

## ESTUDO COMPARATIVO ENTRE AS TÉCNICAS DE DILUIÇÃO EM CALDO E DILUIÇÃO EM ÁGAR, NOS ANTIBIOGRAMAS PARA *Candida*

Sydney Hartz ALVES (1) & Arlete Emily CURY (2)

### RESUMO

Os autores compararam o desempenho das técnicas de diluição em caldo e diluição em ágar, mediante a determinação da CIM (concentração inibitória mínima) e da CFM (concentração fungicida mínima) de antifúngicos poliênicos e imidazólicos, frente a diversas espécies de *Candida*.

A concordância entre as técnicas foi variável em função do antifúngico utilizado. Os melhores percentuais de concordância ocorreram quando se realizou o teste com poliênicos. Os autores discutem aspectos que envolvem a problemática dos testes de sensibilidade de leveduras a antifúngicos.

**UNITERMOS:** Leveduras, Sensibilidade, Antifúngicos.

### INTRODUÇÃO

Nos últimos 20 anos, testes de sensibilidade de *Candida* a antifúngicos poliênicos e imidazólicos têm sido realizados por diversos autores<sup>4, 7, 10, 11</sup>. Basicamente, estes testes são executados por meio da técnica de diluição em caldo (TDC) ou pela técnica de diluição em ágar (TDA). Essas técnicas, por não obedecerem ainda a um padrão universalmente aceito, trazem numerosas variáveis, que se refletem nos resultados obtidos por diferentes autores<sup>5, 7, 11</sup>.

O presente estudo teve por objetivo comparar os resultados (concentração inibitória mínima-CIM e concentração fungicida mínima-CFM) dos testes de sensibilidade de *Candida*, a antifúngicos poliênicos e imidazólicos, obtidos pela técnica de diluição em caldo (TDC) e pela técnica de diluição em ágar (TDA).

### MATERIAL E MÉTODOS

**Microrganismos:** foram estudadas 127 amostras de leveduras do gênero *Candida*, recentemente isoladas e mantidas em ágar Sabouraud dextrose, com repiques periódicos. Foram incluídas como amostras padrão: *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, sensível a poliênicos e *Candida pseudotropicalis* "Carshalton", sensível a imidazólicos.

**Agentes antifúngicos:** dentre os poliênicos foram utilizados a anfotericina B e a nistatina (SQUIBB) e entre os imidazólicos o cetoconazol (Johnson & Johnson), o clotrimazol (Bayer do Brasil S/A), o econazol (SQUIBB), o miconazol (Johnson & Johnson) e o tioconazol (Pfizer). Todos os antifúngicos foram gentilmente cedidos,

(1) Laboratório de Análises Clínicas; Hospital Universitário; Universidade Federal de Santa Maria; Campus da UFSM, Santa Maria, RS. 97.100, Brasil.

(2) Departamento de Análises Clínicas; Faculdade de Ciências Farmacêuticas; Universidade de São Paulo. Cx. Postal 30786 — São Paulo, SP, Brasil.

sob a forma de pó, pelas respectivas indústrias que comercializam o produto no Brasil.

#### Testes de Sensibilidade:

- Técnica de diluição em caldo (TDC) — Utilizou-se a técnica preconizada por SHADOMY et al<sup>11</sup>.
- Técnica de diluição em ágar (TDA) — Foi empregada técnica descrita por HOLT<sup>5</sup>, modificada por CURY et al<sup>2</sup>, reduzindo a concentração de ágar para 1%. A concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração fungicida mínima (CFM) foram determinadas por ambas as técnicas.

#### Critério adotado para a comparação entre as técnicas<sup>13</sup>:

Esta avaliação foi realizada por meio dos quocientes obtidos pela divisão entre as CIMs ou entre as CFMs de cada droga frente a uma mesma levedura, em cada uma das técnicas empregadas. Os resultados dessa operação

$\left(\frac{\text{CIM maior}}{\text{CIM menor}} \text{ e } \frac{\text{CFM maior}}{\text{CFM menor}}\right)$  permitem que ocorram as seguintes possibilidades: quando os valores das CIMs ou das CFMs, forem idênticos em ambas as técnicas, o quociente será 1, TDA = TDC; quando não idênticos, o quociente poderá ser 2, 4, 8, ou maior, nas possibilidades de TDA > TDC ou TDC > TDA.

Considerando-se que o erro permitido, em termos de CIM ou CFM, nas duas técnicas avaliadas é de uma diluição<sup>3</sup>, temos que o quociente igual a 2, já contém o erro permitido. Deste modo, o percentual de resultados concordantes, entre as 2 técnicas, foi dada pela soma da percentagem de resultados no quociente 1 mais a percentagem de resultados no quociente 2.

### RESULTADOS

Considerando-se o erro permitido, a concordância entre as duas técnicas resultou como demonstrado na tabela 1.

As CIMs dos antifúngicos poliênicos apresentaram maior número de valores concordantes que as dos imidazólicos, alcançando 88,1% no caso da anfotericina B e 82,6% para a nista-

TABELA 1

Percentuais de concordância entre TDA e TDC, com base nas CIMs e CFMs de antifúngicos poliênicos e imidazólicos para *Candida*.

Antifúngicos	CIM	CFM
	%	%
Anfotericina B	88,1	100
Nistatina	82,60	64,56
Cetoconazol	70,8	100
Clotrimazol	62,1	96,8
Econazol	78,7	100
Miconazol	67,7	89,7
Tioconazol	81,0	100

tina. Além disso, frente a primeira droga obteve-se 100% de concordância entre as CFMs, enquanto que frente a nistatina verificou-se menor número de resultados concordantes entre os obtidos para as outras drogas.

Em relação aos imidazólicos, a percentagem de concordância também foi variável com o antifúngico em estudo, obtendo-se para as CIMs os limites de 81,0% para o econazol e de 62,1% para o clotrimazol. Por outro lado, as variações foram menos sensíveis para as CFMs, obtendo-se elevados índices de concordância que chegaram a 100% no caso do cetoconazol, econazol e tioconazol; para o clotrimazol a concordância foi de 96,8% e para o miconazol foi de 89,7%.

Com base nos resultados das CIMs e CFMs, a tabela 2 mostra os percentuais de ocorrência das 3 possibilidades: TDA igual a TDC, TDA maior do que a TDC e TDC maior do que TDA, para os antifúngicos testados.

TABELA 2

Comparação entre TDA e TDC: distribuição dos percentuais das CIMs e CFMs, de antifúngicos poliênicos imidazólicos, nas 3 ocorrências possíveis, frente a *Candida*.

Antifúngicos	TDA > TDC		TDA = TDC		TDC > TDA	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
	%	%	%	%	%	%
Anfotericina B	68,5	38,6	25,2	57,5	6,3	3,9
Nistatina	62,2	91,3	22,8	8,6	14,9	—
Cetoconazol	55,1	13,4	14,9	86,5	29,9	—
Clotrimazol	26,7	29,9	6,3	61,4	66,9	8,6
Econazol	57,5	3,1	10,2	92,1	32,2	4,7
Miconazol	92,9	53,5	3,1	45,6	3,9	0,8
Tioconazol	42,5	7,0	11,0	87,4	46,4	5,5

## DISCUSSÃO

O conhecimento das implicações que envolvem a execução dos antibiogramas para *Candida* é de importância, porque, até o momento, a aplicação de qualquer das técnicas disponíveis na literatura fica a critério de cada laboratório<sup>1, 3, 4, 5, 13</sup>. Este comportamento pode trazer inúmeras divergências entre os resultados obtidos para uma mesma amostra<sup>3, 4, 5, 7, 13</sup> em adição às obtidas pela ausência de um procedimento universalmente aceito para execução de uma mesma técnica. Por outro lado, tendo o laboratório estabelecido seus próprios padrões<sup>8, 12, 13</sup>, o conhecimento da compatibilidade entre TDA e TDC, é de importância, porque possibilita que, conforme a situação, seja mais conveniente a utilização de uma ou outra técnica<sup>1, 7, 13</sup>. Assim, para testar um pequeno número de amostras, é recomendável a TDC, enquanto que, para um grande número de amostras, a TDA é mais prática.

Neste trabalho observou-se que para os poliênicos, os testes de sensibilidade realizados pela TDC forneceram CIMs mais baixas do que pela TDA.

Para imidazólicos, as variações entre as percentagens de concordância das CIMs refletiram as propriedades intrínsecas de cada droga<sup>8</sup>. Os resultados obtidos divergem dos observados por RYLEY et al<sup>10</sup> e HOWARTH et al<sup>6</sup>, que referiram plena concordância entre as técnicas.

Em relação ao desempenho pode-se observar que a TDA apresentou CIMs e CFMs maiores do que a TDC para a anfotericina B, nistatina, cetoconazol, econazol e miconazol, enquanto que para o clotrimazol e o tioconazol, a TDC forneceu CIMs mais elevadas do que a TDA (tabela 2). Este perfil de resultados, com valores de CIMs e CFMs mais elevados quando se utilizou a TDA, se justificam porque na TDA, o inóculo é colocado em um ponto da placa e, considerando-se que a área inoculada é pequena, o contato do fungo com o antifúngico é menor, se comparado a TDC.

Segundo SCHOLER & POLAK<sup>12</sup>, as CIMs e CFMs são menores na TDC porque, nesta técnica a produção de ácido dilui-se no meio líquido, enquanto que na TDA, permanece no ponto

de inoculação, o que promove a inativação de alguns antifúngicos, fornecendo CIMs e CFMs mais elevadas.

O fato das CIMs para o clotrimazol e tioconazol serem menores na TDA do que na TDC, já foi observado por REYNOLDS et al<sup>9</sup> e ODDS<sup>8</sup> que explicam-no com base na maior insolubilidade destes imidazólicos em meio líquido (TDC), enquanto que no ágar (TDA), permanecem igualmente distribuídos.

As elevadas taxas de concordância para as CFMs dos imidazólicos devem ser interpretadas com cuidado, porque a maior concentração avaliada foi 128 µg/ml e as CFMs correspondentes foram expressas como 128 µg/ml. Assim, as elevadas percentagens de concordância devem-se principalmente às limitações das condições utilizadas e não devem ser interpretadas como rigorosamente coincidentes.

Por outro lado, vários autores<sup>1, 7, 13</sup> verificaram divergências entre as TDC e TDA, quando utilizaram 2% de ágar no meio teste para TDA. Comparando-se nossos resultados com os de BRASS et al<sup>1</sup>, observamos que a TDA com menor concentração de ágar (1%) propiciou melhor concordância com a TDC, notadamente nos testes com nistatina e cetoconazol.

Comparações mais rigorosas não puderam ser estabelecidas em função do reduzido número de trabalhos que enfocam este tema, fato que torna os resultados aqui apresentados, úteis para discussões futuras.

## SUMMARY

### Broth dilution and agar dilution methods applied to *Candida* sensitivity tests: a comparative study.

The performance of broth dilution method and agar dilution method were compared by MIC (minimal inhibitory concentration) and MFC (minimal fungicidal concentration) from *Candida* strains to polyene and imidazole antifungal agents.

The concordance between these methods was drug dependent. The best percent of concor-

dance were showed when the polyenes were tested.

The problems of sensitivity test for yeasts to antifungal drugs are discussed.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRASS, C.; SHAINHOUSE, J. Z. & STEVENS, D. A. — Variability of agar dilution-replicator method of yeast susceptibility testing. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 15: 763-768, 1979.
2. CURY, A. E.; MICHE, M. P. & MINAMI, P. S. — Leveduras isoladas de pacientes com câncer: incidência e sensibilidade a antibióticos poliênicos. *Rev. Microbiol. (São Paulo)*, 20: 102-107, 1989.
3. DOERN, G. V.; TUBERT, T. A.; CHAPLIN, K. & RINALDI, M. G. — Effect of medium composition on results of macrobroth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. *J. clin. Microbiol.*, 24: 507-511, 1986.
4. HOLMBERG, K. — Laboratory tests of antifungal drugs in treatment of systemic mycosis. *Scand. J. infect. Dis.*, 16: 65-73, 1978.
5. HOLT, R. J. — Laboratory tests of antifungal drugs. *J. clin. Path.*, 28: 767-774, 1975.
6. HOWARTH, W. R.; TEWARI, R. P. & SOLOTOROVSKI, M. — Comparative in vitro antifungal activity of amphotericin B and amphotericin B methyl-ester. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 7: 58-63, 1975.
7. KOBAYASHI, G. S. & MEDOFF, F. — Measurement of activity of antifungal drugs. In: HOWARD, D. H., ed. *Fungi pathogenic for humans and animals*. New York, Marcel Dekker, 1983. v. 3, p. 357-371.
8. ODDS, F. C. — Laboratory evaluation of antifungal agents: a comparative study of 5 imidazoles derivatives of clinical importance. *J. Antimicrob. Chemother.*, 6: 97-104, 1980.
9. REYNOLDS, A. V.; HAMILTON-MILLER, J. M. T. & BRUMFITT, W. — Discrepant behaviour of clotrimazole against *Bacteroides fragilis* in liquid and solid media. *J. Antimicrob. Chemother.*, 3: 622-623, 1977.
10. RYLEY, J. F.; WILSON, R. G.; GRAVESTOCK, M. B. & POYSER, J. P. — Experimental approaches to antifungal chemotherapy. *Advanc. Pharmacol. Chemother.*, 18: 49-176, 1981.
11. SHADOMY, S.; ESPINEL-INGROFF, A. & CARTWRIGHT, R. — Laboratory studies with antifungal agents: susceptibility tests and bioassays. In: LENNETTE, E. H.; BALLOWS, A.; HAUSLER, W. J. Jr. & SHADOMY, H. J., ed. *Manual of Clinical Microbiology*. 4 ed. Washington, American Society of Microbiology, 1985. p. 991-999.
12. SCHOLER, H. J. & POLAK, A. — Resistance to systemic antifungal agents. In: BRYAN, L. E., ed. *Antimicrobial drug resistance*. Orlando, Academic Press, 1984. p. 393-460.
13. STEVENS, D. A. — Antifungal drug susceptibility testing: a critical review. *Mycopathologia (Den Haag)*, 87: 135-140, 1984.

Recebido para publicação em 5/8/1991.

Aceito para publicação em 30/3/1992.