *Cunninghamella bertholletiae* (LIF 299, 300, 301), *Rhizopus* sp. (LIF 1046, 1143, 1455, 1820), *Syncephalastrum* sp. (LIF 1834), *Absidia* (*Lichtheimia*) sp. (LIF 1237) e *Rhizomucor* sp. (LIF 1832) obtidos a partir dos exames de rotina encaminhados para o Setor de Micologia do Laboratório de Microbiologia da Divisão de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas da UNICAMP. Todos os isolados foram mantidos utilizando-se o método de Castellani, sendo, portanto, conservados à temperatura ambiente em frascos de vidro estéreis contendo água destilada (54).

Tabela 1. Micro-organismos selecionados para o estudo.

LIF no	Isolado *	Dados do paciente			
		Nº lab	Data	Clínica	Espécime clínico
299	<i>C.bertholletiae</i>	3855/02	09/09/2006	Medicina Interna	escarro
300	<i>C.bertholletiae</i>	3908/02	11/09/2006	Medicina Interna	escarro
301	<i>C.bertholletiae</i>	4039/02	18/09/2006	Medicina Interna	lavado broncoalveolar
1046	<i>Rhizopus</i> sp.	2185/07	15/06/2007	Medicina Interna	lavado broncoalveolar
1143	<i>Rhizopus</i> sp.	4108/07	08/11/2007	Pneumologia	escarro
1237	<i>Absidia (Lichtheimia)</i> sp.	1364/08	06/04/2008	Dermatologia	unha dedo mão direita
1455	<i>Rhizopus</i> sp.	2534/09	03/07/2010	Pneumologia	escarro
1820	<i>Rhizopus</i> sp.	2583/11	30/06/2011	Otorrinolaringologia	secreção fossas nasais
1832	<i>Rhizomucor</i> sp.	565/11-ob	27/01/2011	Pronto Socorro	abscesso retroorbitário
1834	<i>Syncephalastrum</i> sp.	3325/11	17/08/2011	Oftalmologia	córnea receptora

* Resultado da identificação morfológica realizada a partir dos exames de rotina. Posteriormente estes isolados foram identificados também pela técnica de sequenciamento.

3.2.1. Reativação dos micro-organismos

Os isolados foram repicados em tubos com Ágar Sabouraud Dextrose (Difco, Sparks, Maryland, USA) à temperatura ambiente, com posterior repique em tubos com Ágar Batata Dextrose (Difco, Sparks, Maryland, USA), para avaliação de pureza e estimulação de esporulação.

3.3. Identificação morfológica

A identificação até gênero foi realizada de acordo com metodologia clássica desenvolvida no Setor de Micologia do Laboratório de Microbiologia-DPC- HC- UNICAMP, utilizando a combinação de características macroscópicas e micromorfológicas com realização do exame macroscópico e microscópico das culturas, além de microcultivo em lâmina (26,27).

3.4. Identificação molecular

Inicialmente a identificação molecular realizada pelo sequenciamento dos isolados LIF 1046, 1143, 1237, 1455, 1820, 1832 e 1834 foi realizada através da

amplificação do DNA fúngico diretamente das culturas utilizando tanto os iniciadores universais *forward* ITS1 e *reverse* ITS4 quanto os iniciadores universais *forward* ITS4 e *reverse* ITS5.

A identificação molecular dos micro-organismos em estudo foi também realizada por sequenciamento da região D1/D2 constituinte do DNA 28S e que codifica rRNA utilizando os iniciadores NL1 e NL4, cujo protocolo está descrito a seguir. Na figura 1, a região em destaque representa a região D1/D2 utilizada também para o sequenciamento em nosso estudo.

3.4.1. Extração do DNA

A extração do DNA foi realizada em culturas com 48 h de crescimento em Ágar Batata Dextrose (Difco, Sparks, Maryland, USA). Uma alçada da colônia foi transferida para 200 µL de água destilada e a mistura resultante foi submetida à extração de DNA com o kit *High Pure PCR Template Preparation* (Roche Applied Science, Alemanha), de acordo com as especificações do fabricante. Brevemente, adicionou-se 3 µL de Lyticase 4 mg/mL (Sigma-Aldrich, USA) ao tubo contendo os isolados diluídos e estes foram incubadas a 37° C por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados ao lisado 200 µL de *Binding Buffer* e 40 µL de proteinase K. As amostras foram incubadas a 70°C por 10 min e 100 µL de isopropanol gelado foram adicionados. O volume total foi transferido para uma coluna posicionada em um tubo coletor. Foi realizada a centrifugação a 8.000g por 1min e o conteúdo do tubo coletor foi descartado. Adicionou-se 500 µL de *Inhibitor Removal Buffer* e centrifugou-se a 8.000g por 1 min. Após nova remoção do líquido do tubo coletor, a lavagem foi realizada com 500 µL de *Wash Buffer* e posterior centrifugação a 8.000 g por 1 min. Por fim, 50 µL de *Elution Buffer* pré-aquecido a 70°C foram adicionados à coluna e os tubos foram centrifugados a 8.000g por 1 min para recolhimento da amostra de DNA. O DNA extraído foi quantificado utilizando o espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA). As amostras foram armazenadas a -20°C para posterior utilização na reação de PCR.

Para preparação da reação de amplificação por PCR (reação em cadeia da polimerase) foram avaliados dois procedimentos (itens 3.4.2 e 3.4.3) descritos abaixo.

3.4.2. Amplificação pela PCR utilizando Taq DNA Polimerase

A amplificação do DNA fúngico extraído foi realizada com os iniciadores universais *forward* NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e *reverse* NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'), os quais permitem amplificar a região D1/D2 constituinte do DNA 28S de fungos. A reação de PCR foi realizada em um tubo contendo 12,5 µL de PCR *Master Mix* (Promega, USA), 1,25 µL de cada iniciador, 100 ng/µL de DNA e água milli-Q para um volume final de 25 µL. Cada ciclo de reação de amplificação realizada consistiu na desnaturação inicial a 95°C por 5min, 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 45 s, anelamento a 55°C por 45 s e extensão a 72°C por 1min, além de uma extensão final a 72°C por 2 min. Estas reações de amplificação foram realizadas em termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os produtos da reação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio e as bandas foram visualizadas em iluminação ultravioleta.

3.4.3. Amplificação pela PCR utilizando DNA Polimerase *MigthyAmp*

Além da realização da PCR a partir de DNA extraído de culturas, foi verificada a possibilidade de amplificação do material genético diretamente a partir das culturas fúngicas. Essa abordagem permite maior agilidade na obtenção dos resultados, além de redução nos custos para identificação molecular por sequenciamento. Para tal finalidade, utilizou-se a enzima DNA Polimerase *MigthyAmp* (Takara Bio Inc, Tóquio, Japão), em busca de maior rapidez e eficiência nas reações de ligação para amplificação do material genético (55, 56).

Foram utilizadas culturas fúngicas de 3 a 5 dias de crescimento em ágar batata dextrose (Difco, Sparks, Maryland, USA). Uma alçada de cada colônia foi

transferida para 200 μL de água destilada e 2 μL desta solução foram utilizados na reação de PCR. Os iniciadores universais foram os mesmos utilizados no item anterior. A amplificação pela PCR foi realizada em uma reação contendo 5 μL de *MightyAmp Buffer*, 0,3 μL de cada iniciador NL1 e NL4, 0,2 μL da enzima *MightyAmp*, 2 μL de amostra e água milli-Q para um volume final de 10 μL . Cada ciclo de reação de amplificação realizada consistiu na desnaturação inicial a 98°C por 2 min, 30 ciclos de desnaturação a 98°C por 10 s e 55°C por 15 s, anelamento a 68°C por 45 s e extensão final do fragmento amplificado a 68°C por 5 min. Estas reações de amplificação foram realizadas em termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os produtos da reação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio e visualizados em iluminação ultravioleta.

3.4.4. Reação de sequenciamento

Após a detecção de DNA em gel de agarose, o produto final da PCR foi utilizado para o sequenciamento em sequenciador automático ABI-3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Inicialmente, foi realizada a purificação das amostras pela adição de 2 μL da enzima *Exosap-IT* (USB[®] Corporation, Cleveland, OHIO, EUA) a cada 5 μL de produto de PCR. A mistura foi mantida a 37°C por 15 min, seguida a 80°C para inativar a enzima em termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

Em seguida, as amostras foram submetidas à reação de sequenciamento utilizando o *Big DyeTM Terminator* v.3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Foram preparadas reações contendo 1 μL de *Big Dye Terminator*, 1 μL de tampão, 1 μL do iniciador NL1 ou NL4 1,6 pmol, 2 μL do produto de PCR purificado e água milli-Q para um volume final de 10 μL . A amplificação consistiu na desnaturação a 95°C por 3 min e 35 ciclos de 95°C por 5 s, 55°C por 10 s e 60°C por 4 min em termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

3.4.5. Análise dos dados: alinhamento e construção da árvore filogenética

As sequências de DNA *forward* e *reverse* obtidas para cada amostra foram alinhadas no programa ATSQ (Japan Software Inc., Japão) e a homologia com outras sequências disponíveis foi avaliada nos seguintes bancos de dados: BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>); *Biolomics* (www.cbs.knaw.nl) e *ISHAM* (www.mycology.lab.org). Isolados com homologia acima de 99% foram considerados da mesma espécie; para valores inferiores a 99% foi considerada somente a classificação do gênero.

A análise evolutiva entre os 10 isolados de *Mucorales* em estudo foi realizada pela construção de árvore filogenética. Inicialmente, as sequências foram alinhadas pelo *software* Clustal W (57) e esses dados serviram de entrada para a geração da árvore filogenética pelo *software* MEGA 5.05 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis versão 5/National Institutes of Health, Maryland, USA e Japan Society for the Promotion of Science, Tokyo, Japan) para análises de máxima verossimilhança utilizando 1.000 replicações de inicialização para originar a árvore filogenética de consenso.

3.5. Avaliação da suscetibilidade aos antifúngicos isolados *in vitro* pelo método de microdiluição em caldo

Foi realizada de acordo com o documento M38-A2 estabelecido pelo CLSI (2008) para determinação de CIM (36).

3.5.1. Preparação do inóculo

Após o crescimento fúngico de aproximadamente 3 a 5 dias, a 35° C, em tubos contendo o meio de cultura ágar batata dextrose (Difco, Sparks, Maryland, USA), o inóculo foi preparado adicionando-se 5 mL de salina 0,85%, ou água destilada estéril, ao tubo até encobrir toda a colônia. Os esporos foram suavemente suspensos com

a ajuda de uma alça em anel. Transferiu-se a suspensão para um tubo estéril e aguardou-se por 5 minutos a separação das hifas dos esporos que, por serem mais leves, ficam no sobrenadante. O sobrenadante foi transferido para outro tubo estéril. A partir desta suspensão, foi feita uma diluição de 1/50 em água destilada estéril ou salina 0,85% e em seguida foi realizada a contagem dos esporos no retículo central de uma câmara de Neubauer. O objetivo foi a obtenção de um inóculo final de 0,4 a $5,0 \times 10^4$ UFC/mL (unidades formadoras de colônia/mL), podendo-se obter este valor com a aplicação da fórmula:

$$N \times 10^4 \times 1/N = 1 \times 10^4 \text{ células}$$

onde “N” é igual ao número de células contadas e 1/N é a diluição a ser realizada. Para os *Mucorales* foi padronizado o inóculo final de 4×10^4 UFC/mL para a realização dos testes de suscetibilidade.

3.5.2. Preparação do meio de cultura

Foi utilizado o meio RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) com L-glutamina e glicose sem bicarbonato de sódio tamponado com 0,165 M de ácido morfolinopropanossulfônico (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) com pH ajustado para 7.0 com NaOH 1N e a esterilização da solução realizada por filtração a vácuo, em filtro 0,45 µm (Millex-HV, Millipore, França).

3.5.3. Preparação dos antifúngicos

Foram avaliados os seguintes antifúngicos isolados: anfotericina B (AMB) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA); 5-fluorocitosina (5FC) (Dry-plates – Eiken Japan); fluconazol (FCZ) (Dry-plates – Eiken Japan); micafungina (MCF) (Dry-plates – Eiken Japan); itraconazol (ITC) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA); voriconazol (VOR) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA); miconazol (MCZ) (Dry-plates – Eiken Japan) e terbinafina (TERB) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA). Para preparação da solução estoque foi pesado 12,8 mg de cada antifúngico (solução-mãe de 1280 µg/mL) de acordo com a ficha de

especificação do fabricante ajustando-se na concentração desejada. A solução foi armazenada em microtubos de polipropileno com tampa, mantidos a -5°C por até 6 meses. Posteriormente a solução estoque de cada antifúngico foi utilizada para realizar a diluição dos antifúngicos nas concentrações desejadas.

As concentrações dos antifúngicos utilizadas para execução dos testes foram: de 16 a 0,015 µg/mL para micafungina; de 16 a 0,03 µg/mL para anfotericina B e miconazol; de 64 a 0,125 µg/mL para 5-fluorocitosina e fluconazol; de 8 a 0,015 µg/mL para itraconazol e voriconazol e de 1 a 128,0 µg/mL para terbinafina. Os antifúngicos micafungina, anfotericina B, 5-fluorocitosina, fluconazol, itraconazol, voriconazol e miconazol também foram avaliados em placas previamente prontas (Dry-plates – Eiken Japan) para fins de validação e comparação dos resultados obtidos, assim como para avaliação da micafungina.

3.5.4. Preparação da placa do teste de suscetibilidade aos antifúngicos isolados *in vitro*

O teste para determinação de CIM foi realizado em placas de microtitulação, com fundo em “U” estéril, para onde foram transferidos todos os componentes preparados anteriormente da seguinte forma: 20 µL do antifúngico diluído nas diferentes concentrações até a 10^a fileira; 160 µL do meio de RPMI 1640 em todas as fileiras e mais 20 µL de inóculo em todas as fileiras, exceto a 11^a que corresponde ao controle negativo. Na 12^a fileira, por se tratar do controle positivo de crescimento, não foi adicionado o antifúngico. O teste também pode ser realizado considerando a 11^a fileira como controle positivo e a 12^a fileira como controle negativo. Totalizou-se um volume final de 200 µL, resultando em uma concentração do inóculo de $4,0 \times 10^4$ UFC/ml. Todos os testes foram realizados em duplicata (Figura 6).

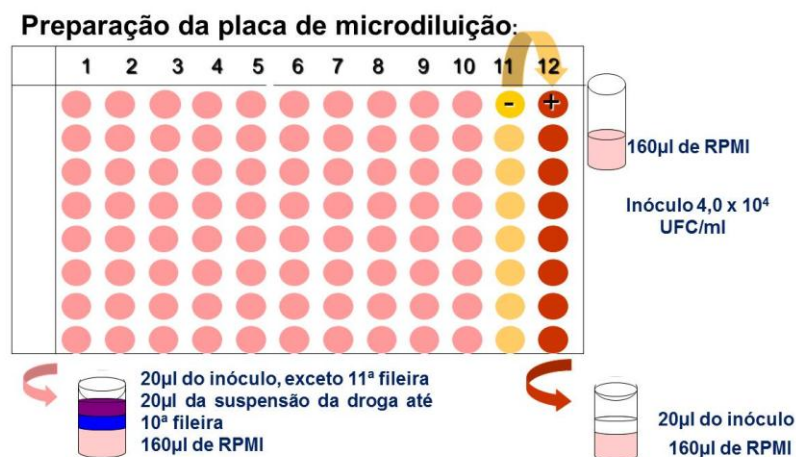


Figura 6. Esquema de preparo da placa de microtitulação para o teste

3.5.5. Controle de qualidade

Para validação dos testes, foram utilizadas as cepas de *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida krusei* ATCC 6852 e *Aspergillus flavus* ATCC 204304. Para cada diluição de antifúngicos realizou-se o teste de suscetibilidade com as cepas padrão, tendo seus resultados de CIM comparados com os valores estabelecidos pelo (CLSI M38-A2). Não havendo concordância com os valores estabelecidos, a diluição de antifúngicos foi desprezada preparando-se uma nova diluição até estar de acordo com os parâmetros estabelecidos.

3.5.6. Leitura da concentração inibitória mínima (CIM)

As placas foram incubadas na temperatura de 35°C com exceção da cepa LIF 1820 em que o teste foi realizado na temperatura de 25°C, sendo a leitura de cada placa realizada após 24 e 48 horas de incubação comparando-se o crescimento fúngico de cada poço com o do controle positivo, sendo esta leitura realizada com o auxílio de um espelho de leitura. Este crescimento foi numericamente determinado, de acordo com os seguintes critérios:

- número 4: quando não houve nenhuma redução no crescimento, ou seja 100% de crescimento.

- número 3: quando ocorreu leve redução no crescimento, apenas 80% de crescimento em comparação ao do obtido no controle positivo, sendo 20 % de inibição de crescimento.

- número 2: quando houve significativa redução no crescimento, isto é 50% de crescimento em comparação com o controle positivo do teste.

- número 1: quando ocorreu pouco crescimento, apenas 20% em comparação com o controle positivo, sendo 80% de inibição de crescimento.

- número 0 (zero): para ausência total de crescimento.

A CIM para a anfotericina B, itraconazol e voriconazol é determinada, como sendo a menor concentração do antifúngico que permite crescimento igual a zero, ou seja, nenhum sinal de crescimento fúngico com 100% de inibição de crescimento (IC100), uma vez que estes possuem mecanismo de ação considerado fungicida.

Para antifúngicos com mecanismo de ação fungistática a leitura do teste é feita atribuindo-se notas: 0 para ausência de crescimento visível (controle negativo); 1 quando ocorre 80% de inibição de crescimento em comparação ao crescimento obtido no controle positivo (IC 20); 2 ocorre 50% de inibição de crescimento fúngico em relação ao controle positivo (IC 50); 3 sendo correspondente a 20% de inibição de crescimento fúngico (IC 80) e 4 quando há 0% de inibição de crescimento, observando 100% de crescimento (controle positivo). Para terbinafina a CIM é determinada, como sendo a menor concentração que permite uma redução em 80% ou mais no crescimento fúngico (IC 20). (36).

Para o antifúngico micafungina pertencente a classe das equinocandinas, se faz a leitura da Concentração Mínima Efetiva (MEC), que corresponde ao parâmetro com melhor correlação clínica, que é a mais baixa concentração do antifúngico capaz de permitir o crescimento de hifas anormais, pequenas e

redondas em contraste ao crescimento do controle positivo que apresenta hifas longas e não ramificadas (36).

3.6. Avaliação da suscetibilidade *in vitro* aos antifúngicos em combinação

Foi realizado de acordo com a metodologia do “tabuleiro de xadrez”, possibilitando a combinação de dois antifúngicos em concentrações diferentes de forma que tanto a maior quanto a menor concentração de um agente antifúngico combina com as respectivas concentrações de outro antifúngico a ser testado (56).

3.6.1. Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado conforme descrito no item 3.5.1 sendo padronizado também um inóculo final de 4×10^4 UFC/mL.

3.6.2. Meio de cultura

Foi utilizado o meio RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) com L-glutamina e glicose sem bicarbonato de sódio tamponado com 0,165 M de ácido morfolinopropanossulfônico (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) com pH ajustado para 7.0 com NaOH 1N e a esterilização da solução realizada por filtração a vácuo, em filtro 0,45 µm (Millex-HV, Millipore, França).

3.6.3. Preparação dos antifúngicos

A combinação de antifúngicos foi realizada entre os seguintes antifúngicos: anfotericina B x itraconazol; anfotericina B x voriconazol; terbinafina x voriconazol; terbinafina x anfotericina B. As concentrações utilizadas dos antifúngicos na execução do teste foram: de 4 a 0,03125 µg/mL para anfotericina B; de 15 a 0,125 µg/mL para itraconazol; de 64 a 0,5 µg/mL e

de 16 a 0,125 µg/mL para voriconazol; 1 a 128,0 µg/mL; de 16 a 0,125 µg/mL e de 0,0625 a 0,00048 µg/mL para terbinafina. A preparação dos antifúngicos foi realizada de acordo com o item 3.5.3.

3.6.4. Preparação da placa de combinação de antifúngicos

Para a execução do teste coloca-se na vertical 20 µL do antifúngico A em suas diferentes concentrações em todos os poços da placa de microtitulação até a fileira 8; coloca-se na horizontal 20 µL do antifúngico B em todos os poços até a fileira 8; 140 µL do meio de cultura é adicionado em todos os poços da placa e em seguida adiciona-se 20 µL do inóculo em todos os poços com exceção da fileira 9 que corresponde ao controle negativo do teste. Para testar os antifúngicos individualmente pode-se colocar 20 µL do antifúngico A sozinho em todos os poços da fileira 9 e em todos os poços da fileira 10 coloca-se 20 µL antifúngico B. Em busca de uma maior agilidade na execução dos testes neste trabalho a avaliação dos antifúngicos isolados foi realizada em placas individuais não sendo portanto adicionados na placa de combinação preparada (Figura 7).

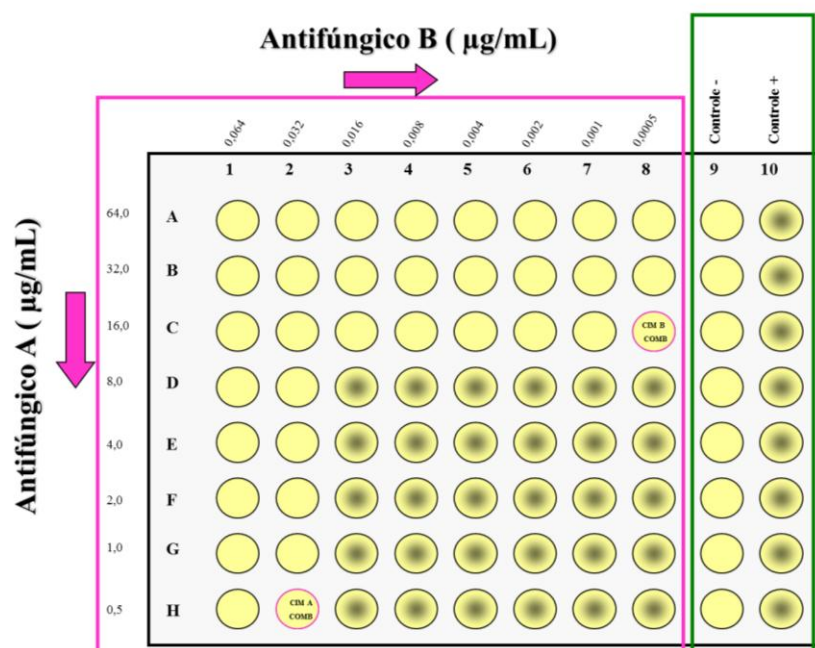


Figura 7. Esquema representativo da montagem e leitura da placa de microdiluição no teste de combinação de antifúngicos pelo método do “Tabuleiro de xadrez”.

3.6.5. Leitura do teste de combinação de antifúngicos e determinação da concentração inibitória fracional (CIF)

A leitura tanto visual com auxílio de espelho de leitura quanto realizada por espectrofotômetro foi realizada após 24 e 48 horas de incubação determinando assim o tipo de interação existente (58).

As placas foram incubadas na temperatura de 35°C com exceção da cepa LIF 1820 em que o teste foi realizado na temperatura de 25°C. A leitura das placas foi realizada também com auxílio de um espelho de leitura e com espectrofotômetro ($\lambda = 490$ nm) após 24 e 48 horas de incubação.

Após a leitura das placas o coeficiente de interação entre os antifúngicos testados foi avaliado por meio da determinação da Concentração Inibitória Fracional baseando-se na seguinte fórmula: $CIF = [CIM_A \text{ em combinação} / CIM_A \text{ sozinha}] + [CIM_B \text{ em combinação} / CIM_B \text{ sozinha}]$.

As interações entre os antifúngicos foram definidas da seguinte forma: sinergismo (S) se $CIF \leq 0,5$; indiferença (I) se $0,5 < CIF \leq 4$ e antagonismo (A) $CIF > 4$ (37-39,58,59).

3.7. Avaliação da suscetibilidade a antifúngicos pela técnica de avaliação dinâmica de crescimento através do sistema automatizado Biocell-Tracer®

3.7.1. Micro-organismo avaliado

A padronização dos testes de avaliação de crescimento dinâmico pelo BCT foi realizada utilizando-se o isolado clínico *Rhizopus oryzae* (LIF 1832), recentemente isolado de um paciente no intuito de estabelecer correlação clínico-laboratorial, uma vez que foi observado sucesso terapêutico, com paciente em alta como desfecho clínico.

3.7.2. Antifúngicos avaliados

Os antifúngicos avaliados foram anfotericina B, terbinafina e itraconazol, uma vez que, estes foram antifúngicos utilizados para o tratamento da mucormicose causada pelo isolado LIF 1832. A definição das concentrações de antifúngicos analisadas derivam das concentrações séricas dos antifúngicos e no resultado da CIM obtida no teste de microdiluição em caldo.

3.7.3. Placas de cultura

Para a análise do crescimento fúngico pelo BCT, foram utilizadas placas plásticas de cultura estéreis 35 x 10 mm (Corning® CellBIND, NY, USA), onde foram distribuídos 2mL da solução de poli-L-Lisina (PLL) (Sigma Chemical Co., Ltd., St. Louis, Mo., U.S.A.) na concentração ideal padronizada de 0,02%. Após 1 hora, a solução foi retirada por aspiração e as placas permaneceram abertas até secagem e logo em seguida em luz ultravioleta por 15 minutos. Após isto estas

foram utilizadas para preparar o inóculo a ser utilizado na monitorização do crescimento (47).

3.7.4. Preparação do inóculo e monitoramento do crescimento

Após o crescimento fúngico de três dias a temperatura ambiente em tubos contendo meio de cultura Ágar Batata Dextrose (Difco, Sparks, Maryland, USA), o inóculo foi preparado adicionando-se 5,0 ml de salina 0,85%, ou água destilada estéril, ao tubo até encobrir toda a colônia. Os esporos foram suavemente suspendidos com a ajuda de uma alça em anel. Transferiu-se a suspensão para um tubo estéril aguardou-se, por 5 minutos, a separação das hifas, dos esporos que, por serem mais leves, ficam no sobrenadante. O sobrenadante foi transferido para outro tubo estéril e a partir deste foi feita uma diluição em água destilada estéril ou salina 0,85%, realizando-se em seguida a contagem dos esporos no retículo central de uma câmara de Neubauer obtendo-se um inóculo na concentração de 1×10^5 UFC/mL, inóculo padronizado para a realização dos experimentos no equipamento.

O inóculo de conídios (1 μ L) preparado foi depositado no centro das placas preparadas com Poli-L-Lisina (PLL) na concentração de 0,02%. Após o depósito do inóculo, as placas permaneceram em repouso por 60 minutos com intuito de promover a secagem do inóculo sendo em seguida lavadas com 250 μ L de RPM 1640 ou água destilada estéril RPMI 1640 com intuito de promover a remoção dos conídios não aderidos à placa. Em seguida foi adicionado 2mL de RPMI 1640 em cada placa e as mesmas foram incubadas a 35° C durante 18 à 24 horas para o crescimento inicial das hifas que ficam aderidas no centro da placa. Após este período, uma placa foi transferida para o equipamento, onde aproximadamente 10 hifas foram selecionadas para avaliação do crescimento em μ m com intervalo de leitura correspondente a 3 minutos (μ m/3min) no sistema automatizado BioCell - Tracer® (Hidan Co. Ltd., Kashiwa, Japan).

3.7.5. Avaliação da suscetibilidade aos antifúngicos *in vitro* pelo método de avaliação dinâmica de crescimento

Nos experimentos iniciais utilizando o isolado LIF 1832 o tempo de experimento no Biocell-Tracer® foi padronizado em 76 minutos. Assim, o controle do crescimento fúngico sem a utilização do antifúngico foi realizado trocando-se 2 mL da solução de RPMI 1640 sem antifúngico após o período de 15 minutos do crescimento inicial da hifa (Pré-Exposição) e adicionando-se 2 mL de RPMI 1640 com antifúngico acompanhando-se o crescimento durante o período de 60 minutos (Exposição) do experimento. Após este período houve a troca novamente do RPMI 1640 com antifúngico por 2 mL de RPMI 1640 sem antifúngico e observação do crescimento das hifas por mais 30 minutos (Pós-Exposição).

A avaliação da suscetibilidade *in vitro* pelo método de avaliação dinâmica de crescimento frente ao antifúngico anfotericina B e terbinafina em suas diferentes concentrações foi realizada trocando-se o meio de cultura RPMI 1640 após o período de 15 minutos de crescimento inicial das hifas selecionadas (Pré-Exposição) por 2 mL de antifúngico preparado com RPMI 1640 na concentração a ser testada e acompanhando-se o crescimento no período de 60 minutos (Exposição). Assim, o experimento para estes antifúngicos ficou da seguinte forma: 15 minutos iniciais considerados como controle de crescimento e 60 minutos com adição da solução do antifúngico preparado com RPMI 1640, sendo o período de exposição. Com esta padronização, foram realizados testes parciais de avaliação dinâmica de crescimento na ausência ou presença dos antifúngicos anfotericina B, terbinafina e itraconazol.

Para a combinação dos antifúngicos terbinafina com itraconazol utilizando a concentração sérica destes, os testes de avaliação dinâmica de crescimento para os isolados de *Mucorales* foram realizados com um tempo maior de experimento devido ao mecanismo de ação destes antifúngicos e concentrações reduzidas a serem testadas. Neste caso o tempo de experimento no Biocell-Tracer® foi padronizado em 2h e 30 minutos sendo 15 minutos iniciais de avaliação do crescimento inicial das hifas selecionadas (Pré-Exposição) e 135 minutos com a presença do antifúngico (Período de exposição).

3.7.6. Análise dos dados obtidos

Para realização da curva controle de crescimento foi necessário calcular a mediana e média de crescimento de todas as hifas a cada 3 minutos para cada experimento padronizado realizando-se os cálculos da média e mediana de todos os dados gerados pelo BCT[®] através do sistema de análise de dados do Microsoft Excel.

Para os cálculos das taxas de inibição foram obtidas as medianas dos valores de crescimento do período de pré-exposição (0 – 15 min) e exposição (15 – 60 min) para cada hifa no caso dos antifúngicos anfotericina B, terbinafina e itraconazol. Para a combinação dos antifúngicos terbinafina com itraconazol foram obtidas as medianas dos valores de crescimento do período de pré-exposição (0 – 15 min) e exposição 135 minutos (15 – 130 min) para cada hifa. As taxas de inibição do antifúngico testado (anfotericina B) em suas diferentes concentrações foram calculadas pela diferença percentual entre o 1º período e o 2º período. Para isto, comparou-se as medidas obtidas no período de 3 a 15 min com o período de 15 a 60 min juntamente com o experimento controle (meio de RPMI 1640) de 3 a 15 min com o período de 15 a 130 min.

O cálculo do efeito do antifúngico se deu pelo crescimento inicial chamado pré-exposição (Pré-Exp) subtraído pelo crescimento durante a exposição do antifúngico (Exp) dividido pelo crescimento inicial (Pré-Exp) multiplicado por 100.

$$(\text{Pré-Exp} - \text{Exp}) / (\text{Pré-Exp}) \times 100\% \text{ (47).}$$

4. RESULTADOS

4.1. Identificação dos isolados de *Mucorales*

4.1.1. Identificação morfológica

Pela metodologia clássica utilizando a combinação de características macroscópicas e com base nas estruturas características da morfologia encontradas nas lâminas preparadas das culturas, os isolados LIF 299, 300 e 301 foram identificados como *Cunninghamella bertholletiae* (Figura 8) LIF 1046, 1143 e 1455 e 1820 identificados como *Rhizopus* sp. (Figura 9) enquanto LIF 1237 como *Absidia* sp. (Figura 10) e LIF 1832 como pertencente ao gênero *Rhizomucor* sp. (Figura 11) e LIF 1834 como *Syncephalastrum* sp. (Figura 12).

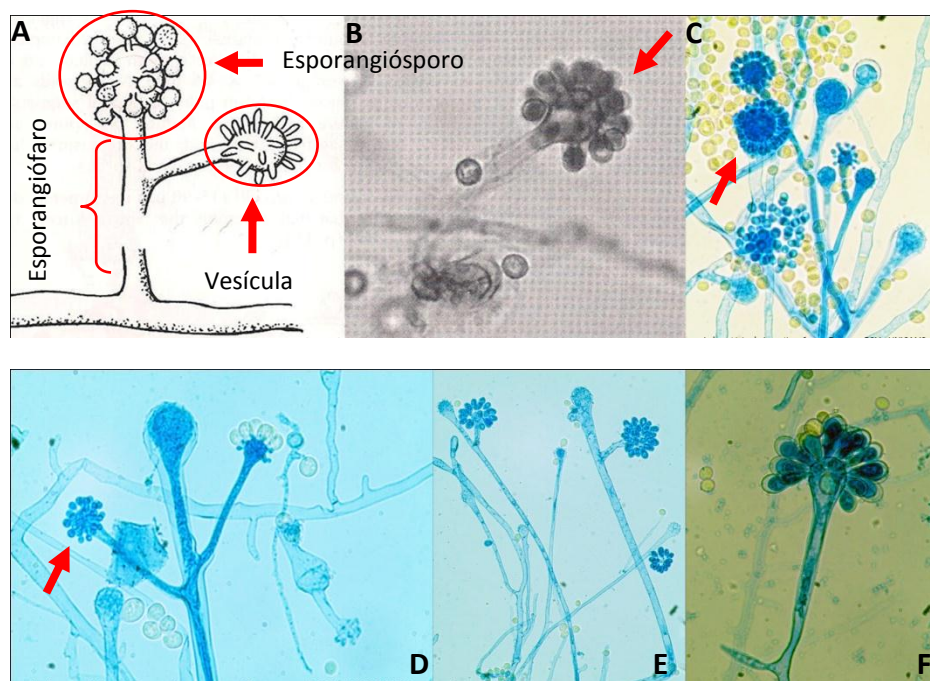


Figura 8. Estruturas características da morfologia do isolado de *Cunninghamella bertholletiae* (LIF 299, 300 e 301). Figuras (A) e (B): LARONE (2002); Figuras (C), (D), (E) e (F): Acervo do LIF- FCM – UNICAMP.

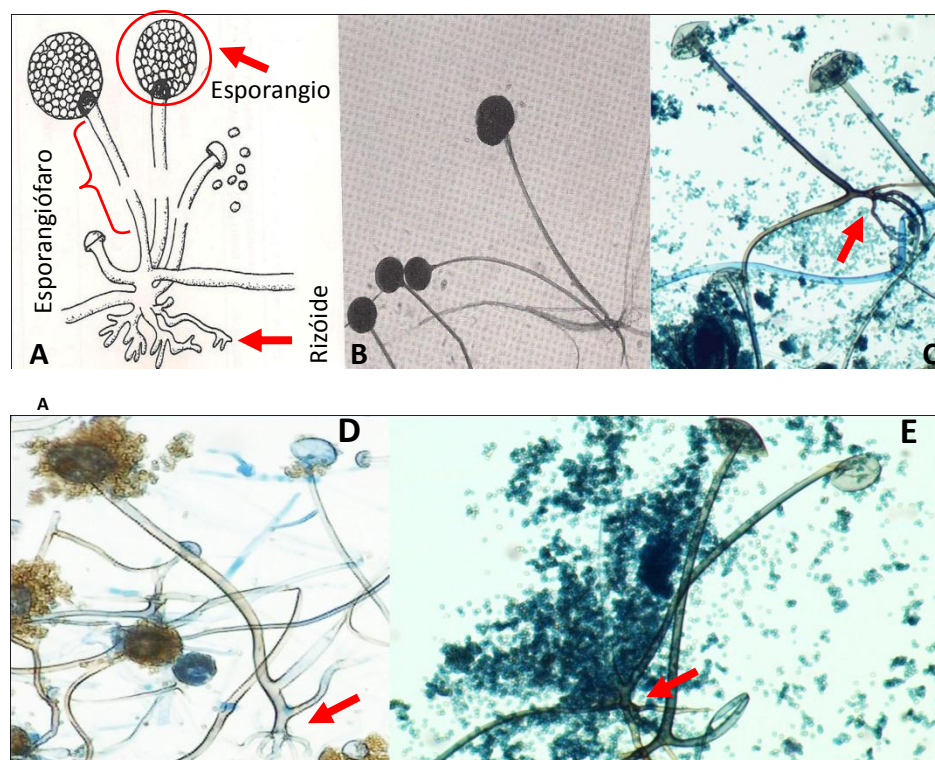


Figura 9. Estruturas características da morfologia do isolado de *Rhizopus* sp. (LIF 1046, 1143 e 1455 e 1820). Figuras (A) e (B): LARONE (2002); Figuras (C), (D) e (E): Acervo do LIF- FCM – UNICAMP.

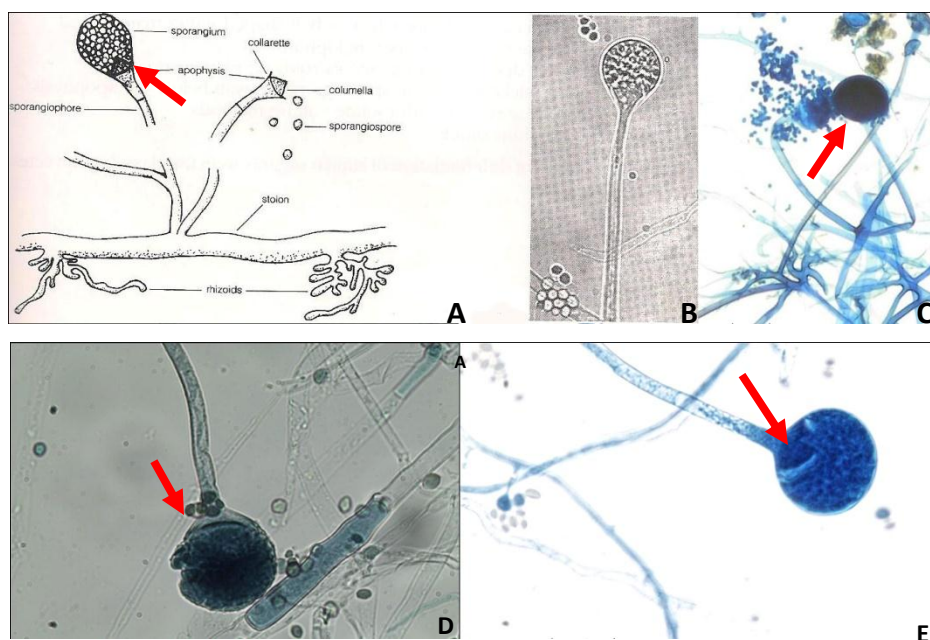


Figura 10. Estruturas características da morfologia do isolado de *Absidia* (*Lichtheimia*) sp. (LIF 1237). Figuras (A) e (B): LARONE (2002); Figuras (C), (D) e (E): Acervo do LIF- FCM – UNICAMP.

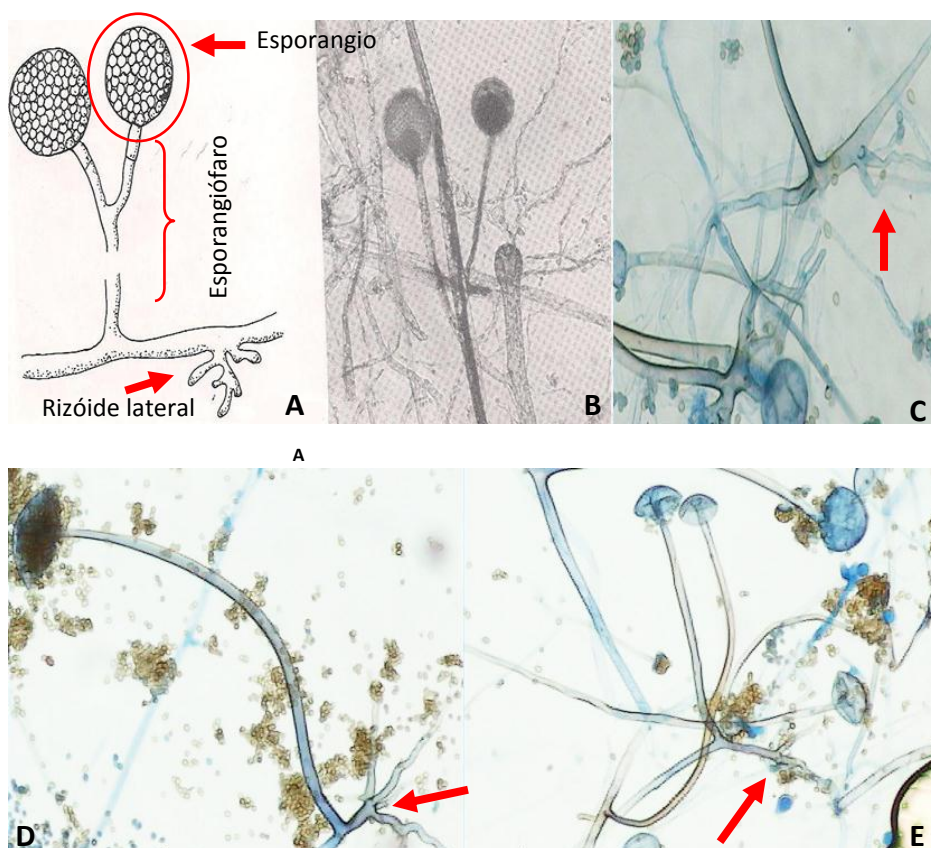


Figura 11. Estruturas características da morfologia do isolado de *Rhizomucor* sp. (LIF 1832).
Figuras (A) e (B): LARONE (2002); Figuras (C), (D) e (E): Acervo do LIF- FCM – UNICAMP.

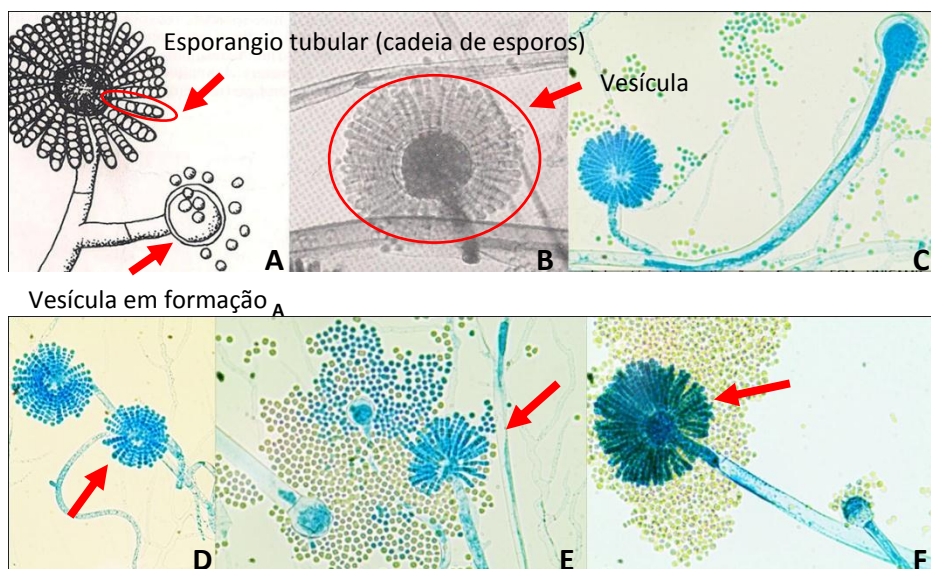


Figura 12. Estruturas características da morfologia do isolado de *Syncephalastrum* sp. (LIF 1834).
Figuras (A) e (B): LARONE (2002); Figuras (C), (D), (E) e (F): Acervo do LIF- FCM – UNICAMP.

4.1.2. Identificação molecular pela técnica de sequenciamento

4.1.2.1. Extração do DNA

A quantificação do DNA extraído dos isolados em estudo utilizando o espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA) resultou em concentrações finais entre 6,9 e 227,1 ng/μL. As amostras foram armazenadas a -20°C para posterior utilização na reação de PCR (Tabela 2).

Tabela 2. Quantificação do DNA extraído dos micro-organismos em estudo

Quantificação de DNA extraído		
LIF número	Isolado *	Quantificação do DNA extraído
299	<i>C.bertholletiae</i>	7,31 ng/μL
300	<i>C.bertholletiae</i>	6,9 ng/μL
301	<i>C.bertholletiae</i>	8,1 ng/μL
1046	<i>Rhizopus</i> sp.	61,2 ng/μL
1143	<i>Rhizopus</i> sp.	48 ng/μL
1237	<i>Absidia (Lichtheimia)</i> sp.	19,4 ng/μL
1455	<i>Rhizopus</i> sp.	9,3 ng/μL
1820	<i>Rhizopus</i> sp.	10,3 ng/μL
1832	<i>Rhizomucor</i> sp.	82,5 ng/μL
1834	<i>Syncephalastrum</i> sp.	227,1 ng/μL

* Nomenclatura dos isolados conforme a identificação morfológica.

4.1.2.2. Amplificação pela PCR

A amplificação pela PCR utilizando a região D1/D2 foi realizada para todos os isolados de *Mucorales* apresentando entre 600 e 900 pares de bases na região amplificada do rRNA (Figura 13).

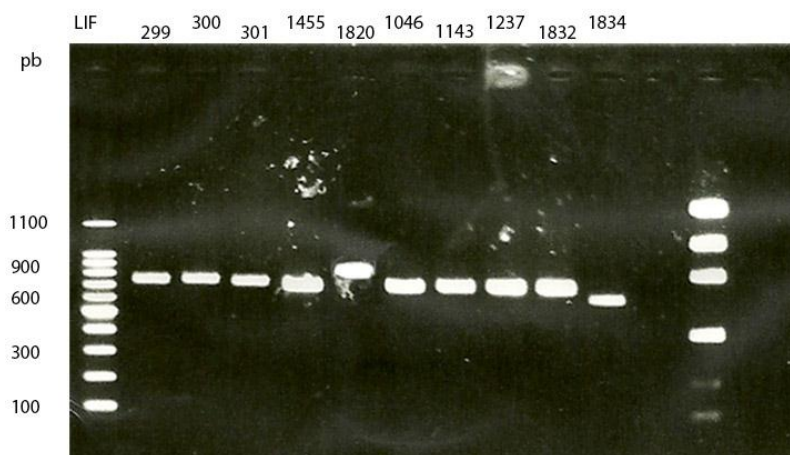


Figura 13. Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos obtidos pela amplificação pela PCR.

4.1.3. Identificação molecular e construção da árvore filogenética

A comparação das sequências obtidas pela técnica de biologia molecular com outras sequências disponíveis em banco de dados revelou que os isolados LIF 299, 300 e 301 correspondem a espécie de *Cunninghamella bertholletiae*, os isolados LIF 1046, 1143, 1237, 1455 e 1832 correspondem a espécie de *Rhizopus oryzae*, o isolado LIF 1820 corresponde a *Rhizopus stolonifer* e o isolado LIF 1834 corresponde a *Syncephalastrum racemosum*. A similaridade das sequências com os bancos de dados disponíveis está demonstrada na Tabela 3.

Tabela 3. Similaridade dos resultados entre bancos de dados disponíveis

LIF número	Identificação	Banco de dados					
		Genbank (NCBI)		Biologics (CBS)		ISHAM ITS - Blast search (MYCOLOGY LAB)	
		homologia %	acesso (07/04/2014)	homologia %	acesso (07/04/2014)	homologia %	acesso (07/04/2014)
299	<i>C.bertholletiae</i>	100	JN206600.1	100	693.68	—	*
300	<i>C.bertholletiae</i>	100	JN206600.1	100	693.68	—	*
301	<i>C.bertholletiae</i>	100	JN206600.1	100	693.68	—	*
1046	<i>Rhizopus oryzae</i>	100	HQ435000.1	100	120.12	—	*
1143	<i>Rhizopus oryzae</i>	100	AY213625.1	100	330.53	—	*
1237	<i>Rhizopus oryzae</i>	100	JN939196.1	100	120.12	—	*
1455	<i>Rhizopus oryzae</i>	100	JN939196.1	100	330.53	—	*
1820	<i>Rhizopus stolonifer</i>	100	JN938904.1;	100	609.82	—	*
1832	<i>Rhizopus oryzae</i>	100	JQ745263.1;	100	120.12	—	*
1834	<i>Syncephalastrum racemosum</i>	96,2	HM849718.1	100	348.35	—	*

* Parâmetros de identificação não encontrados

O esquema ilustrando os eletroferogramas obtidos no sequenciamento encontram-se no anexo 1, já a árvore filogenética para os isolados em estudo está representada na figura 14, sendo dividida em duas clades: a clade 1 tem um subgrupo formado por *Rhizopus oryzae*. Já a clade 2 é formada por dois subgrupos, um subgrupo formado por *Rhizopus stolonifer* e *Syncephalastrum racemosum* e outro subgrupo formado por *Cunninghamella bertholletiae* (Figura 14).

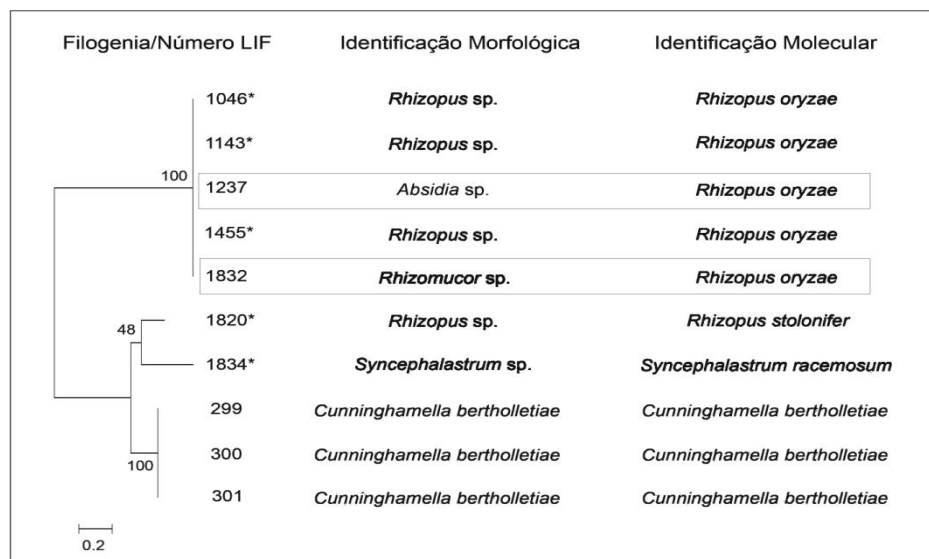


Figura 14. Filogenia e comparação entre identificação morfológica e molecular para os isolados em estudo. - os números presentes na árvore filogenética indicam similaridade das sequências; - (*) isolados em que o sequenciamento permitiu a identificação de espécie; - os quadrados indicam isolados com resultados discordantes entre as duas metodologias.

4.2. Avaliação da suscetibilidade aos antifúngicos isolados *in vitro* pelo método de microdiluição em caldo (CLSI, M38-A2)

Os resultados dos testes de concentração inibitória mínima (CIM) dos antifúngicos frente aos 10 isolados em estudo comparando-se as leituras realizadas com tempo de incubação de 24 e 48 h foram de 8 a ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$ para micafungina, de 0,25 a 8 $\mu\text{g/mL}$ para anfotericina B, ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$ para 5-fluorocitosina, de 16 a ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$ para fluconazol, de 1 a > 8 $\mu\text{g/mL}$ para itraconazol, > 8 $\mu\text{g/mL}$ para voriconazol; de 0,25 a 4 $\mu\text{g/mL}$ para miconazol e de 0,0031 a > 16 $\mu\text{g/mL}$ para terbinafina (Tabela 4).

Tabela 4. Valores da concentração inibitória mínima (CIM) dos antifúngicos micafungina, anfotericina B, 5-fluorocitosina, fluconazol, itraconazol, voriconazol, miconazol e terbinafina frente aos isolados selecionados para o estudo

LIF no	Identificação	Antifungico (ug/mL)																	
		Micafungina				Anfotericina B		5-Fluorocitosina		Fluconazol		Itraconazol		Voriconazol		Miconazol		Terbinafina	
		IC 50		MEC		IC 100		IC 50		IC 50		IC 100		IC 100		IC 50		IC 50	
		24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
299	<i>C.bertholletiae</i>	8->16*	≥ 16	≥ 16	≥ 16	2	2	≥ 64	> 64	> 64	64	1	1 - 2	>8	>8	1 - 2	2	0,031	0,063
300	<i>C.bertholletiae</i>	≥ 16	≥ 16	≥ 16	≥ 16	2 - 4	4 - 8	> 64	> 64	32 - > 64	>64	>8	2 - 8	>8	>8	1 - 2	1 - 2	0,031	0,031
301	<i>C.bertholletiae</i>	≥ 16	> 16	≥ 16	≥ 16	1 - 4	2 - 8	> 64	> 64	32 - 64	≥ 64	1	8	>8	>8	2	1 - 2	0,016	0,063
1046	<i>Rhizopus oryzae</i>	≥ 16	> 16	≥ 16	≥ 16	0,5 - 2	1 - 4	> 64	> 64	≥ 64	16 - > 64	1 - 2	4 - 8	>8	>8	1	2	>16	>16
1143	<i>Rhizopus oryzae</i>	> 16	> 16	≥ 16	≥ 16	0,25 - 0,5	1	> 64	> 64	> 64	> 64	>8	>8	>8	>8	2	2 - 4	>16	>16
1237	<i>Rhizopus oryzae</i>	> 16	> 16	≥ 16	≥ 16	0,5 - 1	1 - 2	> 64	> 64	32 - 64	> 64	8	>8	>8	>8	1 - 2	1	>16	>16
1455	<i>Rhizopus oryzae</i>	> 16	> 16	≥ 16	≥ 16	0,25 - 0,5	0,5 - 1	> 64	> 64	> 64	> 64	4 - >8	2 - >8	>8	>8	1	2 - 4	>16	>16
1820	<i>Rhizopus stolonifer</i>	> 16	> 16	≥ 16	≥ 16	0,25	0,5	> 64	> 64	> 64	> 64	2	4	>8	>8	1	1	>16	>16
1832	<i>Rhizopus oryzae</i>	> 16	> 16	≥ 16	≥ 16	0,25	1	> 64	> 64	> 64	> 64	1	>8	>8	>8	0,25 - 2	2	>16	>16
1834	<i>Syncephalastrum racemosum</i>	≥ 16	> 16	≥ 16	≥ 16	0,5	0,5 - 1	> 64	> 64	> 64	> 64	1	1	>8	>8	0,25 - 2	2	0,5	1

LIF = Laboratório de Investigação em Fungos; **MEC** = Concentração Efetiva Mínima; **IC 50**=leitura de 50% de inibição do crescimento; **IC**

100=leitura de 100% de inibição de crescimento. *Todos os testes foram realizados em duplicata e resultados diferentes foram observados

em algumas leituras conforme demonstrado na tabela.

4.3. Avaliação da suscetibilidade *in vitro* aos antifúngicos em combinação

Os resultados das combinações de antifúngicos realizadas através da metodologia do "tabuleiro de xadrez" demonstraram 100% de sinergismo nas interações entre anfotericina B x itraconazol e anfotericina B x voriconazol quando se faz a leitura considerando valores de 100 % de inibição de crescimento visível tanto para itraconazol quanto para voriconazol. Sinergismo de 80% e 20% de indiferença foram observados quando considerados valores correspondentes a 50% de inibição do crescimento visível para os dois antifúngicos (Tabela 5 e 6).

As interações resultantes entre terbinafina x itraconazol quando se faz a leitura considerando valores de 100 % de inibição de crescimento visível para itraconazol foi de 90% de sinergismo e 10% de indiferença. Sinergismo de 70% e 30% de indiferença foram observados quando considerados valores correspondentes a 50% de inibição do crescimento visível para itraconazol (Tabela 7).

As interações resultantes da combinação de terbinafina x voriconazol considerando valores de 100 % de inibição de crescimento visível para voriconazol foi de 80% de sinergismo e 20% de indiferença. Sinergismo de 50% e 50% de indiferença foram observados quando considerados valores correspondentes a 50% de inibição do crescimento visível para voriconazol. (Tabela 8).

Tabela 5. Suscetibilidade dos isolados de *Mucorales* frente à combinação de anfotericina B X itraconazol

LIF no	Identificação	CIM antifúngico sozinho (µg/mL)		CIM antifúngico em combinação (µg/mL)		Interação		CIM antifúngico sozinho (µg/mL)		CIM antifúngico em combinação (µg/mL)		Interação	
		Anfotericina	Itraconazol	Anfotericina	Itraconazol	CIF	T	Anfotericina	Itraconazol	Anfotericina	Itraconazol	CIF	T
		B	(50 %)	B	(50 %)			B	(100 %)	B	(100 %)		
299	<i>C.bertholletiae</i>	2	1	0,03125	0,125	0,1	S	2	2	0,03125	0,125	0,08	S
300	<i>C.bertholletiae</i>	2	1	0,03125	0,125	0,1	S	2	4	0,03125	0,125	0,05	S
301	<i>C.bertholletiae</i>	2	2	0,03125	0,125	0,08	S	2	8	0,03125	0,125	0,03	S
1046	<i>Rhizopus oryzae</i>	0,125	0,5	0,03125	0,125	0,5	S	0,125	4	0,03125	0,125	0,3	S
1143	<i>Rhizopus oryzae</i>	0,25	0,5	0,03125	0,125	0,4	S	0,25	8	0,03125	0,125	0,1	S
1237	<i>Rhizopus oryzae</i>	0,25	0,125	0,03125	0,125	1	I	0,25	2	0,03125	0,125	0,2	S
1455	<i>Rhizopus oryzae</i>	0,125	1	0,03125	0,125	0,4	S	0,125	4	0,03125	0,125	0,3	S
1820	<i>Rhizopus stolonifer</i>	0,125	0,5	0,03125	0,125	0,5	S	0,125	4	0,03125	0,125	0,3	S
1832	<i>Rhizopus oryzae</i>	0,25	0,5	0,03125	0,125	0,4	S	0,25	1	0,03125	0,125	0,3	S
1834	<i>Syncephalastrum racemosum</i>	0,125	0,25	0,03125	0,125	0,8	I	0,125	4	0,03125	0,125	0,3	S

LIF: Laboratório de Investigação em Fungos; **CIM:** Concentração Inibitória Mínima; **CIF:** Concentração Inibitória Fracional; **T:** Tipo de Interação; **S:** Sinergismo; **I:** Indiferença. As leituras para itraconazol foram realizadas com 50% de inibição do crescimento e 100% de inibição de crescimento na leitura de CIM quando testado isoladamente.

Tabela 6. Suscetibilidade dos isolados de *Mucorales* frente à combinação de anfotericina B X voriconazol

LIF no	Identificação	CIM antifúngico sozinho (µg/mL)		CIM antifúngico em combinação (µg/mL)		Interação		CIM antifúngico sozinho (µg/mL)		CIM antifúngico em combinação (µg/mL)		Interação	
		Anfotericina B	Voriconazol (50 %)	Anfotericina B	Voriconazol (50 %)	CIF	T	Anfotericina B	Voriconazol (100 %)	Anfotericina B	Voriconazol (100 %)	CIF	T
299	<i>C.bertholletiae</i>	2	4	0,03125	0,5	0,1	S	2	8	0,03125	0,5	0,08	S
300	<i>C.bertholletiae</i>	2	4	0,03125	0,5	0,1	S	2	64	0,03125	0,5	0,02	S
301	<i>C.bertholletiae</i>	2	8	0,03125	0,5	0,08	S	2	64	0,03125	0,5	0,02	S
1046	<i>Rhizopus oryzae</i>	0,125	2	0,03125	0,5	0,5	S	0,125	16	0,03125	0,5	0,3	S
1143	<i>Rhizopus oryzae</i>	0,25	2	0,03125	0,5	0,4	S	0,25	16	0,03125	0,5	0,2	S
1237	<i>Rhizopus oryzae</i>	0,25	1	0,03125	0,5	0,6	I	0,25	8	0,03125	0,5	0,2	S
1455	<i>Rhizopus oryzae</i>	0,125	2	0,03125	0,5	0,5	S	0,125	16	0,03125	0,5	0,3	S
1820	<i>Rhizopus stolonifer</i>	0,125	1	0,03125	0,5	0,8	I	0,125	2	0,03125	0,5	0,5	S
1832	<i>Rhizopus oryzae</i>	0,25	4	0,03125	0,5	0,3	S	0,25	8	0,03125	0,5	0,2	S
1834	<i>Syncephalastrum racemosum</i>	0,125	4	0,03125	0,5	0,4	S	0,125	32	0,03125	0,5	0,3	S

LIF: Laboratório de Investigação em Fungos; **CIM:** Concentração Inibitória Mínima; **CIF:** Concentração Inibitória Fracional; **T:** Tipo de Interação; **S:** Sinergismo; **I:** Indiferença. As leituras para voriconazol foram realizadas com 50% de inibição do crescimento e 100% de inibição de crescimento na leitura de CIM quando testado isoladamente.

Tabela 7. Suscetibilidade dos isolados de *Mucorales* frente à combinação de terbinafina x itraconazol

LIF no	Identificação	CIM antifúngico sozinho (µg/mL)		CIM antifúngico em combinação (µg/mL)		Interação		CIM antifúngico sozinho (µg/mL)		CIM antifúngico em combinação (µg/mL)		Interação	
		Terbinafina	Itraconazol (50 %)	Terbinafina	Itraconazol (50 %)	CIF	T	Terbinafina	Itraconazol (100 %)	Terbinafina	Itraconazol (100 %)	CIF	T
299	<i>C.bertholletiae</i>	0,03125	1	0,00048	0,125	0,1	S	0,03125	2	0,00048	0,125	0,08	S
300	<i>C.bertholletiae</i>	0,03125	1	0,00048	0,5	0,5	S	0,03125	4	0,00048	0,5	0,1	S
301	<i>C.bertholletiae</i>	0,01563	1	0,00048	0,5	0,5	S	0,01563	4	0,00048	0,5	0,2	S
1046	<i>Rhizopus oryzae</i>	>16	4	0,125	8	2	I	>16	>16	0,125	8	0,5	S
1143	<i>Rhizopus oryzae</i>	>16	4	0,125	2	0,5	S	>16	8	0,125	2	0,3	S
1237	<i>Rhizopus oryzae</i>	>16	4	0,125	4	1	I	>16	8	0,125	4	0,5	S
1455	<i>Rhizopus oryzae</i>	>16	0,5	0,125	2	4	I	>16	2	0,125	2	1,0	I
1820	<i>Rhizopus stolonifer</i>	>16	1	0,125	0,5	0,5	S	>16	2	0,125	0,5	0,3	S
1832	<i>Rhizopus oryzae</i>	> 128	2	1	1	0,5	S	> 128	4	1	1	0,3	S
1834	<i>Syncephalastrum racemosum</i>	0,5	2	0,125	0,125	0,3	S	0,5	4	0,125	0,125	0,3	S

LIF: Laboratório de Investigação em Fungos; **CIM:** Concentração Inibitória Mínima; **CIF:** Concentração Inibitória Fracional; **T:** Tipo de Interação; **S:** Sinergismo; **I:** Indiferença. As leituras para itraconazol foram realizadas com 50% de inibição do crescimento e 100% de inibição de crescimento na leitura de CIM quando testado isoladamente.

Tabela 8. Suscetibilidade dos isolados de *Mucorales* frente à combinação de terbinafina x voriconazol

LIF no	Identificação	CIM antifúngico sozinho (µg/mL)		CIM antifúngico em combinação (µg/mL)		Interação		CIM antifúngico sozinho (µg/mL)		CIM antifúngico em combinação (µg/mL)		Interação	
		Terbinafina	Voriconazol (50 %)	Terbinafina	Voriconazol (50 %)	CIF	T	Terbinafina	Voriconazol (100 %)	Terbinafina	Voriconazol (100 %)	CIF	T
299	<i>C. bertholletiae</i>	0,03125	4	0,0078	0,125	0,3	S	0,03125	>16	0,0078	0,125	0,3	S
300	<i>C. bertholletiae</i>	0,03125	4	0,01563	0,125	0,5	S	0,03125	>16	0,01563	0,125	0,5	S
301	<i>C. bertholletiae</i>	0,01563	4	0,01563	0,125	1	I	0,01563	>16	0,01563	0,125	1	I
1046	<i>Rhizopus oryzae</i>	>16	4	0,125	16	4	I	>16	>16	0,125	16	1	I
1143	<i>Rhizopus oryzae</i>	>16	8	0,125	4	0,5	S	>16	>16	0,125	4	0,3	S
1237	<i>Rhizopus oryzae</i>	>16	4	0,125	8	2	I	>16	16	0,125	8	0,5	S
1455	<i>Rhizopus oryzae</i>	>16	2	0,125	4	2	I	>16	>16	0,125	4	0,3	S
1820	<i>Rhizopus stolonifer</i>	>16	1	0,125	0,125	0,1	S	>16	2	0,125	0,125	0,08	S
1832	<i>Rhizopus oryzae</i>	>16	2	0,25	8	4	I	>16	16	0,25	8	0,5	S
1834	<i>Syncephalastrum racemosum</i>	0,5	8	0,25	0,125	0,5	S	0,5	>16	0,25	0,125	0,5	S

CIM: Concentração Inibitória Mínima; **CIF:** Concentração Inibitória Fracional; **T:** Tipo de Interação; **S:** Sinergismo; **I:** Indiferença. As leituras para voriconazol foram realizadas com 50% de inibição do crescimento e 100% de inibição de crescimento na leitura de CIM quando testado isoladamente.

A combinação de terbinafina x anfotericina B demonstrou 100% de sinergismo (Tabela 9).

Tabela 9. Suscetibilidade dos isolados de *Mucorales* frente à combinação de terbinafina x anfotericina B

LIF no	Identificação	CIM antifúngico sozinho (µg/mL)		CIM antifúngico em combinação (µg/mL)		Interação	
		Terbinafina	Anfotericina B	Terbinafina	Anfotericina B	CIF	T
299	<i>C.bertholletiae</i>	0,03125	4	0,00048	0,03125	0,02	S
300	<i>C.bertholletiae</i>	0,03125	2	0,00048	0,03125	0,03	S
301	<i>C.bertholletiae</i>	0,01563	2	0,00048	0,03125	0,05	S
1046	<i>Rhizopus oryzae</i>	>16	0,5	0,125	0,25	0,5	S
1143	<i>Rhizopus oryzae</i>	>16	1	0,125	0,25	0,3	S
1237	<i>Rhizopus oryzae</i>	>16	0,5	0,125	0,25	0,5	S
1455	<i>Rhizopus oryzae</i>	>16	0,5	0,125	0,25	0,5	S
1820	<i>Rhizopus stolonifer</i>	>16	0,5	0,125	0,25	0,5	S
1832	<i>Rhizopus oryzae</i>	>16	0,5	0,125	0,25	0,5	S
1834	<i>Syncephalastrum racemosum</i>	0,5	0,25	0,125	0,03125	0,4	S

LIF: Laboratório de Investigação em Fungos; **MIC:** Concentração Inibitória Mínima; **CIF:** Concentração Inibitória Fracional; **T:** Tipo de Interação; **S:** Sinergismo.

4.4. Avaliação da suscetibilidade a antifúngicos pela técnica de avaliação dinâmica de crescimento através do sistema automatizado Biocell - Tracer®

Para a padronização do inóculo foram avaliados vários parâmetros, tais como: meio para indução de esporulação; tempo de crescimento prévio da cultura fúngica, concentração ideal de Poli-L-Lisina, concentração e quantidade do inóculo; tempo e temperatura de incubação prévia com o meio de cultura RPMI; temperatura de execução do teste; intervalos de leitura e duração do teste (Tabela 10).

Tabela 10. Padronização do teste no sistema automatizado Biocell-Tracer® para *Rhizopus oryzae* (LIF 1832)

Parâmetros avaliados	Parâmetros obtidos (LIF 1832)
Meio para indução de esporulação	Agar batata
Tempo de crescimento prévio da cultura fúngica	3 dias a TA
Concentração ideal de Poli-L-Lisina	0,02%
Concentração do inóculo em mL	10 ⁵ conídios
Quantidade de inóculo	1µl
Tempo e temperatura de incubação prévia com RPMI	16 à 24 h a 35°C
Temperatura de execução do teste	35°C
Intervalos de leitura	3 min
Duração do teste*	76 min
Medida para avaliação estatística dos resultados	mediana

*Pré - exposição:15 minutos ; Exposição: 60 minutos; Pós - exposição: 30 minutos.

*TA (temperatura ambiente)

O tempo ideal de crescimento das culturas para a obtenção de conídios foi de 3 a 4 dias a 28° C em ágar batata, sendo o melhor meio de cultura para a produção de conídios.

As hifas foram melhor fixadas à placa de cultura com poli-L-Lisina (PLL) na concentração de 0,02% (w/v).

Os isolados de *Mucorales* apresentaram crescimento inicial ideal após 16h de incubação de 1 µL do inóculo contendo 10⁵conídios/ µL sendo 24 horas o tempo de incubação máximo para realização dos experimentos. A temperatura de incubação prévia para inóculos dos isolados de *Mucorales* foi de 35° C, de acordo com o CLSI (M38-A2, 2008) e esta foi também a temperatura para a execução do teste; intervalo de 3 min para a medida da taxa de crescimento das hifas; 1h e 45 min como o tempo total de experimento.

Inicialmente o tempo de experimento para o isolado *Rhizopus oryzae* no BCT foi padronizado em 76 minutos: sendo os 15 minutos iniciais considerados como controle de crescimento (período de pré-exposição) e 60 minutos com a presença do antifúngico (período de exposição). Com esta padronização foram realizados os testes de avaliação dinâmica de crescimento na ausência ou

presença dos antifúngicos anfotericina B, terbinafina e itraconazol em suas diferentes concentrações. A CIM obtida pelo teste de suscetibilidade dos antifúngicos isolados *in vitro* foi utilizada como ponto de partida para avaliação do crescimento das hifas e a partir desta foram avaliadas dosagens mais baixas (figuras 15 e 16).

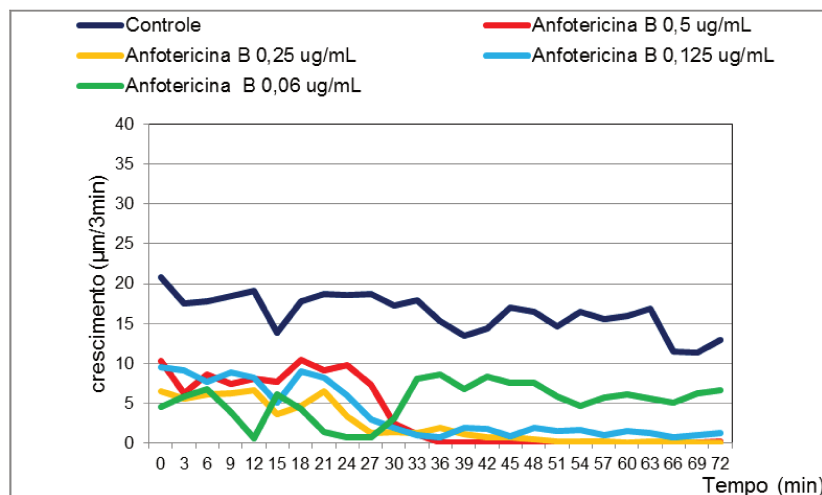


Figura 15. Acompanhamento de crescimento de hifas de *Rhizopus oryzae* (LIF 1832) frente ao antifúngico anfotericina B nas concentrações de 0,5; 0,25; 0,125 e 0,06 µg/mL.

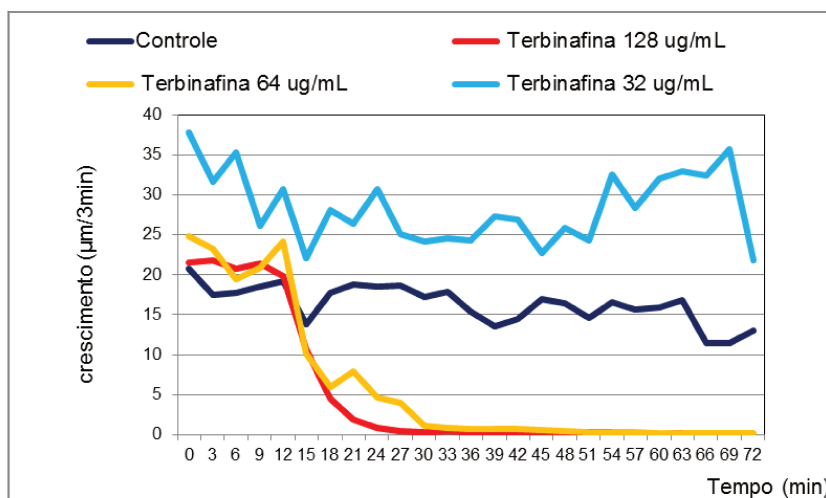


Figura 16. Acompanhamento de crescimento de hifas de *Rhizopus oryzae* (LIF 1832) frente ao antifúngico terbinafina nas concentrações de 128; 64 e 32 µg/mL.

Os resultados da taxa de inibição do crescimento das hifas para os valores anfotericina B nas concentrações acima testadas foram de: 98,5% para 0,5 µg/mL de anfotericina B; 88,25% para 0,25 µg/mL; 81,61% para 0,125 µg/mL de anfotericina B e 0% para 0,06 µg/mL de anfotericina B (figura 17).

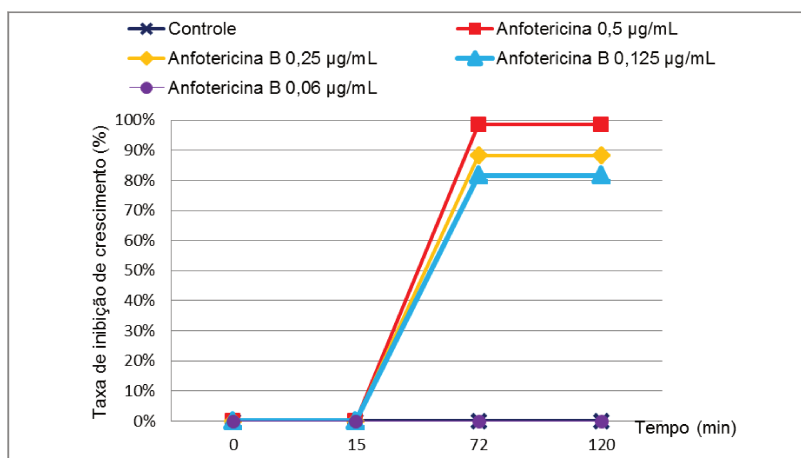


Figura 17. Porcentagem de inibição de crescimento de hifas de *Rhizopus oryzae* (LIF 1832) frente ao antifúngico anfotericina B nas concentrações de 0,5; 0,25; 0,125 e 0,06 µg/mL.

Os resultados da taxa de inibição do crescimento das hifas para os valores terbinafina nas concentrações acima testadas foram de: 98,7% para 128 µg/mL de terbinafina; 97,44% para 64 µg/mL de terbinafina e 0% 32 µg/mL de terbinafina (figura 18).

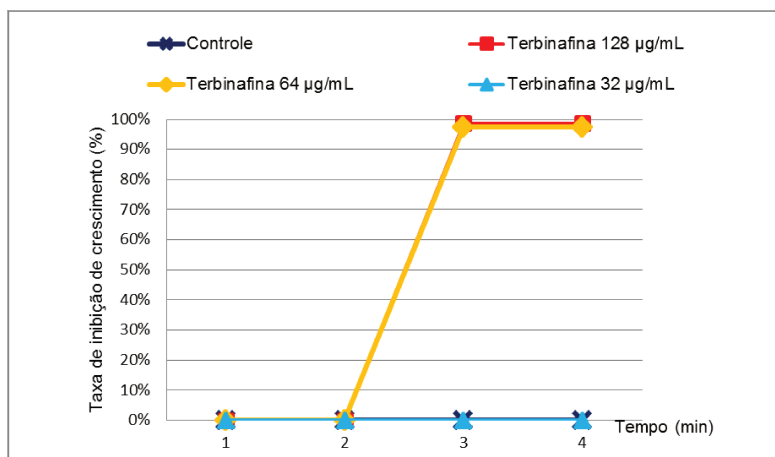


Figura 18. Porcentagem de inibição de crescimento de hifas de *Rhizopus oryzae* (LIF 1832) frente ao antifúngico terbinafina nas concentrações de 128; 64 e 32 µg/mL.

O acompanhamento da avaliação de suscetibilidade das hifas de *Rhizopus oryzae* (LIF 1832) com a utilização das CIMs dos antifúngicos anfotericina B, itraconazol e terbinafina obtidas pelo método de microdiluição em caldo está representado na figura 19.

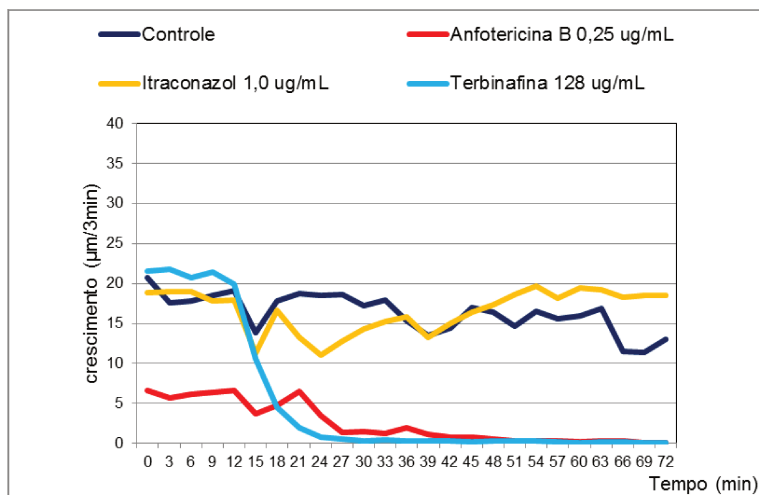


Figura 19. Acompanhamento de crescimento de hifas de *Rhizopus oryzae* (LIF 1832) frente aos antifúngicos anfotericina B, itraconazol e terbinafina nas concentrações de 0,25; 1,0 e 128 µg/mL, respectivamente.

Os resultados da taxa de inibição do crescimento das hifas para os valores de CIMs obtidos pelo método de microdiluição em caldo foram: 88.25% de inibição de crescimento quando se utilizou CIM de 0,25 µg/mL de anfotericina B (IC100) obtida pelo método de microdiluição em caldo; 0% de inibição de crescimento quando se utilizou CIM de 1,0 µg/mL de itraconazol (IC100) obtida pelo método de microdiluição em caldo e no caso de CIM >128 µg/mL (IC80) obtida pelo método de microdiluição em caldo (foi avaliada a concentração de 128 µg/mL) para terbinafina, a taxa de inibição foi de 98.70% (Figura 20).

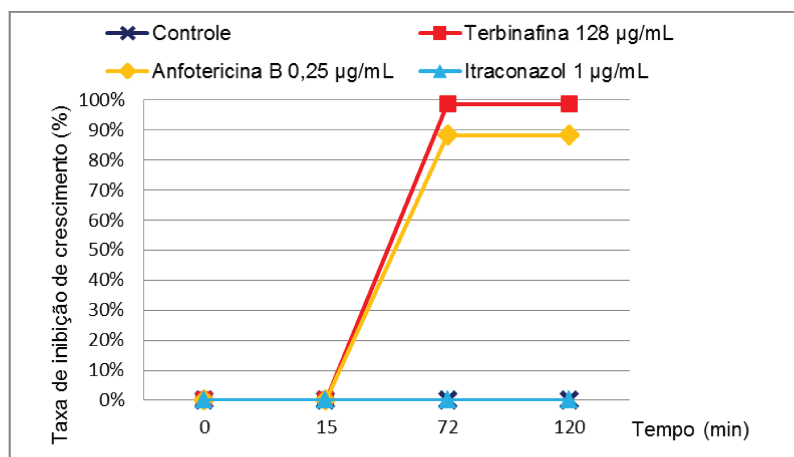


Figura 20. Porcentagem de inibição de crescimento de hifas de *Rhizopus oryzae* (LIF 1832) frente as CIMs de anfotericina B, itraconazol e terbinafina

Estes resultados não pareciam estar de acordo nem com a interação sinérgica obtida entre itraconazol e terbinafina com a metodologia do “tabuleiro de xadrez” nem tampouco com a boa resposta clínica observada no paciente. Deste modo, foi avaliada a combinação de itraconazol e terbinafina (antifúngicos utilizados no tratamento do paciente) conforme caso resumido no anexo 2 nas concentrações séricas médias, possíveis de serem atingidas, embora não dosadas, de acordo com as doses administradas: 0.25 µg/mL de itraconazol e 1,0 µg/mL de terbinafina (58,59).

Uma vez que estavam sendo avaliadas concentrações reduzidas de antifúngicos, o tempo de experimento BCT foi alterado para 2h e 30 minutos. Assim os 15 minutos iniciais foram considerados como controle de crescimento (período de pré-exposição) e 135 minutos com a presença do antifúngico (período de exposição) (figura 21). Com a realização do teste, a taxa de inibição do crescimento das hifas do isolado em estudo frente a combinação de terbinafina e itraconazol foi de 49,3 %.

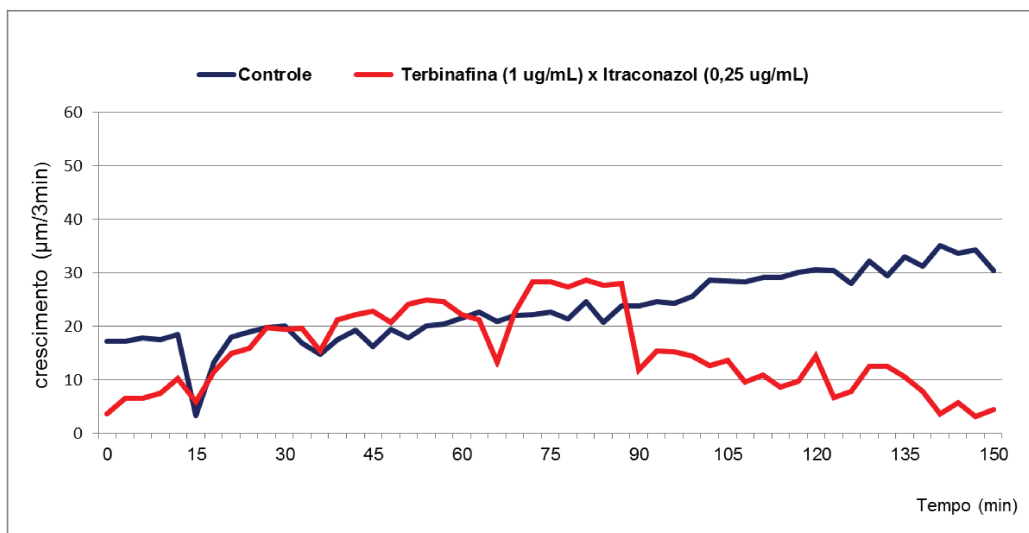


Figura 21. Acompanhamento de crescimento do isolado *Rhizopus oryzae* (LIF 1832) frente a combinação de itraconazol na concentração de 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e terbinafina na concentração de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

5. DISCUSSÃO

5.1. Identificação dos isolados de *Mucorales*

O diagnóstico precoce da mucormicose continua sendo um desafio e é uma necessidade ainda não satisfatoriamente atendida, sendo de grande impacto no sucesso do tratamento. O diagnóstico a partir de biópsia de tecidos continua a ser o padrão-ouro, embora para alguns pacientes isto não seja viável, devido a trombocitopenia ou instabilidade hemodinâmica. Além do mais, erros de amostragem e dificuldades ocasionais na diferenciação de *Mucorales* em amostras de tecido podem resultar em resultados falso-negativos ou falso-positivos. Alguns artigos mostram também que novas ferramentas moleculares para identificação de *Mucorales* em tecidos estão cada vez mais disponíveis (62-66).

Nos experimentos iniciais para identificação molecular dos isolados em estudo, foram utilizados os *primers* ITS1 e ITS4 e através da amplificação do DNA fúngico diretamente das culturas, a identificação molecular foi realizada com sucesso para os isolados: *Rhizopus oryzae* (LIF 1046, 1143, 1455, 1820, 1237) e 1832), não sendo possível a identificação molecular dos isolados de *Cunninghamella bertholletiae* (LIF 299, 300 e 301) e *Syncephalastrum* sp. (LIF 1834), devido a impossibilidade de amplificação do DNA fúngico. Sendo assim, foi necessário alterar os pares de primers sendo utilizado os pares de *primers* ITS4 e ITS5, com os quais foi possível identificar os isolados de *Rhizopus oryzae* (LIF 1046, 1143, 1237, 1455, 1832) e *Syncephalastrum racemosum* LIF (1834), não sendo possível novamente a identificação dos isolados de *Cunninghamella bertholletiae* (LIF 299, 300 e 301) e com estes primers não foi possível identificar também o isolado de *Rhizopus* sp. (LIF 1820). A escolha deste *primers* inicialmente foi devido ao fato da maioria dos artigos na literatura disponíveis utilizarem regiões ITS para identificação de *Mucorales* (30, 35,61).

Para os isolados que não foi possível a identificação tanto com a utilização dos *primers* ITS1/ITS4 quanto os *primers* ITS4/ITS5, a opção foi a utilização dos

iniciadores NL1/NL4 que permitem o seqüenciamento da região D1/D2 constituinte do DNA ribossomal 28S, o que também possibilitou a identificação de todos os isolados em estudo conforme tabela 3 que mostra a similaridade dos resultados entre os bancos de dados disponíveis. (Muraosa *et al.*, Medical Mycology Research Center Universidade de Chiba, Comunicação Pessoal). Neste trabalho foram utilizados os seguintes bancos de dados: *Biolomics* (www.cbs.knaw.nl) e *ISHAM* (www.mycology.lab.org) para aumentar as possibilidades de comparação dos resultados.

Além da realização da PCR a partir do DNA extraído de culturas, foi verificada também a possibilidade de amplificação do material genético diretamente das culturas fúngicas utilizando para isto DNA Polimerase *MigthyAmp* e os iniciadores NL1/NL4, o que permitiu uma maior agilidade na obtenção dos resultados, além de redução nos custos, sendo a identificação obtida com sucesso para todos os isolados. A enzima *MigthyAmp DNA Polymerase* (Takara Bio, Japão), possibilita uma maior rapidez e eficiência nas reações de ligação para amplificação do material genético (55,56).

Não houve concordância entre a identificação morfológica e molecular para os isolados LIF 1237 e 1832, classificados morfológicamente como *Absidia* (*Lichtheimia*) sp. e *Rhizomucor* sp. e ambos como *Rhizopus oryzae* por sequenciamento. Da mesma forma, o isolado LIF 1820 foi classificado por sequenciamento como *Rhizopus stolonifer*.

Isto pode ser decorrente das limitações da identificação morfológica desta classe de fungos filamentosos, já que é uma técnica demorada, há necessidade de profissionais experientes, é dependente de condições de crescimento do micro-organismo já que a observação macroscópica e microscópica das estruturas muitas vezes não corresponde às descrições disponíveis em manuais de identificação e a presença de variações das características dentro de uma mesma espécie devido tanto ao ambiente, como também a subjetividade do observador. Poucos artigos relatam a identificação de *Mucorales* através da utilização dos iniciadores NL1/NL4 e mostram que os bancos de dados disponíveis geralmente

não são suficientes para identificação de algumas espécies relacionadas a alguns gêneros, como *Mucor*, *Rhizopus* e *Cunninghamella* (35).

Técnicas moleculares mostram um enorme potencial para identificar com rapidez e precisão, porém, ensaios de detecção moleculares para os *Mucorales* não são ainda amplamente disponíveis. Um conjunto de dados com base em sequências 18S e 28S do rRNA de 42 isolados de *Mucorales* sequenciados, foi construído mostrando que o sequenciamento da região ITS é um método confiável para a identificação precisa da maioria dos *Mucorales* até espécie e que as sequências 18S foram altamente conservadas, mas as sequências 28S foram mais variáveis entre as espécies (35). Em nosso trabalho, os resultados da identificação molecular utilizando a região ITS não foram concordantes para os isolados de *Cunninghamella bertholletiae* cuja amplificação só foi possível com a utilização da região 28S.

Para a identificação de *Mucorales*, a região ITS tem sido proposta como um alvo valioso para identificação do gênero e, geralmente, ao nível de espécie, no entanto, a região D1/D2 do 28S é capaz de fornecer uma resolução melhor quando se objetiva a identificação de espécies (62).

Como em nosso trabalho, alguns artigos na literatura relatam também casos de divergências entre a identificação morfológica e molecular em que os isolados geralmente em discordância são também finalmente classificados como *Rhizopus oryzae*, sendo considerada identificação morfológica de gênero também frequentemente imprecisa (62-65).

Estudo com 20 isolados de *Mucorales* usando o sistema automatizado rep – PCR e sequências ITS como ferramentas moleculares de identificação encontrou 100 % de concordância entre estas duas metodologias. No entanto, apresentou somente 74% de concordância com a identificação baseada na morfologia, sendo que os isolados com resultados discordantes foram identificadas como *Rhizopus* sp. pelos métodos moleculares (62).

Por meio do sequenciamento das regiões ITS1 e ITS 2 KONTOYIANNIS *et al.*, (65) determinaram o gênero de 19 isolados de *Mucorales* e compararam os

resultados obtidos com a identificação morfológica. A taxa de concordância foi de 79% entre os resultados baseados em métodos morfológicos e moleculares. Dos quatro isolados identificados incorretamente pela morfologia, três eram do gênero *Rhizopus*.

Estudo realizado com 190 isolados clínicos de *Mucorales* utilizando os *primers* ITS4 e ITS5, com análise filogenética realizada com o programa MEGA 4.0 e a identificação final com o banco de dados Basic Local Alignment Tool (BLAST), evidenciou que os agentes mais prevalentes de mucormicose foram *Rhizopus oryzae* e *Rhizopus microsporus* e que a correlação entre morfologia e métodos moleculares na identificação de espécies foi de 92,6% e de gênero de 100% (30), sendo que em nosso trabalho a correlação entre morfologia e identificação molecular tanto a nível de espécie e de gênero foi de 80%, sendo os isolados com resultados discordantes classificados como *Rhizopus oryzae*.

Muitos laboratórios não identificam além de gênero, sendo a espécie frequentemente omitida também na literatura médica, especialmente quando as observações não correspondem às descrições ou ilustrações disponíveis. A identificação de *Mucorales* continua a ser uma tarefa difícil e demorada. No entanto, características morfológicas observadas por profissionais experientes podem fornecer um alto nível de precisão. Este conhecimento, associado às técnicas moleculares podem ser ferramentas úteis na identificação de espécies de *Mucorales* de importância clínica, assim como para a delimitação de espécies ainda não descritas. Embora a identificação molecular de *Mucorales* utilizando regiões ITS venha sendo usada, frequentemente com sucesso, nos últimos anos, os bancos de sequências, como BLAST, ainda representa uma limitação pelo número reduzido e imprecisão de algumas sequências depositadas (29,30).

Apesar das técnicas moleculares serem mais rápidas e mais confiáveis do que a identificação micológica padrão, mais estudos são necessários na busca de uma melhor padronização das técnicas e melhoria da sensibilidade (62-66).

5.2. Testes de suscetibilidade

5.2.1. Avaliação da suscetibilidade aos antifúngicos isolados *in vitro* pelo método de microdiluição em caldo (CLSI, M38-A2)

A concentração do inóculo recomendada pelo CLSI para fungos filamentosos é $0,4 \times 10^4$ a 5×10^4 UFC/ml. Neste trabalho verificamos que para os isolados de *Mucorales* em estudo, a concentração de inóculo ideal foi de 4×10^4 UFC/ml, já que concentrações mais baixas ou mais altas conduziam a dificuldades de interpretação dos resultados.

As placas de microdiluição foram incubadas a 37°C e as leituras das CIMs foi realizada após 24 horas de incubação. A placa do teste de suscetibilidade do isolado LIF 1820 (*R. stolonifer*) foi incubada à temperatura ambiente, pois não houve crescimento em temperaturas mais elevadas, conforme já informado.

Os resultados dos testes de CIM dos antifúngicos frente aos isolados deste estudo mostraram que os antifúngicos mais ativos contra a maioria dos isolados foram anfotericina B e itraconazol. Os isolados *C.bertholletiae* e *Syncephalastrum racemosum* foram mais sensíveis a concentrações mais baixas de terbinafina do que *Rhizopus oryzae* e *Rhizopus stolonifer*. Todos os isolados foram altamente resistentes a micafungina, 5-fluorocitosina, fluconazol e voriconazol. Observou-se também uma melhor nitidez na leitura realizada com 48 horas de incubação tanto para itraconazol quanto para voriconazol. Verificou também que os isolados pertencentes ao gênero *Rhizopus* sp. foram menos sensíveis ao itraconazol em relação aos outros isolados avaliados. Através dos resultados observa-se que além da anfotericina B, outros antifúngicos possuem atividade *in vitro* contra *Mucorales* e dependendo da espécie e gênero tem perfis diferentes de suscetibilidade.

Embora os baixos valores de CIM obtidos frente a miconazol apresentados na tabela parecerem promissores, este não tem sido muito utilizado para o tratamento de mucormicose e infecções sistêmicas por fungos filamentosos devido

à sua toxicidade e farmacocinética, sendo indicado somente para uso tópico nos casos de dermatofitoses, malassezioses e candidíases mucocutâneas (67-71).

Apesar de níveis sanguíneos relativamente baixos e de curta duração de miconazol em exsudato do espaço retroperitoneal pélvico, estudo realizado por Mikamo *et al.*, (69) demonstrou sua eficácia clínica na candidíase sistêmica, com a utilização de uma ou mais infusões intravenosas diárias de miconazol, desempenhando um papel importante no tratamento.

Trabalho publicado por Taguchi *et al.*, (72) utilizando o sistema automatizado BCT avaliou a atividade *in vitro* de miconazol contido no soro humano do mesmo paciente em que foi injetado miconazol na concentração de 600 mg /dia durante 2 dias sobre hifas de *Aspergillus fumigatus*. As concentrações de miconazol obtidas no soro foram de 8,8; 3,5 e 1,6 µg/mL. O soro contendo 8,8 µg/mL de miconazol inibiu o crescimento de hifas após 90 minutos de avaliação dinâmica de crescimento e o soro contendo 3,5 µg/mL após 100 minutos de avaliação dinâmica de crescimento enquanto que no soro contendo 1,6 µg/mL não houve inibição de crescimento.

De acordo com Ribes (73) a mucormicose permanece como uma infecção de difícil tratamento sendo associada com uma alta taxa de mortalidade. Anfotericina B não é efetiva em todos os casos de mucormicose principalmente se o paciente apresentar no decorrer da doença uma infecção disseminada. Sua atividade terapêutica é limitada devido aos severos efeitos colaterais, sendo que a função renal comprometida frequentemente conduz à interrupção da terapia.

Estudo realizado por JONHSON *et al.*, (74), com alguns isolados de *Mucorales* mostrou que estes também foram resistentes a 5-fluorocitosina e fluconazol o que está de acordo com os resultados encontrados em nosso trabalho. Além do mais, foi observado um aumento entre as CIMs dos antifúngicos após 24 horas de incubação, com exceção de anfotericina B que não apresentou muita diferença. Altas CIMs de voriconazol foram encontradas para todos os isolados.

Apesar de não haver indicação do uso de azólicos no tratamento de mucormicose e os estudos do uso de antifúngicos azólicos no tratamento de mucormicose serem escassos, tem se verificado que os compostos azólicos sozinhos ou em combinação tem efeitos benéficos em modelos de animais infectados por *Rhizopus* sp. e podem apresentar uma alternativa ao tratamento (75-78).

Estudos realizados por Dannaoui *et al.*, (17,79) relatam diferenças nos perfis de suscetibilidade *in vitro* entre gêneros e espécies de *Mucorales* frente a diferentes antifúngicos, evidenciando que o tratamento médico adequado muitas vezes requer uma identificação específica do agente patogênico. A identificação precisa de espécies de *Mucorales* poderia também ter grande importância para pesquisas sobre a eficácia do antifúngico. Além disso, os resultados mostraram, por exemplo, que *Rhizopus* sp. foram menos susceptíveis a itraconazol, posaconazol, terbinafina e anfotericina B do que *Absidia* sp que foi menos susceptível do que *Mucor* sp a anfotericina B (80).

Algumas mudanças no manejo da mucormicose em pacientes com câncer hematológico com alto risco para esta infecção pode aumentar ou diminuir a incidência de mucormicose nesta população. Recentemente os pesquisadores descobriram que a sobrecarga de ferro preexistente é um preditor de pior prognóstico com aumento de infecções bacterianas e fúngicas principalmente mucormicose em pacientes com doenças hematológicas malignas ou transplantados. Alguns trabalhos relatam a administração de deferasirox, um quelante de ferro, no início de um câncer hematológico, já que este indiretamente atua contra o desenvolvimento de *Mucorales*. O deferasirox utilizado para o tratamento de sobrecarga de ferro em pacientes com doenças hematológicas malignas poderia, teoricamente, diminuir a ocorrência de mucormicose (10, 65,81-83).

A realização dos testes de suscetibilidade aos antifúngicos *in vitro* é importante para padronização de algumas etapas da metodologia, como o tempo de crescimento fúngico, temperatura de incubação, preparo do inóculo, diluição

dos antifúngicos e preparo do meio de cultura visto que dependendo do micro-organismo avaliado é necessário alterar as condições do teste.

Embora estudos de correlação clínico laboratorial frente aos testes de suscetibilidade realizados para leveduras (CLSI M27 S4) (82) estejam caminhando para a determinação de pontos de corte para estes testes, ainda não há nada definido para fungos filamentosos. Documentos do CLSI e EUCAST relatam apenas alguns pontos de corte epidemiológicos para algumas espécies de *Aspergillus* (83). Estudos com quantidade significativa de isolados e acompanhamento clínico de pacientes com infecções por fungos filamentosos, especialmente as sistêmicas, esbarram em grande número de dificuldades e ainda são muito limitados.

5.2.2. Avaliação da Concentração Inibitória Fracional (CIF) dos isolados de *Mucorales* através da metodologia do "tabuleiro de xadrez" frente a anfotericina B x itraconazol; anfotericina B x voriconazol; terbinafina x itraconazol; terbinafina x voriconazol e terbinafina x anfotericina B

Através dos resultados obtidos observou-se 100% de sinergismo nas interações entre anfotericina B x itraconazol e anfotericina B x voriconazol quando se faz a leitura considerando valores de 100 % de inibição de crescimento visível tanto para itraconazol quanto para voriconazol. Sinergismo de 80% e 20% de indiferença foram observados quando considerados valores correspondentes a 50% de inibição do crescimento visível para os dois antifúngicos. O documento do CLSI (M38 A2) preconiza leituras de 100% de inibição de crescimento, mas considera os testes realizados com antifúngicos isolados. De acordo com os resultados, verifica-se uma diminuição da concentração inibitória mínima obtida tanto para anfotericina, itraconazol e voriconazol quando os antifúngicos são associados.

No caso da combinação entre terbinafina x itraconazol, observou-se que quando se faz a leitura considerando valores de 100 % de inibição de crescimento visível para itraconazol as interações resultantes foram 90% de sinergismo e 10% de indiferença. Sinergismo de 70% e 30% de indiferença foram observados quando considerados valores correspondentes a 50% de inibição do crescimento visível para itraconazol. Importante destacar que no caso da terbinafina o ideal é fazer a combinação de antifúngicos, principalmente no caso dos isolados de *Rhizopus oryzae* e *Rhizopus stolonifer*, uma vez que na microdiluição *in vitro* para este antifúngico avaliado individualmente estes isolados são altamente resistentes. Esta combinação foi utilizada no tratamento de um paciente com mucormicose rino-orbita-cerebral em nossa instituição que obteve desfecho clínico favorável conforme demonstrado no anexo 2, evidenciando que se fossem considerados apenas os testes de microdiluição utilizando a CIM frente a terbinafina individualmente, o paciente poderia não iniciar o tratamento com terbinafina associada a itraconazol o que poderia conduzir a mau prognóstico.

Os resultados evidenciam o fato da combinação de terbinafina e itraconazol poder ser utilizada no tratamento de mucormicose devido ao tipo de interação resultante e desfecho clínico favorável, sendo importante destacar que tanto anfotericina B, terbinafina e itraconazol podem ter contribuído para o tratamento (anexo 2).

As interações resultantes da combinação de terbinafina x voriconazol considerando valores de 100 % de inibição de crescimento visível para voriconazol foram de 80% de sinergismo e 20% de indiferença. Sinergismo de 50% e 50% de indiferença foram observados quando considerados valores correspondentes a 50% de inibição do crescimento visível para voriconazol. Estes resultados mostram que terbinafina combinada também com voriconazol poderia ser uma alternativa ao tratamento de mucormicose, apesar dos *Mucorales* serem mais resistentes a voriconazol individualmente em comparação com o itraconazol.

Para a combinação de terbinafina x anfotericina B houve 100% de sinergismo, demonstrando que esta associação poderia também ser útil em

pacientes, diminuindo os efeitos colaterais principalmente de anfotericina B que poderia ser utilizada em dosagens muito mais baixas do que quando avaliada individualmente.

Estudo realizado por Dannaoui *et al.*, (17) mostrou também que as combinações de antifúngicos como, por exemplo, anfotericina B x terbinafina e anfotericina B x voriconazol apresentaram sinergismo *in vitro* contra *Mucorales*. Apesar de ser indicada primeiramente no tratamento de micoses superficiais, a combinação de terbinafina com anfotericina B tem sido aplicada com sucesso no tratamento de mucormicose. Suas aplicações estão sendo estendidas, uma vez que alguns trabalhos relatam valores baixos de CIMs contra isolados de *Mucorales* (18,19).

Embora as equinocandinas não demonstrem atividade *in vitro* contra *Mucorales* em testes de sensibilidade padrão, durante a mucormicose disseminada em ratos com cetoacidose diabética, a combinação de complexo lipídico de anfotericina e caspofungina sinergicamente melhora a sobrevida em comparação com a monoterapia. Estudo realizado mostrou que a terapia combinada com anfotericina B lipossomal com micafungina ou anidulofungina também aumentou significativamente a sobrevivência de camundongos neutropênicos com mucormicose disseminada (10, 20,21).

De acordo com Spellberg *et al.*, (22), a alta taxa de mortalidade de mucormicose com monoterapia atualmente disponível, particularmente em pacientes hematológicos, tem estimulado o interesse no estudo de novas combinações de agentes antifúngicos no intuito de obter resultados melhores em relação à monoterapia. Recentemente, a terapia por combinação de polienicos lipídicos e equinocandinas é a mais promissora. Outras opções incluem a combinação de poliênicos lipídicos com deferasirox ou posaconazol. É importante a realização dos ensaios clínicos para determinar se os resultados destas infecções devastadoras podem ser melhorados com novas combinações. É fundamental a realização de ensaios controlados para comparar a eficácia da terapia combinada com a de monoterapia. A ausência e as falhas destes estudos

levam a questionamentos sobre quais estratégias são mais eficazes e menos tóxicas para esta infecção mortal. Estas abordagens como, por exemplo, anfotericina B lipossomal combinada com fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos mostrou ser eficaz em modelos animais de mucormicose invasiva. No entanto, estas abordagens ainda não estão desenvolvidas como novas combinações de agentes antifúngicos, sendo necessários mais estudos antes de serem priorizadas para investigação clínica em larga escala.

Combinações de terbinafina ou caspofungina com anfotericina B, posaconazol ou itraconazol foram estudadas *in vitro* como potenciais tratamentos contra 18 isolados de *Mucorales* (*Mucor irregularis*). Sinergismo foi observado para as combinações de terbinafina com anfotericina B, posaconazol, e itraconazol contra os isolados em estudo e para as combinações de caspofungina com anfotericina B, posaconazol, e itraconazol não sendo observado antagonismo (23).

Neste estudo não foi avaliada a combinação de anfotericina B com equinocandinas devido à indisponibilidade desta classe de antifúngicos na forma de sal na instituição até a finalização destes resultados.

A combinação de antifúngicos é frequentemente usada para infecções fúngicas de difícil tratamento e poderia ser uma estratégia útil para o tratamento de mucormicose, já que resulta em redução de toxicidade de dosagens individuais e pode contribuir com a eficácia do tratamento, dependendo do tipo de interação resultante entre os antifúngicos avaliados.

A realização da metodologia do "tabuleiro de xadrez" permite a combinação de dois antifúngicos em concentrações diferentes de maneira que tanto a maior quanto a menor concentração de um agente antifúngico combina com as respectivas concentrações de outro antifúngico a ser testado, sendo importante para guiar o tratamento da mucormicose, associada com os testes de suscetibilidade aos antifúngicos isolados *in vitro*.

5.2.3. Avaliação da suscetibilidade a antifúngicos pela técnica de avaliação dinâmica de crescimento através do sistema automatizado Biocell - Tracer®

Existem poucos relatos sobre a avaliação dinâmica do crescimento fúngico e sua taxa de inibição de crescimento em contato com agentes antifúngicos (41-53) e não há relatos sobre estes testes para agentes causais de Mucoromycosis. Alguns estudos com outros fungos filamentosos mostraram que hifas podem responder bem, com altas taxas de inibição de crescimento, a menores concentrações de antifúngicos do que os conídios, sendo possível talvez estabelecer uma melhor correlação com a evolução clínica, uma vez que as hifas são as estruturas fúngicas presentes no tecido infectado.

Conforme a tabela 9, para a padronização do inóculo para avaliação dinâmica de crescimento foram avaliados vários parâmetros, tais como: meio para indução de esporulação; tempo de crescimento prévio da cultura fúngica, concentração ideal de Poli-L-Lisina, concentração e quantidade do inóculo; tempo e temperatura de incubação prévia com o meio de cultura RPMI; temperatura de execução do teste; intervalos de leitura e duração do teste.

A observação de crescimento em tempo real de *Rhizopus oryzae* (LIF 1832) neste trabalho, revelou um comportamento de crescimento completamente diferente do relatado até o momento para *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. (49,50), dermatófitos (51) e fungos demáceos (53). *R. oryzae* apresenta, em média, crescimento de 9 $\mu\text{m}/3\text{min}$ enquanto o crescimento de dermatófitos variou entre 0,35 e 2,02 $\mu\text{m}/10\text{min}$; *Aspergillus* entre 1,63 e 8,71 $\mu\text{m}/10\text{min}$; *Fusarium* sp. entre 1,0 e 6,5 $\mu\text{m}/5\text{min}$ e fungos demáceos entre 0,5 e 3,5 $\mu\text{m}/10\text{min}$.

De acordo com estudos anteriores, o tempo de experimento no BCT para *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., dermatófitos e fungos demáceos foi de 210 minutos, assim distribuídos: os primeiros 30 minutos (período de pré – exposição ou controle interno do teste) e 120 minutos na presença de antifúngico (período de exposição) e 30 minutos finais após a retirada do agente antifúngico em teste (período de pós-exposição)(49-51).

Para *Rhizopus oryzae* (LIF 1832) foi necessário reduzir o período de pré-exposição para 15 minutos seguidos de 60 minutos período de exposição (tabela 9). Este padrão pode ser utilizado para a avaliação da inibição do crescimento dinâmico frente às CIMs de AMB e TERB obtidas para conídios conforme figuras 15 e 16. Assim, apesar da CIM de TERB obtida pelo método de microdiluição em caldo ter sido $> 128 \mu\text{g/mL}$ (IC80), a taxa de inibição de crescimento avaliada com $128 \mu\text{g/mL}$ foi de 98,70%, indicando que as hifas podem responder a concentrações mais baixas do que os esporos. Para anfotericina B a taxa de inibição para CIM $0,25 \mu\text{g/mL}$ obtida pelo método de microdiluição em caldo (IC100) foi de 88.25% e não houve inibição do crescimento de hifas frente à CIM $1,0 \mu\text{g/mL}$ de ITC sozinho.

De maneira controversa, resultados do teste microdiluição em caldo para determinação de CIMs utilizando esporos mostraram alta sensibilidade do isolado de *Rhizopus oryzae* (LIF 1832) frente a AMB e ITC em comparação com TERB. Assim como o teste de combinação entre TERB e ITC mostrou sinergismo (CIF=0.3), foi avaliado crescimento dinâmico de hifas de *Rhizopus oryzae* (LIF 1832) frente a combinação de terbinafina x itraconazol.

Alguns artigos relatam que compostos azólicos isoladamente ou em combinação podem ter efeitos benéficos em modelos animais infectados por *Rhizopus* sp.. e podem fornecer alternativas de tratamento para mucoromycosis [74-76].

De acordo com os registros do paciente, ele recebeu itraconazol 300 mg/dia e terbinafina 250 mg/dia, que deveriam resultar em concentrações séricas médias de 0.35 e $1,0 \mu\text{g/mL}$ respectivamente e que juntamente com anfotericina B permitiram o desfecho clínico favorável (anexo 2).

Para tentar mimetizar *in vitro* o sucesso terapêutico obtido *in vivo* as concentrações séricas médias de itraconazol e terbinafina foram combinadas em um mesmo experimento no BCT com tempo diferente de experimento em relação a avaliação dinâmica de crescimento para CIMs de anfotericina B e terbinafina. Por se tratar de concentrações extremamente baixas, foi necessário estender o

período de exposição (previamente padronizado em 75 minutos) (figura 21). Foi possível observar atividade de inibição do crescimento fúngico apenas a partir de 90 minutos de experimento. A taxa de inibição obtida ao final de 150 minutos de exposição foi de 49,3% que, embora sendo menor do que o esperado (trabalhos anteriores descartam taxas de inibição abaixo de 50%) (47-53,86-89), ainda deve representar um bom resultado devido ao desfecho clínico favorável do paciente em tratamento.

Neste caso, a avaliação da inibição do crescimento, em tempo real, das combinações das concentrações séricas de ITC e TERB diretamente sobre as hifas do agente causal demonstraram correlação adequada com o resultado clínico, indicando que talvez somente a avaliação destas concentrações seja necessária para determinar a suscetibilidade do micro-organismo em questão. Se apenas os resultados dos testes de sensibilidade realizados com esporos para determinação de CIMs de antifúngicos isolados pela metodologia de microdiluição em caldo tivessem sido considerados na indicação da terapêutica, provavelmente este paciente não teria recebido TERB, já que a CIM para este antifúngico foi > 128 µg/mL (IC80).

Não foi possível atribuir a um antifúngico em particular todo o mérito do sucesso terapêutico. No entanto, é possível inferir que mesmo a taxa de inibição de crescimento de hifas abaixo de 50% para a combinação das concentrações séricas de ITC e TERB pode ter contribuído para o favorável desfecho clínico.

A determinação da porcentagem de taxa de inibição no BCT atualmente não é padronizada no sentido de prever se o micro-organismo em teste será sensível ou não, o fato é que trabalhos na literatura sugerem que as hifas respondem a concentrações mais baixas do que os esporos utilizados na metodologia de microdiluição em caldo (47-53,86-89).

A avaliação da inibição do crescimento de hifas é uma metodologia capaz de mimetizar uma situação semelhante a que acontece nos tecidos de pacientes infectados sendo de grande importância para prever o potencial terapêutico de um determinado agente antifúngico.

Estudos de acompanhamento do paciente com a realização dos testes de suscetibilidade por diferentes metodologias seriam o modo ideal de estabelecer a real correlação entre estes e o desfecho clínico. No entanto, são raras as vezes em que isto é possível.

Cada vez mais, estudos de testes de suscetibilidade correlacionando desfecho clínico estão sendo encorajados. Os avanços em relação aos patógenos leveduriformes já podem ser vistos nos manuais do CLSI. Para os fungos filamentosos, estruturas complexas e multifacetadas, ainda há muito que estudar.

Os dados deste trabalho sugerem que a forma de hifa é mais suscetível que a forma de esporos frente aos antifúngicos avaliados, sendo a avaliação de crescimento dinâmico uma metodologia com grande potencial preditivo para orientação terapêutica em casos de mucormicose.

6. CONCLUSÕES

- Os isolados foram identificados por técnicas morfológicas e moleculares, obtendo divergência em apenas dois isolados: LIF 1237 e 1832, classificados morfológicamente como *Absidia (Lichtheimia)* sp. e *Rhizomucor* sp. e ambos como *Rhizopus oryzae* por sequenciamento.
- Foi feita a padronização dos testes de suscetibilidade tanto para antifúngicos isolados quanto em combinação, com a necessidade de novas padronizações para outras espécies. Para os isolados de *Mucorales* que não *Rhizopus* spp., as condições ideais para a realização dos testes de suscetibilidade pela técnica de microdiluição em caldo foram: incubação prévia de 2 a 3 dias a 35°C, inóculo de 4×10^4 UFC/mL e leitura após 24 horas de incubação a 35°C. Para o isolado LIF 1820 (*R. stolonifer*) o teste deve ser realizado à temperatura ambiente; AMB e ITC foram os antifúngicos mais ativos, enquanto MCF, 5FC e FCZ os menos ativos; houve diferença de suscetibilidade aos antifúngicos entre as espécies;
- Os testes de suscetibilidade aos antifúngicos combinados mostraram diminuição da CIM obtida para AMB, ITC, VOR e TERB quando os antifúngicos são associados. CIMs altas de TERB foram observadas para os isolados de *Rhizopus oryzae* e *Rhizopus stolonifer*, em contradição aos resultados obtidos no teste desse antifúngico isolado, ressaltando a importância da combinação de antifúngicos no manejo de mucormicose;

- Foi padronizada as condições da avaliação de dinâmica de crescimento para *Mucorales* do gênero *Rhizopus* sp., sendo diferente de trabalhos disponíveis na literatura. Para CIMs de AMB e TERB as seguintes condições padronizadas foram: poli-L-Lisina (PLL) na concentração de 0,02% (w/v); 1 µL do inóculo de 10⁵ esporos/mL; tempo de crescimento prévio de 3 a 4 dias a 28° C em ágar batata dextrose; a 35°C de 16 a 24h; 35°C para execução do teste; tempo total de experimento de 76 minutos; com intervalos de leitura a cada 3 min. Para a avaliação dinâmica de crescimento para a combinação dos antifúngicos TER e ITC o tempo total de experimento foi de 150 minutos.
- Não foi possível atribuir a um antifúngico em particular todo o mérito do sucesso terapêutico obtido pelo paciente em tratamento de mucormicose decorrente do isolado *R. oryzae* (LIF 1832).

7. REFERÊNCIAS

1. Kwon-Chung KJ. Taxonomy of Fungi causing Mucormycosis and Entomophthoromycosis (Zygomycosis) and nomenclature of the disease: Molecular Mycologic Perspectives. *Clinical Infectious Diseases* 2012; 54(S1):S8-15.
2. Ainsworth GC. Introduction and keys to higher taxa. In: Ainsworth GC, Sparrow FK, Sussman AS, eds. *The fungi. IVA. A taxonomic review with keys*. New York: Academic Press, 1973:1-7.
3. Whittaker RH. New concepts of kingdoms of organisms. Evolutionary relations are better represented by new classifications than by the traditional two kingdoms. *Science* 1969; 163:150-60.
4. Schussler A, Schwarzott D, Walker C. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycol Res* 2001; 105:1413-21.
5. Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol Res* 2007; 111:509-47.
6. Kian JL, Njo-Injo TE, Pohan A, Muelen VH, Emmons CW. *Basidiobolus ranarum* as a cause of subcutaneous phycomycosis in Indonesia. *AMA Arch Dermatol* 1956; 74:378-83.
7. Clark BM. The epidemiology of phycomycosis. In: Wolstenholme GEW, Porter R, eds. *Systemic mycoses*. London: J & A Churchill, 1968:179-205.
8. Ajello L, Dean DF, Irwin RS. The zygomycete *Saksenaea vasiforme* as a pathogen of humans with a critical review of the etiology of zygomycosis. *Mycologia* 1976; 68: 52-62.
9. Hoffmann K, Discher S, Voigt K. Revision of the genus *Absidia* (Mucorales, Zygomycetes) based on physiological, phylogenetic, and morphological characters: thermotolerant *Absidia* spp. form a coherent group, *Mycocladiaceae* fam. nov. *Mycol Res* 2007; 111:1169-83.

10. Ibrahim A, Spelberg B, Edwards J. Iron Acquisition: A Novel Prospective on Mucormycosis Pathogenesis and Treatment. *Nacional Institute of Health*. 2008; 21(6): 620-625.
11. Sens YAS, Martini D, Watanabe L, Gadelha CP, Souza JF, Jabur P. Relato de caso: mucormicose em rim transplantado. *Jornal Brasileiro de Nefrologia* 2002; 24 (3): 153-6.
12. Chamilos G, Lewis RE, Lianchun JH, Xiao L, Zal T, Gilliet M, Halder G, Kontoyiannis P. *Drosophila melanogaster* as a model host to dissect the immunopathogenesis of zygomycosis. *PNAS*. 2008; 105 (27) : 9367- 9372.
13. Coraçari AR, Alves AT, Brasil RG, Fernandes AM, Maníglia JV. Mucormicose Rino-órbito-cerebral: Relato de Caso e Revisão de Literatura. *Arquivos Internacionais de Otorrinolarinologia*. 2003; 7(2):160-165.
14. Rogers TR, Treatment of zygomycosis: current and new options. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2008; 61: 35-39.
15. Perkhofer S, Lechner V, Lass-Flörl C. In Vitro Activity of Isavuconazole against *Aspergillus* Species and Zygomycetes According to the Methodology of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2009; 53 (4): 1645-1647.
16. Lass- Flörl C, Mayr A, Perkhofer S, Hinterberger G, Haudorfer J, Speth C, Fille M. Activities of Antifungal Agents against Yeasts and Filamentous Fungi: Assessment according to the Methodology of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2008; 52 (10): 3637-3641.
17. Dannaoui E, Afeltra J, Meis JFGM, Verweij PE. In Vitro susceptibilities of Zygomycetes to Combinations of Antimicrobial Agents. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2002; 46 (8): 2708-2711.
18. Foss NT, Rocha MR, Lima VT, Velludo MA, Roselino AM. Entomophthoromycosis: therapeutic success by using amphotericin B and terbinafine. *Dermatology*. 1996; 193: 258-260.

19. Jessup CJ, Ryder NS, Ghannoum MA. An evaluation of the in vitro activity of terbinafine. *Med. Mycol.* 2000. 38:155-159
20. Ibrahim AS, Bowman JC, Avanessian V, et al. Caspofungin inhibits *Rhizopus oryzae* 1,3-beta-D-glucan synthase, lowers burden in brain measured by quantitative PCR, and improves survival at a low but not a high dose during murine disseminated zygomycosis. *Antimicrob Agents Chemotherapy* 2005; 49:721-7.
21. Spellberg B, Fu Y, Edwards JE Jr, Ibrahim AS. Combination therapy with amphotericin B lipid complex and caspofungin acetate of disseminated zygomycosis in diabetic ketoacidotic mice. *Antimicrob Agents Chemotherapy* 2005; 49:830-2.
22. Spellberg B, Ibrahim A, Roilides E. et al. Combination Therapy for Mucormycosis: Why, What, and How? *Clinical Infectious Diseases* 2012;54(S1):S73-78.
23. Zhang S, Li R, Yu J. Drug Combinations against *Mucor irregularis* In Vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2013;57(7):3395-97.
24. Ogawa T, Takezawa k, Tojima I. et al. Successful treatment of rhino-orbital mucormycosis by a new combination therapy with liposomal amphotericin B and micafungin. *Clinical Infectious Diseases* 2012;54(S1):S79-85.
25. Sidrim JJC, Moreira JLB. *Fundamentos Clínicos e Laboratoriais da Micologia Médica*. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, 287 p.
26. Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vacari EM, Melo NT. *Tratado de Micologia Médica* Lacaz. 9ª ed., São Paulo: Sarvier, 2002. 1104p.
27. Larone DH. *Medically important fungi: a guide for identification*. 4. ed. Washington: ASM Press, 2002.
28. Wengenack NL, Binnicker MJ. Fungal Molecular Diagnostics. *Clin Chest Med* 2009; 30: 391- 408.
29. Scholer HJ, Muller E, Schipper MAA. Mucorales, In: D. H. Howard (ed.), *Fungi pathogenic for humans and animals, part A. Biology*. Marcel Dekker, New York. 1983, p.9-59.

30. Bankowski MJ, Anderson SM. Real-time nucleic acid amplification in clinical microbiology. Clin Microbiol Newsl 2004; 26 (2):9-15.
31. Alvarez E, Sutton DA, Cano J et al. Spectrum of zygomycete species identified in clinically significant specimens in the United States. Journal of Clinical Microbiology. 2009; 47 (6):1650-1656.
32. Almyroudis N, Sutton D, Fothergill A, Rinaldi M, Kusne S. 2007. In vitro susceptibilities of 217 clinical isolates of Zygomycetes to conventional and new antifungal agents. Antimicrob. Agents Chemother. 51: 2587-2590.
33. Schorödl W, Heydel T, Schwartz VU. et al. Direct analysis and identification of pathogenic *Lichtheimia* species by Matrix-Assisted laser desorption ionization- time of flight analyzer-mediated mass spectrometry. Journal of Clinical Microbiology. 2012; 50 (2): 419-427.
34. O'Donnell K, Kistler HC, Cigelnik E, et al. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95(5):2044-9.
35. Voigt, K., E. Cigelnik, & K. O'Donnell. Phylogeny and PCR identification of clinically important zygomycetes based on nuclear ribosomal DNA sequence data. J. Clin. Microbiol. 1999. 37:395-3964.
36. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi- Second Edition. Approved standard, CLSI document M38-A2. 2008; 28 (16).
37. Ruíz-Cendoya M, Rodríguez MM, Maríné M, et al. In vitro interactions of itraconazole and micafungin against clinically important filamentous fungi. International Journal of Antimicrobial Agents. 2008; 32; 418-420,
38. Gómez-López A, Cuenca-Estrella M, Mellado E, et al. In vitro evaluation of combination of terbinafine with itraconazole or amphotericin B against Zygomycota. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2003; 45; 199-202.

39. Berenbaum M.C., A method for testing for synergy with any number of agents. The journal of infections diseases. Vol.137, n.2,1978.
40. Guarro J, Llop C, Aguilar C, Pujol I. Comparison of *in vitro* antifungal susceptibilities of conidia and hyphae of filamentous fungi. Antimicrob. Agents Chemoter. 1997;41(12): 2760-2762.
41. Bezjak V. Standardization of a hyphal inoculum of *Aspergillus* for amphotericin B susceptibility testing J.Clin.Microbiol 1985; Apr.509-512
42. Matsuoka H, Yoshikazu II, Takekawa Y, Teraoka T. Evaluation of antifungal volatile compounds on the basis of the elongation rate of a single hyphae. Applied and environmental microbiology 1990; Dec. 3779-3784.
43. Yamada S, Cao J, Sumita A, Kirasawa K, Kurata H., Oh, K., Matsuoka H. Automatic antifungal activity analyzing system on the basis of dynamic growth process of a single hyphae. Mycopathology 1992;118: 65-69.
44. Oh K, Yang HC, Matsuoka A, Kurata H. Combined effect of amphotericin B and fluocytosine on growth of *Candida albicans* estimated at a single hypha level. J. Med. Vet Mycology 1995; 33(3); 01-04.
45. Taguchi H, Miyaji M, Nishimura K. Studied on the synergistic effect of amphotericin B and 5-fluorocytosine on the growth of single hyphae of *aspergillus fumigatus* by a biocell-tracer system. Mycoscience 1995; 36: 341-344.
46. Iida Y, Oh K, Saito M, Matsuoka H, Kurata H, Natsume M, Abe H. Detection of antifungal activity in *Aemarrhena asphodeloides* by sensitive BCT method and isolation of its active compound. J.Agric. Food Chem 1999; 47: 584-587.
47. Ansheng L, Taguchi H, Miyagi M, Nishimura K, Shaoxi W. Study on the hyphal responses of *Aspergillus fumigatus* to the antifungal agent by Biocell-tracer. Mycopathology 1999; 148: 17-23.
48. Moreira LS. Estudo da atividade de drogas antifúngicas através de curvas de crescimento de *Candida albicans* utilizando sistema automatizado Biocell-

- Tracer. Campinas, 2003. (Tese de Mestrado - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas).
49. Teixeira ABA, Moretti ML, Schreiber AZ. Evaluation of *F. solani* hyphae and conidia susceptibility to amphotericin B and itraconazole: study of a clinical case. *Mycopathologia*. 2005; 116(4):291-296.
50. Teixeira ABA. Avaliação de suscetibilidade a antifúngicos pelo Sistema Biocell-Tracer® de monitorização de crescimento de hifas de espécies de *Aspergillus* e *Fusarium*, 2006. (Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas).
51. Biancalana FS, Lyra L, Moretti ML, Kamei K, Schreiber AZ. Standardization of Hyphal Growth Inhibition Rate as a Means of Evaluating *Microsporum* spp. *in vitro* Susceptibility to Terbinafine, Griseofulvin and Ciclopiroxolamine. *Mycopathologia*, 2011.172(4):279-85.
52. Biancalana FS. Avaliação da suscetibilidade de hifas e conídios de fungos demáceos frente aos antifúngicos anfotericina B, itraconazol e voriconazol e terbinafina, e a última em combinação com os demais antifúngicos, 2011. (Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas).
53. Biancalana FS, Lyra L, Moretti ML, Schreiber AZ. Susceptibility testing of terbinafine alone and in combination with amphotericin B, itraconazole, or voriconazole against conidia and hyphae of dematiaceous molds. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011 Dec; 71(4):378-85.
54. Rodrigues EG, Lirio VS, Lacaz CS. Preservação de fungos e actinomicetos de interesse médico em água destilada. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* [online]. 1992; 34(2) p. 159-165.
55. Miura M., Tanigawa C., Fujii Y. Kaneko S. Comparison of six commercially available DNA polymerases for direct PCR. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*. [online]. 2013; 55 (6).

56. Lu Q., Hu H., Mo J., Shu L. Enhanced amplification of bacterial and fungal DNA using a new type of DNA polymerase. *Australasian Plant Pathology*.2012; 41(6); p.661-663.
- 57.Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23: 2947-2948.
- 58.Eliopoulos GM, Mollering RC Jr. Antimicrobial combinations. In: V.Lorian (ed.), *Antibiotics in laboratory medicine*. 3 ed. Baltimore MD: Williams & Wilkins, p. 432-492.
- 59.Argenta JS, Santurio JM, Alves SH, et al. In vitro activities of voriconazole, itraconazole and terbinafine alone or in combination against *Pythium insidiosum* isolates from Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2008; 52: (2); 767-769,
- 60.Traconal [Bula de medicamento].Guarulhos. Aché Laboratórios Farmacêuticos.
- 61.Lamisil [Bula de medicamento].São Paulo. Novartis.
- 62.Healy M, Walton D, Reece K, Lising M, Bittner T, Frye S, Kontoyiannis D. P. Species Identification of Clinical Zygomycetes Isolates by Automated rep-PCR and DNA Sequencing. Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy 44th General Meeting, Washington DC, USA October 30 – November 2, 2004
- 63.Dannaoui E. Molecular tools for identification of Zygomycetes and the diagnosis of zygomycosis. *Clinical Microbiology and Infection*.2009;15(5).
- 64.White T J, Bruns T, Lee S, Taylor JW. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. San Diego, CA: Academic Press, 1990:315–22.
- 65.Chakrabarti A, Ghosh A, Prasad GS.et al. *Apophysomyces elegans*: an emerging zygomycete in India. *J Clin Microbiol* 2003; 41:783-8.

- 66.Kontoyiannis, D. P., M. S. Lionakis, R. E. Lewis, G. Chamilos, M. Healy, C.Perego, A. Safdar, H. Kantarjian, R. Champlin, T. J. Walsh, and I. I. Raad. Zygomycosis in a tertiary-care cancer center in the era of *Aspergillus* active antifungal therapy: a case control observational study of 27 recent cases. *The Journal of Infectious Diseases*. 2005; 191:1350-60.
- 67.Sawyer PR, Brogden RN, Pinder, R.M. et al. Miconazole: a review of its antifungal activity and therapeutic efficacy. *Drugs*, 1975; 9(6); p.406-423.
- 68.Hell RC. Brogden RN, Speight TM. et al. Econazole: a review of its antifungal activity and therapeutic efficacy. *Drugs*, 1978; 16 (3), p.177-201.
- 69.Richardson MD, Warnock DW. Fungal infection-Diagnosis and management. London: Blackwell, 1993. Cap.3: Antifungal drugs: 17-43.
- 70.Hell RC. Brogden RN, Pakes GE, Speight TM, Avery GS. Miconazole: a preliminar review of its therapeutic efficacy in systemic fungal infections. *Drugs* 1980; 19:7-30.
- 71.Mikamo H, kawazoe K, Sato Y, Ito K, Tamaya T. Pharmacokinetics of miconazole in sérum and exudate of pelvic retroperitoneal space after radical hysterectomy and pelvic lymphadenectomy. *International Journal of Antimicrobial Agents* 1998; 207-211.
- 72.Taguchi H, Myahji M, Yoshida T. Evaluation of miconazole activity contained in human sérum to hypha of *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Medical Mycology*. 2000; 41(1):41-4.
- 73.Ribes JA, Vanover-Sams CL, Baker DJ. Zygomycetes in human disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 2000; 13:236-301.
- 74.Johnson EM, Szekely A, Warnock D W. *In vitro* activity of voriconazole, itraconazole and amphotericin B against filamentous fungi. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1998; 42, 741-745.
- 75.Goldani LZ, Sugar AM. Treatment of murine pulmonar mucormycosis with SCH 42427, a broad-spectrum triazole antifungal drug. *J.Antimicrob. Chemother.* 1994, 33:369–372.

76. Sheehan DJ, Hitchcock CA, Sibley CM. Current and emerging azole antifungal agents. Clin. Microbiol. Rev. 1999. 12: 40-79.
77. Mosquera J, Warn PA, Rodriguez - Tudela JL, Denning D W. Treatment of *Absidia corymbifera* infection in mice with amphotericin B and itraconazole. J. Antimicrob. Chemother. 2001. 48:583-586.
78. Sugar A M, Liu XP. Combination antifungal therapy in treatment of murine pulmonary mucormycosis: roles of quinolones and azoles Antimicrob. Agents Chemother. 2000. 44:2004-2006.
79. Dannaoui E, Meletiadis J, Mouton JW, Meis JFGM, Verweij PE. In vitro susceptibilities of zygomycetes to conventional and new antifungals. J. Antimicrob. Chemother. 2003; 51: 45-52.
80. Machouart M, Larche J, Burton K, Collomb J, Maurer P, Cintrat A, Biava MF, Greciano S, Kuijpers AFA, Contet-Audonneau N, Hoog GS, Gerard A, Fortier B. Genetic Identification of the Main Opportunistic Mucorales by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism. J. Clin. Microbiol. 2006; 44(3); p. 805-810.
81. Brittenham GM. Iron-chelating therapy for transfusional iron overload. N Engl J Med 2011; 364: 146-56.
82. Ibrahim AS, Gebermariam T, Fu Y. et al. The iron chelator deferasirox protects mice from mucormycosis through iron starvation. J Clin Invest 2007; 117:2649-57.
83. Kontoyiannis DP, Lewis RE, Lotholary O. et al. Future directions in Mucormycosis Research. Clinical Infectious Diseases 2012;54(S1):S79-85.
84. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard, third edition. CLSI document M27-A3. Wayne, PA, 2008.
85. In vitro susceptibility of filamentous fungi to systemically active antifungal agents determined by CLSI M38-A2 Broth microdilution methods. Disponível em: < www.uptodate.com >. Acesso em: 08 maio 2014.

86. Teixeira AB, Moretti ML, Trabasso P, Von Nowakonski A, Aoki FH, Vigorito AC, Miyaji M, Nishimura K, Taguchi H, Schreiber AZ. Evaluation of *Fusarium solani* hyphae and conidia susceptibility to amphotericin B and itraconazole: study of a clinical case. *Mycopathologia*. 2005 Nov;160(4):291-6.
87. Oh KB, Shirogane H, Matsuoka H, Niitsu A, Yamada S, Kurata H, Mochizuki M, Kume H. Evaluation of antifungal activity of an antifungal drug by in vitro simulation of in vivo pharmacokinetics of the drug against fungal hyphal growth. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi*. 1998; 39 (3):173-8
88. Teixeira AB, Moretti ML, Machado HC, Nishimura K, Taguchi H, Schreiber AZ. Evaluation of the inhibitory effect of amphotericin B on the apical growth of *F. solani* using the BioCell-Tracer system. *Mycoses*. 2007 May; 50(3):183-8.
89. Teixeira AB, Moretti ML, Trabasso P, Von Nowakonski A, Aoki FH, Vigorito AC, Miyaji M, Nishimura K, Taguchi H, Schreiber AZ. Evaluation of *Fusarium solani* hyphae and conidia susceptibility to amphotericin B and itraconazole: study of a clinical case. *Mycopathologia*. 2005 Nov; 160 (4):291-6.

8. ANEXOS

ANEXO 1: Eletroferogramas ilustrando sequenciamento das regiões D1/D2 para os isolados de *Mucorales*. (A) LIF 299, (B) LIF 300, (C) LIF 301, (D) LIF 1046, (E) LIF 1143, (F) LIF 1237, (G) LIF 1455, (H) LIF 1832. (I) LIF 1820 e (J) LIF 1834. Imagens obtidas pelo *software* ATSQ.

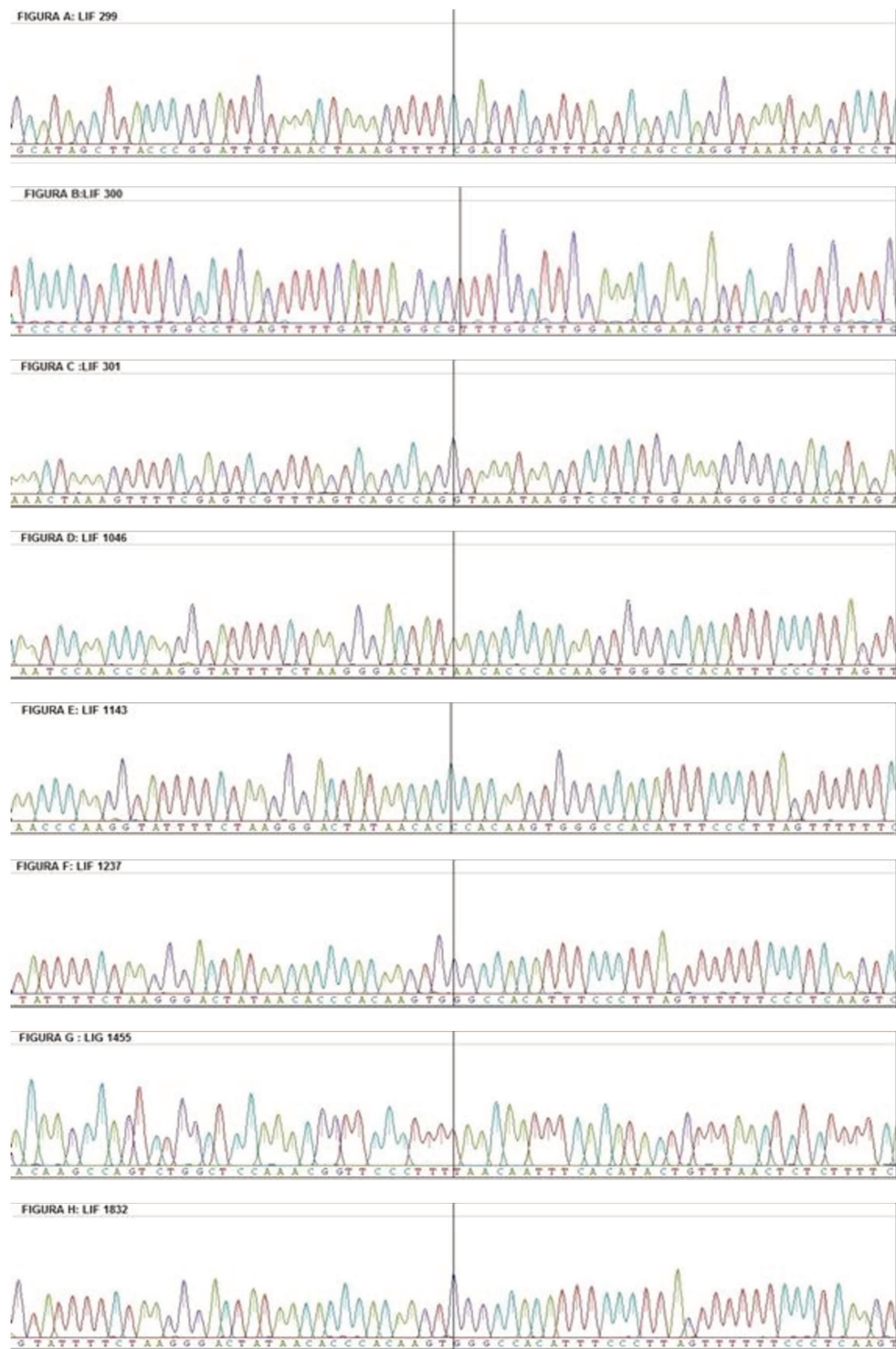


FIGURA I: LIF 1820

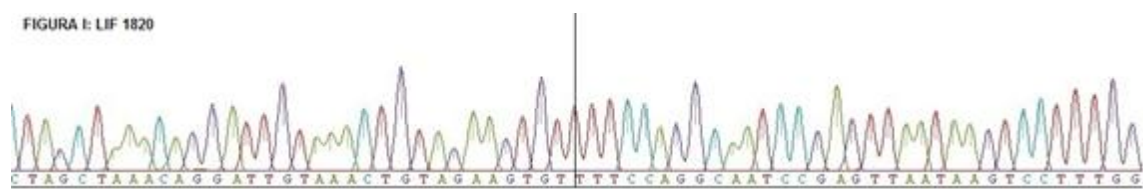
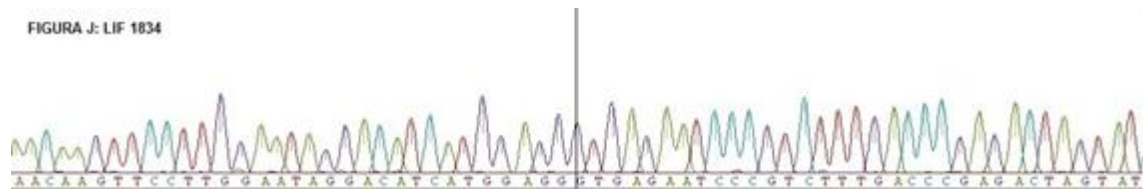


FIGURA J: LIF 1834



ANEXO 2: Descrição do caso clínico

OCA, 39 anos, etilista crônico com diagnóstico de diabetes mellitus secundária e pancreatite, é internado em 01/2011 no Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas, SP/Brasil com forte dor na movimentação ocular esquerda, diminuição da visão, aparecimento de lesão pálpebra esquerda e edema. É realizada enucleação de órbita esquerda e o abscesso orbitário é encaminhado para pesquisa de fungos, sendo o micro-organismo isolado da cultura identificado morfológicamente como *Rhizomucor* sp. (LIF 1832).

Tratamento: 21/01/11 a 16/04/11: AMB convencional e AMB lipossomal (14 dias de AMB convencional, 7 dias de AMB lipossomal 300mg/dia, 7 dias de AMB convencional 50mg/dia EV dia como dose de manutenção, 14 dias de AMB lipossomal 200mg/dia. Em fevereiro/2011 e março/2011 é realizado os seguintes exames: ressonância magnética de crânio que mostra crescimento do fungo em órbita esquerda; enucleação de órbita esquerda, esvaziamento de seio etmoidal, ressecção de duramáter e pequena porção frontal, sendo o material de tumoração intra-orbitária encaminhado para o exame anátomo-patológico e para pesquisa de fungos. O resultado do anátomo patológico demonstra processo inflamatório crônico granulomatoso fúngico com extensa necrose, compatível com mucormicose e o resultado de cultura é *Rhizomucor* sp. **17/04/11:** Sem sinais de reativação da doença; ocorre suspensão de AMB e paciente tem alta com os antifúngicos: ITC 300mg/dia e TERB 250mg /dia. **27/07/11:** paciente em uso de TERB 12mg/dia e ITC 200mg/dia. **08/2011:** paciente sem uso de TERB e em uso de ITC 200mg/dia. **04/2012:** Resultado de exame de ressonância magnética de crânio sem sinais de reativação fúngica, seio frontal sem sinais de atividade inflamatória associada e ocorre suspensão do ITC. **04/2013:** Realização de polipectomia e sinusectomia frontal; exérese de mucocèle não apresentando coleção fúngica em exame realizado. **10/2013:** Ausência de sinal de reativação de infecção fúngica. **05/2014:** paciente avaliado novamente e sem sinal de reativação da infecção fúngica.