



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS
DOUTORADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS
INFECCIOSAS

BERNARDINA PENARRIETA MORALES

**SUSCETIBILIDADE *IN VITRO* E RESISTÊNCIA A
ANTIFÚNGICOS – ESTUDO COMPARATIVO ENTRE
OS TIPOS MOLECULARES VNI DE *Cryptococcus*
neoformans E VGI, VGII DE *Cryptococcus gattii* PELA
CITOMETRIA DE FLUXO.**

Rio de Janeiro

2013

**SUSCETIBILIDADE *IN VITRO* E RESISTÊNCIA A
ANTIFÚNGICOS – ESTUDO COMPARATIVO ENTRE
OS TIPOS MOLECULARES VNI DE *Cryptococcus*
neoformans E VGI, VGII DE *Cryptococcus gattii* PELA
CITOMETRIA DE FLUXO.**

BERNARDINA PENARRIETA MORALES

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientadora: Dra. Márcia dos Santos Lazéra

Coorientadora: Dra. Luciana Trilles

Rio de Janeiro

2013

BERNARDINA PENARRIETA MORALES

**SUSCETIBILIDADE *IN VITRO* E RESISTÊNCIA A
ANTIFÚNGICOS – ESTUDO COMPARATIVO ENTRE
OS TIPOS MOLECULARES VNI DE *Cryptococcus*
neoformans E VGI, VGII DE *Cryptococcus gattii* PELA
CITOMETRIA DE FLUXO.**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para grau de Doutor em Ciências.

Orientadora: Dra. Márcia dos Santos Lazéra

Co-orientadora: Dra. Luciana Trilles

Aprovada em: 13/12/ 2013

Banca examinadora

Dr. Álvaro Luiz Bertho IOC / FIOCRUZ.
Dr. em Ciências pela Fundação Oswaldo Cruz.
(Membro / Revisor)

Dr. Bodo Wanke IPEC / FIOCRUZ.

Dr. em Doenças Infecciosas e Parasitárias pela UFRJ / Rio de Janeiro.

(Membro / Presidente)

Dra. Maria de Fátima Madeira–IPEC / FIOCRUZ

Dra. em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz / FIOCRUZ

(Membro)

Dr. Sandro Antônio Pereira - IPEC / FIOCRUZ.

Dr. em Ciências pelo IPEC / FIOCRUZ

(Membro)

Dra. Simone da Costa Cruz Silva–IPEC / FIOCRUZ

Dra. em Microbiologia pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro

(Membro)

Dr. Rodrigo de Almeida Paes IPEC / FIOCRUZ.

Dr. em Biologia Celular e Molecular Pela Fundação Oswaldo Cruz.

(Suplente)

Eu fico
Com a pureza
Da resposta das crianças
É a vida, é bonita
E é bonita...

Gonzaguinha

Ao Grande *EU SOU* e minha família

AGRADECIMENTOS

Sinto-me com dificuldade de mencionar nomes com o receio de esquecer alguém, já que com o passar desse longo tempo muitas pessoas me apoiaram e contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho. Por esse motivo agradeço a Pós-Graduação do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC – FIOCRUZ) que contribuiu para minha formação, a Dra. Márcia Lazéra e a toda a equipe da Micologia Médica do IPEC.

A todos, minha família, professores, colegas, que de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho, O MEU MUITO OBRIGADA!

MORALES BP. **Suscetibilidade *in vitro* e resistência a antifúngicos – estudo comparativo entre os tipos moleculares VNI de *Cryptococcus neoformans* e VGI, VGII de *Cryptococcus gattii* pela citometria de fluxo.** Rio de Janeiro, 2014. 154 f. Tese [Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

RESUMO

A criptococose é uma micose sistêmica adquirida pela inalação de basidiosporos ou leveduras desidratadas de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, estas duas espécies podem causar criptococose oportunista e primária respectivamente. *C. neoformans* está constituído de tipos moleculares VNI-VNIV e *C. gattii* de VGI-VGIV que apresentam distribuição geográfica diferenciada, como por exemplo, o tipo VNI é cosmopolita e está associado a AIDS e VGI predominando na Austrália e EUA, o tipo VGII predominando no Brasil e América Latina. Este trabalho tem por **objetivo** realizar estudo comparado dos tipos moleculares VNI de *C. neoformans*, VGI e VGII de *C. gattii* analisando diferentes aspectos tais como: **1-** Determinar o perfil da suscetibilidade *in vitro* da concentração inibitória mínima (CIM) de fluconazol (FLZ), itraconazol (ITZ), 5-fluorocitosina (5FC) e anfotericina B (AMB), isoladamente e de forma combinada de AMB com 5FC e AMB com Voriconazol (VRZ); **2-** Determinar CIM pela citometria de fluxo (CMF) frente a FLZ, ITZ e AMB; **3-** Definir a concentração mínima letal (CML) de AMB e 5FC, isoladamente e em combinação; **4-** Avaliar a ação da melanina frente a 5FC e AMB na forma combinada e isolada de 5FC; **5-** Induzir a resistência *in vitro* para FLZ e padronizar os fluorocromos: acetoximetil - calceína (calceína-AM), acetoximetil - 2', 7' -bis-(2-carboxietil)-5-(e -6)- carboxifluoresceína (BCECF-AM), rodamina 123 (Rh123) e iodeto de 3, 3' -dipentiloxacarbocianina (DiOC5) na CMF para verificar a expressão de bombas de efluxo; **6-** Comparar a expressão de bombas de efluxo. Os **resultados** permitiram identificar diferentes fenótipos de suscetibilidade que foram analisados e comparados entre as duas espécies e os tipos moleculares, permitindo a produção de quatro artigos; sendo assim, **concluímos** que: **1-** Na análise das CIMs o tipo molecular VGII apresentou-se menos suscetível em relação a VGI e VNI; já na combinação *in vitro* de AMB e VRZ foi observado 100% de indiferença, e na combinação de AMB e 5FC observou-se necessidade de padronização da concentração da glicose para obter testes que possam ser futuramente relacionados a casos clínicos; **2-** O método de CMF demonstrou ser alternativa de leitura automatizada, reprodutível, para os testes de suscetibilidade antifúngica com uso de Laranja de Acridina e FUN-1; **3-** Foi verificada a importância da realização do teste da CML para verificar a ação protetora da melanina frente a combinação de AMB e 5FC. **4-** A expressão da melanina, na combinação de AMB e 5FC reduz a detecção do sinergismo e o efeito aditivo *in vitro*. **5.** Os isolados induzidos à resistência ao FLZ permitiram obter resultados estatisticamente significativos na verificação de Bombas de efluxo *in vitro* na CMF com uso de fluorocromo Dioc5 e bloqueador de protonóforos CCCP; **6-** Foi verificado que 65% de isolados não induzidos a resistência e 90% de isolados induzidos a resistência do tipo molecular VGII expulsam o FLZ com certa vantagem em relação aos tipos moleculares VGI e VNI. Os resultados deste trabalho contribuem para compreensão do comportamento *in vitro* de *C. neoformans* e *C. gattii* frente a drogas antifúngicas cujos resultados poderão ser aplicados em estudos clínicos de correlação *in vitro* e *in vivo* para melhor compreensão da terapêutica antifúngica da criptococose e validação dos testes de suscetibilidade para estas duas espécies.

Palavras-chave: 1 *Cryptococcus neoformans*. 2 *Cryptococcus gattii*. 3 Suscetibilidade antifúngica. 4 Citometria de fluxo. 5 Indução a resistência. 6 Bombas de efluxo.

MORALES BP. *In vitro* susceptibility and resistance to antifungal drugs - a comparative study of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* VNI, *Cryptococcus gattii* VGI and VGII by flow cytometry. Rio de Janeiro, 2014. 154 f. Thesis [Phd in Clinical Infectious Diseases Research] Institute of Evandro Chagas Clinical Research.

ABSTRACT

Cryptococcosis is a systemic mycosis acquired by inhalation of dried yeasts or basidiospores of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, these species can cause cryptococcosis opportunistic and primary respectively. *C. neoformans* is composed of molecular types VNI - VNIV and *C. gattii* VGI - VGIV they have different geographical distribution, the VNI type is cosmopolitan and is associated with AIDS, VGI type is predominant in Australia and the USA; while VGII type occurs in Brazil and Latin America. This paper aims to conduct a comparative study of the molecular types VNI *C. neoformans* and VGI, VGII *C. gattii* analyzing different aspects such as: **1** – The susceptibility profile *in vitro* of fluconazole (FLZ), itraconazole (ITZ), 5 - fluorocytosine (5FC) and amphotericin B (AMB) alone and in combination with 5FC and AMB with voriconazole (VRZ) **2** – The minimum inhibitory concentration (MIC) by flow cytometry (FCM) comparing MIC of FLZ, ITZ and AMB with CLSI; **3** - The minimum lethal concentration (MLC) of AMB and 5FC, alone and in combination; **4** - The action of melanin against 5FC and AMB alone and combined 5FC, **5** – The induced resistance *in vitro* to FLZ and standardize the fluorochromes: acetoximetil - calceína (calceina-AM), acetoximetil - 2', 7' -bis-(2-carboxietil)-5-(e -6)- carboxifluoresceína (BCECF-AM), rodamina 123 (Rh123) e iodeto de 3, 3' – dipentiloxacarbocianina (DiOC5) in FCM to verify expression of efflux pumps; **6** - The compare the expression of efflux pumps. These results permitted the identification of different susceptibility phenotypes which were analyzed and compared between the two species and molecular types, allowing the production of four articles. Thus, we concluded that: **1** - The analysis of the molecular type VGII MICs presented less susceptibility against VGI and VNI, whereas in the combination of AMB and VRZ *in vitro* 100% indifference was observed, in the combination of AMB and 5FC we observed the need for standardization of the concentration of glucose for future tests which can be related to clinical cases; **2** - the FCM method proved to be an alternative automated reproducible reading for antifungal susceptibility testing with use of Acridine Orange and FUN- 1, **3** - The importance of carrying out the MLC test to verify the protective action of melanin when exposed to the combination of AMB and 5FC. **4** - Was also verified that expression of melanin, in combination AMB and 5FC reduces the detection of synergism and additive effect *in vitro*. **5** - The strains induced to resistance to fluconazole made it possible to obtain statistically significant results in the verification of activity of efflux pumps *in vitro* using FCM with fluorochrome Dioc5 and protonophores blocker CCCP, **6** - It was found that 65% isolates no inducted to resistance and 90% isolates inducted to resistance of the molecular type VGII expels the FLZ with a certain advantage in relation to the molecular types VNI and VGI. The results of these studies contribute to the understanding of the behavior *in vitro* of *C. neoformans* and *C. gattii* against antifungal drugs and can be applied in clinical correlation studies *in vitro* and *in vivo* to better understand the antifungal therapy of cryptococcosis and validation of susceptibility testing for these two species.

Keywords: 1 *Cryptococcus neoformans*. 2 *Cryptococcus gattii*. 3 Antifungal susceptibility. 4 Flow cytometry. 5 Induction resistance. 6 Efflux pumps.

LISTA DE ABREVIATURAS

5-FC = 5-Fluorocitosina

ABC = *Adenosine Triphosphate-Binding cassette (ABC) transporters*

ABE = Atividade de bomba de efluxo

AFLP = Amplified Fragment Length Polymorphisms

ADN = Ácido Desoxirribonucleico

AFST-EUCAST = *The Antifungal Susceptibility Testin Sub-Committee Of The European On Antimicrobial Susceptibility Testing*

AIDS = Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

AMB = Anfotericina B

ARN = Ácido Ribonucleico

ASN = Agar semente de Níger

ATCC = *American Type Culture Collection*

BCECF-AM = *Acetoximetil - 2', 7' -Bis-(2-Carboxietil)-5-(E -6)- Carboxifl Uoresceína*
Acetoximetil - Calceína = Calceína-AM

CC = Controle de Crescimento

CCCP = Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone

CE = Controle de Esterilidade

CO = Centro-Oeste

CGB = meio canavanina-glicina-azul de bromotimol

CIF = Concentração inibitória fracional

CIM = Concentração Inibitória Mínima

CLSI = *The Clinical And Laboratory Standards Institute*

CMF = Citometria de Fluxo

CML = Concentração Mínima Letal

CSD = Controle sem droga

CTCCCP = Controle tratado com CCCP

DMSO = Dimetilsulfóxido

DiOC5 = Iodeto de 3, 3' - dipentiloxacarbocianina

E-Test = Técnica gradiente para determinação de concentração inibitória mínima

CIF = Concentração inibitória Fracional

FLZ = Fluconazol

FUN-1 = [2-Cloro-4-(2,3dihydro-3-Methyl-(Benzo-1,3-Thiazol-2-Yl)-Methylidene)-1phenylquinoliniumiodide]

GXM = Glucuronoxilomanana

HIV = *human immunodeficiency virus*

ICIF = Índice de concentração inibitória Fracional

ICIF = Índice de Concentração Inibitória Fracional

INCQS = Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde

ITZ = Itraconazol

LA = Laranja de Acridina

L-DOPA = L-3,4-dihydroxyphenylalanine

LCR = Líquido Cefalorraquidiano

MDR = Multidroga Resistente

MdX = médias de intensidade de fluorescência

MIC = *Minimum inhibitory concentration*

MG = Média Geométrica

MOPS = 3-[N-morpholino] propanesulfonic acid

PBS = phosphate buffered saline

PI = *Propidium iodide*

PCR = *polymerase chain reaction*

RAPD-PCR = Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction

RFLP = Restriction Fragment Length Polymorphisms

Rh 123 = Rodamina 123

S = Regiões Sud

SE = Sud-Este

SPSS = *Statistical Package for Social Sciences*

SC = *Sabouraud Dextrose Agar*

TSA = Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos

UFC = Unidade Formadora de Colônias

VRZ = Voriconazol

VNI = Variedade *neoformans* tipo molecular I

VGI = Variedade *gattii* tipo molecular I

VGII = Variedade *gattii* tipo molecular II

YPDA = Yeast Extract Peptone Dextrose AGAR.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Teste de suscetibilidade Antifúngica de FLZ, ITZ e AMB de 54 isolados de *C. gattii* VGI, VGII e *C. neoformans* VNI pelo método CLSI M27- A3 e citometria de fluxo..... 99
- Tabela 2.** Relação das CIMs $\mu\text{g/mL}$ de FLZ, ITZ e AMB correspondente as percentagem de morte de *C. gattii* VGI obtidos pelo método de CMF..... 100
- Tabela 3.** Relação das CIMs $\mu\text{g/mL}$ de FLZ, ITZ e AMB correspondente as percentagem de morte de *C. gattii* VGII obtidos pelo método de CMF..... 101
- Tabela 4.** Relação das CIMs $\mu\text{g/ml}$ de FLZ, ITZ e AMB correspondente as percentagem de morte de *C. neoformans* obtidos pelo método de CMF. 102
- Tabela 5.** Combinação de Voriconazol e Anfotericina B na presença e ausência de L-DOPA para *C. neoformans* e *C. gattii* com glicose 0,2 %..... 103
- Tabela 6.** Interação de Voriconazol e Anfotericina B para *C. neoformans* e *C. gattii* na ausência de L-DOPA acrescido de glicose 2,0 % 104

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Dot plots de tamanho (FS) versus intensidade de fluorescência pela incorporação de Laranja de Acridina (LA) (FL4 LOG): **a.** Autofluorescência; **b.** *C. neoformans* corado com LA por 30min, **c.** *C. neoformans*, células mortas depois de 1h de incubação com formaldeído 1% e corado com LA por 30 minutos.....106
- Figura 3.** Dot plots de tamanho (FS) versus intensidade de fluorescência pela incorporação de (LA) em FL4 LOG filtro 675 nm Band Pass cor laranja avermelhado, de *Candida krusei* INCQS 40147 (ATCC 6258) e *Candida parapsilosis* INCQS 40038 (ATCC 22019) frente a AMB com sua respectiva CIM e a diluição anterior.....107
- Figura 4.** Dot plots de tamanho (FS) versus intensidade de fluorescência pela incorporação de (LA) em FL4 LOG filtro 675 nm Band Pass cor laranja avermelhado, de *Candida krusei* INCQS 40147 (ATCC 6258) e *Candida parapsilosis* INCQS 40038 (ATCC 22019) frente a ITZ com sua respectiva CIM e a diluição anterior.....108
- Figura 5.** Dot plots de tamanho (FS) versus intensidade de fluorescência pela incorporação de (LA) em FL4 LOG filtro 675 nm Band Pass cor laranja avermelhado, de *Candida krusei* INCQS 40147 (ATCC 6258) e *Candida parapsilosis* INCQS 40038 (ATCC 22019) frente a FLZ com sua respectiva CIM e a diluição anterior.....109.
- Figura 6.** Dot plots de tamanho (FS) versus intensidade de fluorescência pela incorporação de (LA) em FL4 LOG filtro 675 nm Band Pass cor laranja avermelhado, de *C. neoformans* LMM1433 VNI, e *C. gattii* LMM1493 VGII, mostrando percentagem de morte de células frente a AMB com sua respectiva CIM e a diluição anterior.....110
- Figura 7.** Dot plots de tamanho (FS) versus intensidade de fluorescência pela incorporação de (LA) em FL4 LOG filtro 675 nm Band Pass cor laranja avermelhado, de *C. neoformans* LMM1433 VNI, com sua respectiva MICs e 1µg/mL de ITZ. *C. gattii* LMM1493 VGII, mostrando percentagem de morte de células frente a ITZ com sua respectiva CIM e a diluição anterior.....111
- Figure 8.** Dot plots de tamanho (FS) versus intensidade de fluorescência pela incorporação de (LA) em FL4 LOG filtro 675 nm Band Pass cor laranja avermelhado de *C. neoformans* LMM1433 VNI, e *C. gattii* LMM1493 VGII, mostrando percentagem de morte de células frente a FLZ com sua respectiva CIM e a diluição anterior.....112

SUMÁRIO

1.1 Criptococose.....	1
1.2 Criptococose associada a AIDS	1
1.3 Fatores de virulência	3
1.4 Epidemiologia	5
1.5 Epidemiologia molecular de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i>	6
1.6 Drogas Antifúngicas.....	7
1.7 Tratamento	9
1.8 Combinação de drogas	10
1.9. Resistência a drogas antifúngicas.....	11
1.10 Heterorresistencia.....	12
1.11 Bombas de efluxo.....	14
1.12 Indução da resistência a drogas <i>in vitro</i>	14
1.13 Testes de suscetibilidade aos antifúngicos <i>in vitro</i>	15
1.14 Citometria de fluxo.....	16
2. JUSTIFICATIVA.....	18
3. OBJETIVO.....	20
3.1 OBJETIVO GERAL	20
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
4. RESULTADOS.....	21
CAPÍTULO I.....	21
Determination of the minimum inhibitory concentration of <i>Cryptococcus neoformans</i> and <i>Cryptococcus gattii</i> against fluconazole by flow cytometry	
CAPÍTULO II	30
Susceptibility test in vitro of <i>Cryptococcus neoformans</i> VNI and <i>Cryptococcus gattii</i> VGII against amphotericin B by Vitek-2, Broth microdilution CLSI and Flow Cytometry	

CAPÍTULO III.....	55
Combination of amphotericin B and 5-flucytosine on <i>Cryptococcus neoformans</i> VNI and <i>Cryptococcus gattii</i> VGII in presence or absence of melanin	
CAPÍTULO IV.....	75
Verificação da expressão de bombas de efluxo pela citometria de fluxo de <i>C. neoformans</i> VNI, <i>C. gatti</i> VGI e VGII frente a fluconazol	
5. METODOLOGIA (Geral).....	91
5.1 Microrganismos.....	91
5.2 Tipagem molecular.....	91
5.3 Análises de Suscetibilidade antifúngica <i>in vitro</i> , método de microdiluição (CLSI M27A-3).....	91
5.3.1 Preparo do inóculo	91
5.3.2 Drogas Antifúngicas.....	92
5.3.3 Preparo de diluições seriadas das drogas	92
5.3.4 Suscetibilidade antifúngica e melanina	93
5.3.5 Interpretação dos Resultados (CLSI M27A-3).....	93
5.3.6 Combinação de drogas (CLSI M27A-3) e método tabuleiro de xadrez.....	93
5.3.7 Preparação do inóculo.	96
5.3.8 Análise e Interpretação da Combinação de Drogas.....	96
5.4 Avaliação da Concentração Mínima Letal (CML)	96
5.5 Análises de suscetibilidade antifúngica <i>in vitro</i> pelo método por citometria de fluxo.....	97
5.6 Análise de dados.....	97
6 RESULTADOS GERAIS (não utilizados nos artigos).....	99
Tabela 1. Teste de suscetibilidade antifúngica de FLZ, ITZ e AMB de 54 isolados de <i>C. gattii</i> VGI, VGII e <i>C. neoformans</i> VNI pelo método CLSI M27- A3 e citometria de fluxo.....	
99	
Tabela 2. Relação das CIMs ($\mu\text{g/mL}$) de FLZ, ITZ e AMB correspondente a percentagens de morte de <i>C. gattii</i> VGI obtidas pelo método de CMF.....	
100	
Tabela 3. Relação das CIMs ($\mu\text{g/mL}$) de FLZ, ITZ e AMB correspondente a percentagens de morte de <i>C. gattii</i> VGII obtidas pelo método de CMF.....	
101	
Tabela 4. Relação das CIMs ($\mu\text{g/mL}$) de FLZ, ITZ e AMB correspondente as percentagens de morte de <i>C. neoformans</i> obtidas pelo método de CMF.....	
102	

Tabela 5. Combinação de voriconazol e anfotericina B na presença e ausência de L-DOPA para <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> com glicose 0,2 %	103
Tabela 6. Interação de Voriconazol e Anfotericina B para <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> na ausência de L-DOPA acrescido de glicose 2,0 %	104
7 DISCUSSÃO.....	113
8 CONCLUSÃO GERAL	117
9 REFERÊNCIAS	118

Suscetibilidade *in vitro* e resistência a antifúngicos – estudo comparativo entre os tipos moleculares VNI de *Cryptococcus neoformans* e VGI, VGII de *Cryptococcus gattii* pela citometria de fluxo.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Criptococose

A criptococose, também conhecida como Torulose, Blastomicose Européia ou Doença de Busse-Buschke, é uma micose sistêmica adquirida através da inalação de propágulos infectantes, em forma de basidiosporos ou leveduras desidratadas de *Cryptococcus neoformans* ou *Cryptococcus gattii*. A doença manifesta-se como: 1) criptococose oportunista, cosmopolita, associada a condições de imunodepressão celular, causada principalmente por *C. neoformans*; 2) criptococose primária endêmica em áreas tropicais e subtropicais, associada à hospedeiro aparentemente imunocompetente, causada principalmente por *C. gattii*. As duas espécies causam meningoencefalite acompanhada ou não de lesão pulmonar evidente, além de fungemia e focos secundários na pele, ossos, rins, supra-renal, entre outros, podendo evoluir para formas graves e até fatais (Lazera MS et al., 2005).

1.2 Criptococose associada a AIDS

A criptococose é reconhecida como importante causa de mortalidade na AIDS (Osazuwa, Dirisu, & Okuonghae, 2012). Em 1982, foi diagnosticado o primeiro caso de AIDS no Brasil, apesar de ser reconhecido um caso retrospectivamente, no estado de São Paulo, como tendo ocorrido em 1980. A partir de então, importantes mudanças epidemiológicas vêm ocorrendo: de 1980 a 1986, a AIDS foi caracterizada pela transmissão homo/bissexual masculino, de escolaridade elevada; de 1987 a 1991, caracterizava-se pela transmissão sanguínea envolvendo usuários de drogas injetáveis, dando início ao envolvimento de população de baixo recurso financeiro e interiorização da epidemia. A partir de 1992 exposições heterossexuais vem sendo observadas incluindo importante número de casos em mulheres (CADERNOS DE ATENÇÃO BÁSICA, 2006) (Moreira et al., 2006)

Moreira et al. (2006), realizaram entre março de 1998 e novembro de 2003 estudo prospectivo no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia onde de 96

pacientes com diagnóstico clínico e laboratorial de criptococose, 81,3% eram portadores de HIV. Neste estudo foram isolados *C. neoformans* de 89 pacientes e *C. gattii* de sete pacientes. Assim este trabalho demonstrou que a criptococose tem sido diagnosticada com frequência constituindo uma das doenças oportunistas de maior morbimortalidade em pacientes com AIDS (Moreira et al., 2006) No mesmo estudo, *C. neoformans* foi mais frequente na faixa etária de 21 a 40 anos, enquanto que *C. gattii* ocorreu em pacientes acima de 51 anos, com exceção de um paciente portador do HIV (faixa etária de 31 a 40 anos). Ocorreu também, predominância da micose no sexo masculino em todas as faixas etárias (Moreira et al., 2006). Geralmente a criptococose é descrita em pacientes de todas as idades, contudo, ocorre com mais frequência em adultos jovens e pessoas de meia idade, especialmente do sexo masculino (Rozenbaum & Gonçalves, 1994).

Apesar de ser considerada rara a ocorrência de criptococose em crianças pré-púberes estudos realizados no Brasil mostram a prevalência em adultos jovens, tanto no sexo feminino quanto no masculino, e crianças das regiões Norte e Nordeste, com considerável letalidade (Cavalcanti, 1995)(Corrêa et al., 1999). O predomínio da espécie *C. gattii* em estudo de isolados do Norte e Nordeste brasileiros ressaltou a necessidade de serem realizados estudos multicêntricos sobre a criptococose nessas regiões, provavelmente áreas de alta endemicidade de infecções por *C. gattii* (Cavalcanti MAS, 1995). Outro relato interessante foi de Severo et al. (2001) (Severo et al., 2001), que publicaram caso clínico de paciente adulto jovem, imunocompetente e infectado por *C. gattii*, na cidade de Porto Alegre (Severo et al., 2001).

Martins, (2003) descreveram 387 casos de criptococose em duas regiões geográficas do Brasil no período de 1987 a 1998. Tal estudo demonstrou que a criptococose por sorotipo B foi claramente predominante na região Nordeste com 87,5% (28 de 31 pacientes sem AIDS) e 47% (7 de 15 pacientes sem AIDS) na região Sudeste. Acredita-se que o aprimoramento das condições laboratoriais para o diagnóstico em diversas regiões e a diferenciação das espécies de *Cryptococcus* tenha favorecido o aumento da detecção da criptococose causada por *C. gattii* (Martins LMS, 2003).

Segundo dados do Sistema de Internação Hospitalar do Sistema Único de Saúde -SIH-SU- e do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde -DATASUS- do Brasil, a criptococose tem sido a mais prevalente dentre as micoses sistêmicas. O número de internações

registradas, de pacientes com criptococose, no período de 2000 a 2007 atingiu o número de 702 em todo o Brasil (Ministério da Saúde Secretaria de Vigilância em Saúde, 2012).

1.3 Fatores de virulência

C. neoformans e *C. gattii* apresentam diversos fenótipos de virulência, dentre eles destacam-se o crescimento à **temperatura de 37°C**, **cápsula** de natureza polissacarídica e produção de **melanina** catalisada por enzima difenoloxidase (Casadevall A & Perfect JR, 1998) (Casadevall, Rosas, & Nosanchuk, 2000). Além do mais, ambas as espécies são caracterizadas por possuir vias bioquímicas de biossíntese de manitol e produção de **proteínases**, fosfolipases e ureases, que também são considerados fatores de virulência (Casadevall A & Perfect JR, 1998).

A **cápsula** é constituída principalmente por glucuronoxilomanana (GXM). Estudos indicam que este polissacarídeo corresponde a mais de 90% da massa capsular, seguida de Galactoxilomanana (7%) e manoproteínas (3%) (Zaragoza et al., 2009) (Mitchell & Perfect, 1995) (Casadevall A & Perfect JR, 1998). A capsula representa importante mecanismo de defesa da levedura através da inibição da fagocitose, migração de leucócitos, alteração da secreção de citosinas e bloqueio do sistema complemento do hospedeiro (Kozel, 1995) (Xie et al., 2012). Mutantes hipo-capsulados ou acapsulados têm sido descritos devido à alteração de vários genes envolvidos na síntese e formação da cápsula polissacarídica. Esses mutantes mostraram-se menos virulentos do que cepas normais. Somando a isso, a cápsula aumenta consideravelmente de tamanho dependendo dos diferentes sítios da infecção (Rivera et al., 1998) (Chang & Kwon-Chung, 1994). Foi observado que isolados incubados em meio Sabouraud com 0,1% de glicose induz o aumento da expressão de cápsula (Okabayashi et al., 2005).

C. neoformans e *C. gattii* possuem o gene *CNLAC1* de cópia única que codifica a fenol-oxidase, enzima que catalisa a biossíntese da **melanina**. Foi observada a redução de virulência quando ocorre a deleção deste gene (Salas et al., 1996). Estas duas espécies patogênicas do gênero *Cryptococcus* possuem um tipo particular de fenoloxidase, que é uma lacase, cujo estudo tem contribuído para maior compreensão dos mecanismos de patogenicidade e regulação da resposta ao estresse no ambiente da célula hospedeira (Zhu & Williamson, 2004)

A melanina age como antioxidante, protegendo a integridade celular e interferindo com a susceptibilidade aos antifúngicos, além de proteger a célula das temperaturas extremas e anulação dos anticorpos mediadores da fagocitose (Kwon-Chung and Rhodes, 1986) (Williamson, 1997a). É importante mencionar que existem diferentes tipos de melanina, que são macromoléculas formadas pela polimerização oxidativa de compostos fenólicos ou indólicos (Langfelder et al., 2003).

Em natureza, as bactérias, plantas, animais e fungos expressam diferentes tipos de melanina, tais como: feomelanina, piomelanina, alomelanina e eumelanina, sendo este último tipo produzido por *C. neoformans* e *C. gattii* e formado por complexo que envolve quinonas e radicais livres. As melaninas são insolúveis em água e solventes orgânicos, por conseguinte difíceis de serem estudadas por técnicas biofísicas e bioquímicas convencionais (Frasas et al., 2007) (Gómez & Nosanchuk, 2003).

Na célula leveduriforme de *Cryptococcus* a melanina é depositada na parede e quando isolada do fungo, apresenta-se estruturalmente semelhante ao formato da célula, denominada fantasma “*ghosts*”. Estas partículas foram visualizadas com ajuda de microscópio eletrônico de transmissão e microscópio eletrônico de varredura, também foi observada presença de partículas granulares arredondadas de melanina com cerca de 40-130 nm de diâmetro, e que a melanina esta disposta em uma ou mais camadas concêntricas que formam os “*ghosts*”. O uso de espectroscopia de ressonância magnética nuclear e Crioporometria permitiram observar, nos “*ghosts*”, poros entre 1 e 4 nm e um pequeno número de poros com diâmetro de 30 nm; foi observada também ligação de anticorpos à melanina e que estes reduzem aparentemente o volume desses poros. Isto sugere um mecanismo para o seu efeito anti-fúngico (Eisenman et al., 2005).

Estudos *in vitro* demonstraram que as interações de proteína com melanina dependem do pH e da quantidade de proteínas presentes. Também foi demonstrado que células melanizadas apresentaram-se menos susceptíveis à morte por três péptidos microbicidas: uma defensina, uma protegrina e uma magainina. Observou-se que as células apresentaram-se mais sensíveis aos peptídeos microbicidas na ausência da melanina. A ligação de proteínas microbicidas à melanina sugere função protetora para esta, pois sequestra os peptídeos microbicidas e anula sua atividade (Doering et al., 1999).

Estudos realizados relatam que as proteinases produzidas em meio de cultura, são capazes de digerir proteínas do plasma humano, e na inoculação de *C. neoformans* por via

intravenosa, em camundongos T- cell deficientes foi observado lesão dos tecidos destes (Buchanan & Murphy. 1998).

Há estudos sugerindo que a fosfolipase liberada pelas leveduras degradam o tecido e facilitam a entrada da levedura nas células do hospedeiro, porém são necessários mais estudos para confirmação do papel da fosfolipase na virulência (Buchanan and Murphy. 1998).

Em estudo recente foi demonstrado o papel da urease na virulência de *Cryptococcus*, pois se sabe que a produção de urease por este está implicada na invasão do tecido cerebral do hospedeiro (Arpita et al., 2013).

Com relação aos **tipos sexuais** de *C. neoformans* e *C. gattii*, em modelos experimentais, observou-se que o tipo sexual α demonstrou ser mais virulento do que o tipo sexual *a*, (Kwon-Chung, Edman, & Wickes, 1992b). O tipo sexual α predomina nos isolados clínicos, reafirmando seu potencial de virulência, sugerindo que este tipo tem vantagem seletiva na sobrevivência no meio ambiente (Wickes BL et al., 1996).

1.4 Epidemiologia

C. neoformans é predominantemente oportunista, cosmopolita, acompanha a prevalência dos casos de condição de risco, tais como AIDS, linfomas, leucemias, lupus eritematoso, gravidez, transplante de órgãos sólidos, câncer, sarcoidose, doenças autoimunes, diabetes e tuberculose, além de drogas imunossupressoras (Lazera MS et al., 2005).

A partir de 1996, foi iniciada a terapia antirretroviral no Brasil. Este tipo de terapia, permitiu aumento da sobrevivência e melhoria de qualidade de vida dos pacientes infectados com HIV. No entanto, para que a terapia seja eficaz, é necessário que os usuários tenham uma excelente adesão aos esquemas prescritos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Em informe epidemiológico da AIDS fevereiro, 2013 no estado do Ceará foi observado, um decréscimo na taxa de mortalidade, no período de 1996 a 1998, no entanto de 1999 a 2003 ocorreu discreto aumento desta taxa. A partir de então continua ocorrendo discreto aumento da taxa de mortalidade tanto no sexo feminino quanto no masculino, sendo superior no sexo masculino (GOVERNO DO ESTADO DO CEARÁ, 2013).

Além do mais, cerca de 38 mil casos de AIDS por ano são registrados no Brasil e estima-se que aproximadamente 700 mil pessoas vivam com HIV no país. Desses, 255 mil não estão cientes de sua condição (Secretaria de Vigilância em Saúde Ministério da Saúde, 2012).

Análise de dados realizada pelo Ministério da Saúde demonstraram que dos casos de AIDS notificados entre 2000 e 2007 no Brasil, 4,4% apresentavam criptococose como primeira manifestação oportunista. Já nos centros de referência da região Sudeste estimou-se a prevalência desta doença associada à AIDS entre 8 e 12%. Esta forma da criptococose ocorre em todas as regiões brasileiras, principalmente nas regiões Sud, Sudeste e Centro Oeste (CO) (Oliveira-Netto et al., 1993)(Casali et al., 2003).

A Criptococose é a mais importante infecção oportunista relacionado à HIV/AIDS principalmente nos países em desenvolvimento, Park et al. (2009) realizaram estimativa de casos de meningites, baseados em dados publicados da África Subsaariana, Europa Ocidental e Central, e Oceania, nesse estudo foi verificado que ocorrem aproximadamente 1 milhão de casos anualmente e 625.000 mortes após 3 meses da infecção (Park et al., 2009).

C. gattii ocorre principalmente em regiões tropicais e subtropicais e acomete hospedeiros que aparentemente não apresentam doença de base ou imunodepressão, comportando-se como agente patogênico primário (Lazera MS et al., 2005). Existem relatos de surgimento de criptococose causadas por *C. gattii* em regiões com clima temperado marítimo (Fyfe et al., 2008).

Estudos realizados no Brasil mostram a prevalência em adultos jovens, tanto no sexo feminino quanto no masculino, e crianças das regiões Norte e Nordeste, com considerável letalidade (cerca de 40%) (Cavalcanti, 1995)(Santos LO, 2000)(Martins, 2003).

1.5 Epidemiologia molecular de *C. neoformans* e *C. gattii*

Em estudos de tipagem molecular dos agentes da criptococose são utilizado métodos diferentes, tais como: *PCR-fingerprinting*, *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) do gene URA5 e *Amplified fragment length polymorphism* (AFLP). Quando comparados os resultados de RFLP/AFLP foi observado correspondência entre si, assim como relação com os sorotipos. Por exemplo, para a espécie *C. neoformans* VN1/AFLP1, sorotipo A; VNII/AFLP1A, sorotipo A; VNIII/AFLP3, sorotipo AD; VNIV/AFLP2, sorotipo D. E para *C. gattii* VG1/AFLP4; VGII/AFLP6; VGIII/AFLP5; VGIV/AFLP7 podem ser sorotipo B ou C (Meyer et al., 1999)(Kidd et al., 2004b).

Na análise de 443 isolados brasileiros de *C. neoformans* e *C. gattii*, o tipo molecular mais comum encontrado foi VNI (64%), seguido por VGII (21%), VNII (5%), VGIII (4%), VGI e VNIV (3% cada), e VNIII (<1%). Verificou-se que o tipo molecular VGII (sorotipo B, MAT alfa) é responsável pela criptococose primária com prevalência em hospedeiros imunocompetentes no Norte e Nordeste, revelando um padrão endêmico regional para este tipo molecular específico no norte do Brasil (Luciana Trilles et al., 2008).

Em análise de amostras de poeira em peridomicílio de indivíduos com criptococose, em Belém do Pará, Brasil, observou-se o predomínio do tipo molecular VNI dentro da espécie *C. neoformans* e tipo VGII na espécie *C. gattii*. (Costa et al., 2009).

Em estudo realizado por Ribeiro (2008) em amostras ambientais, de excretas de aves, dentro da cidade de Vitória, Brasil, todas apresentaram o tipo molecular VNI (Ribeiro & Ngamskulrunroj, 2008). Estes dados coincidem com achados anteriores em cepas provenientes do Rio de Janeiro (RJ) e Belo Horizonte (MG) e reproduzem no Brasil o padrão cosmopolita observado para esta espécie, principalmente associado a habitat de aves, sugerindo dispersão global, predominantemente clonal, de tipo VNI (Franzot et al., 1997).

Estudo molecular de isolados de *Cryptococcus* em países Ibero-americanos, como: Argentina, Brasil, Chile, Colômbia, México, Peru, Venezuela, Guatemala e Espanha, a maioria dos isolados de *C. neoformans* foram VNI (sorotipo A), que reafirma o padrão mundial observado para criptococose associado a AIDS (Meyer et al., 2003).

Com relação à criptococose primária, usualmente causada por *C. gattii*, chamam atenção os diferentes padrões geográficos observados. Enquanto que o tipo molecular VGI predomina em casuísticas globais, principalmente na Austrália e países da Ásia. O tipo VGII predomina como agente endêmico de meningite criptocócica no Norte/Nordeste do Brasil (Santos et al., 2008) (Trilles et al., 2008). Por outro lado, este mesmo tipo molecular VGII apresenta um caráter epidêmico descrito em Vancouver, Canadá, e mais recentemente no Sudoeste dos Estados Unidos causando infecções em humanos e animais (Meyer et al., 2003) (Kidd et al., 2004a) (Datta et al., 2009).

1.6 Drogas Antifúngicas

Anfotericina B (AMB) é um antibiótico poliênico, produzido por espécies de *Streptomyces* encontradas no solo, sendo o antifúngico mais comumente usado em formas disseminadas de micoses. Ao combinar-se com esteroides da membrana plasmática do fungo,

aumenta excessivamente a permeabilidade, levando-o à morte. O fator limitante para seu uso é a toxicidade celular, sendo frequente a nefrotoxicidade, principalmente na forma de deoxicolato (Tortora et al., 2000).

Os compostos azólicos fazem parte de um grupo de antifúngicos sintéticos que possuem ação fungistática (Lipp, 2008). O mecanismo de ação destes consiste na inibição da enzima lanosterol-dimetilase, a qual impede que o lanosterol se converta em ergosterol causando aumento da permeabilidade celular e alterando a estrutura e a função da membrana plasmática (Sanglard, 2002). O alvo dos compostos azólicos é mediado pelo citocromo P450 14 alfa-esterol demetilase (Lamb et al., 1995). Antes do seu uso terapêutico, devem ser levados em conta seus efeitos sobre o sistema endócrino e reprodutor, assim como sua toxicidade hepática e renal (Tortora Gerard J, Berdell R Funke, Chistrine L Case, 2000).

O triazólico voriconazol (VRZ) é reconhecido como um antifúngico de largo espectro. É utilizado para o tratamento de micoses invasivas tais como: aspergilose, candidemia em doentes não neutropênicos, *Candida* spp. resistentes ao fluconazol (incluindo *Candida krusei*) *Cryptococcus*. Com relação ao efeito citotóxico, está relatado que quando administrado por via oral não compromete a função renal. O mecanismo de ação do VRZ se dá pela inibição do citocromo P450 do fungo mediado pela desmetilação do 14 alfa-lanosterol, etapa essencial na biossíntese do ergosterol dos fungos. Consequentemente ocorre acúmulo do esteroide 14 alfa-metilo e que provoca a perda de ergosterol na membrana da célula fúngica. Este fato pode ser responsável pela atividade antifúngica. O VRZ demonstrou ser mais seletivo para as enzimas fúngicas do citocromo P450, do que nos diferentes sistemas enzimáticos do citocromo P450 dos mamíferos (LABORATÓRIOS PFIZER LTDA, 2013).

A pirimidina fluorada flucitocina ou 5-fluorocitosina (5FC) possui um átomo de flúor no carbono 5. É um anti-metabólito das bases citosina e uracila que interfere com a síntese de DNA e RNA. Este antifúngico penetra no citoplasma da célula fúngica através de uma permease, sendo então convertido por desaminação em 5-fluorouracil, que substitui a uracila na molécula de RNA, provocando alteração na síntese protéica. Outro metabólito produzido é 5-fluorodesoxiuridílico, que interfere na síntese de DNA. As células dos mamíferos não convertem grandes quantidades de 5FC em 5-fluorouracil, o que determina a ação seletiva deste composto (Sande, 1987). A toxicidade nos rins e na medula óssea são fatores limitantes para seu uso (Tortora Gerard J, Berdell R Funke, Chistrine L Case, 2000). Os efeitos colaterais

podem ser anemia, leucopenia e trombocitopenia, náuseas, vômitos, diarreia e enterocolite grave e hepatomegalia (Sande, 1987).

1.7 Tratamento

No período anterior à década de 1950, vários pesquisadores tentaram diferentes tipos de tratamento para a evolução fatal da criptococose disseminada. Em 1929, tentou-se a soroterapia sem resultados favoráveis e, em 1943, Lewis & Happer recomendaram o emprego de violeta de genciana em solução aquosa por via raquiana nos casos graves. Na década de 1950, a AMB tornou-se a medicação de grande valor no tratamento da criptococose (Lacaz et al., 2002).

Na década de 1970, a 5FC demonstrou atividade contra *C. neoformans*, mas o surgimento de resistência a esta droga levou a utilização de esquemas combinados com AMB, que demonstrou melhor eficácia tanto em relação ao tempo de tratamento quanto ao prognóstico (Lacaz et al., 2002).

Na década de 1980, surgiram os derivados azólicos fluconazol (FLZ) e itraconazol (ITZ), os quais demonstraram atividade antifúngica no tecido cerebral. No entanto, tem sido observado que o FLZ atravessa melhor a barreira hematoencefálica do que o ITZ (Lazera et al., 2005).

Para o tratamento de pacientes com primeiro episódio de AIDS associada à meningite criptocócica, foi comparada a atividade de três agentes antifúngicos com doses diárias de: AMB (0,7 mg / kg / dia); AMB mais 5FC (100 mg / kg / dia); AMB mais fluconazol (400 mg diariamente) e tripla terapia (AMB+5FC+FLZ). Este estudo permitiu concluir que nas doses diárias mencionadas a atividade fungicida mais eficaz ocorreu no tratamento de AMB e 5FC combinadas, sendo que a adição de 5FC permitiu observar uma menor proporção de pacientes com recaída e “esterilização” do LCR em menos de duas semanas (Brouwer et al., 2004).

Outros estudos demonstraram que o aumento da dose de AMB para 1mg / kg por dia, associado à dosagem de 5FC 100 mg / kg / dia, apresentou atividade fungicida significativamente maior sem provocar efeitos colaterais significativos (Bicanic et al., 2008). Uma estratégia encontrada para reduzir a toxicidade do tratamento convencional com AMB é o uso das formulações lipídicas desta droga. Em teste realizado usando AMB lipossomal (AmBisome) 4 mg / kg / dia e AMB desoxicolato 0,7 mg / kg / dia por 3 semanas, cada um, seguido de FLC 400 mg/dia por 7 semanas, foi demonstrado que apesar de a eficácia ser a

mesma para os dois grupos testados, a AMB lipossomal mostrou-se menos nefrotóxica (Leenders et al., 1997).

A sociedade americana para diretrizes de doenças infecciosas no ano 2000 desenvolveu guia para o tratamento da criptococose, baseado em relatos e consensos de “experts” na área. No ano de 2010, incluíram novas seções onde apresentaram recomendações, para o tratamento da meningoencefalite criptocócica em três grupos de risco, 1-indivíduos infectados pelo HIV; 2- receptores de órgãos transplantados; 3- hospedeiros que não pertencem ao grupo 1 e 2. Nesse guia deram ênfase a complicações no tratamento da infecção por *C. neoformans*. Para tal foi recomendado terapia de indução fungicida, como uso de polyene (AMB) e 5FC, seguido por regimes supressivos usando FLZ; dentre várias recomendações foi ressaltada a importância do reconhecimento precoce, tratamento da pressão intracraniana e uso de formulações lipídicas de AMB em pacientes com insuficiência renal (Perfect et al., 2010).

1.8 Combinação de drogas.

A combinação antimicrobiana é encorajada pelo reconhecimento ou suspeita de infecção polimicrobiana, minimização da toxicidade, redução da dose usada na monoterapia, assim como minimização da probabilidade de surgimento de subpopulações resistentes e tentativa específica para obter efeito sinérgico antimicrobiano (Eliopoulos and Eliopoulos, 1988).

Em estudo recente, realizado por Day, et al., (2013), foram comparados o tratamento com AMB + 5FC; AMB + FLZ e AMB usada isoladamente. Neste estudo, foi avaliado um grupo de 299 pacientes com AIDS e meningite criptococcica em três grupos de estudo divididos randomicamente. Todos os pacientes receberam 1mg/ kg / dia de AMB; o segundo grupo recebeu 100 mg/ kg / dia de 5FC e o terceiro grupo recebeu 400 mg de FLZ duas vezes por dia. Os pacientes do primeiro grupo receberam tratamento durante quatro semanas e os outros dois grupos receberam duas semanas de tratamento. Assim, foi concluído que a associação AMB+5FC aumenta a sobrevida dos pacientes com meningites enquanto que no tratamento com AMB+FLZ não foi observado aumento da sobrevida dos referidos pacientes (Day, Chau, & Lalloo, 2013).

Entende-se por sinergismo a interação entre drogas onde uma substância (fármaco B) aumenta o efeito da outra (fármaco A). Por outro lado pode ocorrer, antagonismo, isto é quando uma droga (fármaco B) diminui o efeito da outra (fármaco A). Podem ocorrer dois tipos de sinergismo: **1.** Sinergismo por adição, onde o efeito da droga A soma-se ao efeito da droga B (Mesmo mecanismo de ação); **2.** Sinergismo por potenciação, onde o efeito obtido é maior que a somatória dos efeitos das drogas A e B, isoladamente, mesmo que o efeito máximo de cada uma das drogas já tenha sido alcançado (mecanismos de ação diferentes) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

As falhas frequentes na monoterapia em pacientes imunodeprimidos com micoses invasivas podem ser superadas com combinação de antifúngicos, já demonstrada *in vitro*, em modelo animal e estudos clínicos (Antoniadou and Kontoyiannis, 2003).

A combinação antifúngica *in vitro* é realizada utilizando a técnica de tabuleiro de xadrez, na qual observa-se múltiplas diluições dos antifúngicos formados nos poços da placa, neste teste é possível combinar manualmente concentrações de dois antifúngicos diferentes em uma placa de microtitulação. Apesar de terem sofrido diferentes modificações a metodologia mais utilizada é a de Ruiz-Cedoya et al. (2008) (Ruíz-Cedoya et al., 2008) e Carl L. Pierson et al. (1994) (Carl L. Pierson, 1994).

1.9. Resistência a drogas antifúngicas

A resistência a drogas terapêuticas tornou-se problema porque engloba uma diversificada gama de sistemas biológicos que têm impacto no ser humano e nos microrganismos, tais como bactérias, fungos, protozoários. A resistência à droga diminui a possibilidade de oferecer um tratamento bem sucedido contra inúmeras doenças. Este problema é preocupante, e conseqüentemente tem proporcionado estímulo na promoção da investigação sobre a resistência a drogas em geral (Borges-Walmsley, McKeegan, and Walmsley, 2003).

Em geral, têm sido reconhecidos três mecanismos de resistência aos compostos azólicos. **1.** Redução de acúmulo de droga dentro da célula fúngica, relacionado ao aumento da excreção da droga, devido à atividade aumentada das bombas de efluxo ao fluconazol, como consequência da expressão de gene MDR. **2.** Alteração da enzima 14 α desmetilase que resulta na redução do alvo de ligação para o composto azólico. **3.** Alterações na via de biossíntese do ergosterol e excessiva expressão da enzima 14 α desmetilase alvo, devido à

amplificação do gene. (Sullivan et al., 2004)(Malcom D. Richardson, David W. Warnock, 1997).

O mecanismo de resistência de *C. neoformans* não tem sido amplamente investigado como em outros fungos. A mutação do gene ERG11, expressão excessiva de transportador ABC e AFR1 foram relatados como causa de resistência para FLZ em uma cepa de *C. neoformans* induzido em laboratório (Rodero et al., 2003)(Sionov et al., 2010).

Foi demonstrado que a duplicação de cromossomos está intimamente associada com os dois genes de resistência, ERG11 e AFR1 o principal transportador de azólicos em *C. neoformans* (Sionov et al., 2010). Na análise de um clone MRL862, de *C. neoformans* com resistência inata a 128 µg/mL de FLZ, capaz de tolerar 400 µg/mL de FLZ, foi verificado que por passagens sucessivas em meio livre de droga, retorna a seu estado inicial (128 µg/mL) perdendo o cromossomo 1 extra adquirido. Isto permite concluir que a mutação em ERG11 não interfere com o mecanismo de heteroresistencia. Estes achados ressaltam a importância da realização dos testes de suscetibilidade para azólicos, além da escolha apropriada do tratamento em pacientes infectados com *C. neoformans* resistentes ao FLZ (Sionov et al., 2012).

1.10 Heteroresistencia

As meningoencefalites causadas por *C. neoformans* e *C. gattii* são inicialmente tratadas com AMB seguida de regimes supressivos com uso de FLZ (Perfect et al., 2010) A terapia de supressão e manutenção com o uso de FLZ, em infecções causadas por *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp. vem sendo utilizada desde 1990. Desde então, o FLZ tem sido amplamente usado (Brion, Uko, and Goldman, 2007).

A heteroresistência em *C. neoformans* é um tipo de resistência intrínseca adaptativa para azólicos e o fenótipo desta resistência está associado à dissomia de dois cromossomos, (Chr1) e (Chr4). Esta dissomia tem a ver com a sobrevivência de *C. neoformans* em altas concentrações de FLZ *in vitro*. Sendo assim, o fenótipo de heteroresistencia é identificado quando uma fração de um grupo populacional de células pode crescer em altas concentrações de FLZ, sendo estas maiores do que a sua CIM inicial (Ngamskulrungraj et al., 2012) (Sionov et al., 2009). A definição de heteroresistencia não se refere unicamente a isolados clones (provenientes de uma colônia) com CIMs $\geq 16\mu\text{g/mL}$, já que este conceito contempla também

clones que apresentam suscetibilidade distinta frente a uma determinada concentração de FLZ (Sionov et al., 2009).

Sionovo et al. (2010), realizaram um estudo comparativo de hibridação genômica e PCR em tempo real, a fim de demonstrar que *C. neoformans* sorotipo A e D adaptam-se a altas concentrações de FLZ por duplicação de cromossomos, em resposta ao estresse frente a elevadas concentrações de FLZ. Nesse estudo foi verificado que isolados que toleravam altas concentrações de FLZ, em relação a seu CIM inicial, apresentavam duplicação do Chr1, assim como duplicação de outros cromossomos específicos em decorrência ao aumento progressivo da concentração da droga. No entanto, após a remoção de FLZ, por passagens sucessivas em meio livre desta droga, os isolados heteroresistentes voltam ao nível de suscetibilidade inicial com perda da cópia extra do Chr1 seguido da perda das cópias adicionais dos demais cromossomos dissômicos (Sionov et al., 2010).

Yamazumi et al. (2003) observaram que isolados heteroresistentes demonstram ser reversíveis em oito passagens sucessivas em meio livre de FLZ, com exceção de um isolado que se manteve resistente em 13 passagens. Estes resultados sugerem que o fenótipo heterorresistência para o FLZ de *C. neoformans* existe em uma proporção significativa dos isolados clínicos e que a resistência para FLZ pode ser desenvolvida pela seleção de clones heterorresistentes e indução pela exposição ao FLZ (Yamazumi et al., 2003).

Em estudo realizado com *C. gattii* isolados antes e depois do advento dos azólicos com a finalidade de verificar o nível de heteroresistência desta espécie, foram analisados 71 isolados de *C. gattii*, de origem clínica (42) e ambiental (29). Nesse estudo foi usado o método E-TEST para verificar as CIMs e verificou-se que 86% dos isolados apresentaram heterorresistência variando entre 4 e 32 µg/mL. No entanto, não foi encontrada correlação significativa na análise da variação da heteroresistência, considerando os tipos moleculares ou sorotipos. Interessantemente, os isolados que apresentavam maior heteroresistência também apresentaram maior resistência a xenobióticos, em relação a isolados com menor heterorresistência. De igual forma, foi observado que isolados com alta heterorresistência são mais virulentos do que aqueles com baixa heterorresistência. Isto sugere que isolados de *C. gattii* de origem ambiental sem previa exposição ao FLZ também apresentam heterorresistência para este azólico (Varma & Kwon-Chung, 2010). Este mecanismo é reconhecido como intrínseco e está associado com a virulência do isolado (Varma & Kwon-Chung, 2010).

Foi observado também que *C. gattii* pode ter maior predisposição para tolerar altos níveis de certos xenobióticos do que isolados de *C. neoformans* (Varma & Kwon-Chung, 2010).

1.11 Bombas de efluxo

É importante o entendimento do funcionamento dessas bombas de efluxo, já que podem acomodar uma grande variedade de compostos e sofrer mudanças conformacionais para translocação dos substratos (Borges-Walmsley, McKeegan, & Walmsley, 2003).

O principal mecanismo de resistência em bactérias, fungos, protozoários e células complexas humanas cancerosas é a *adenosine triphosphate - binding cassette (ATP binding cassette - ABC)*, que são proteínas de membrana que expulsam drogas da célula. Células resistentes aproveitam ou exploram o transportador ABC para expulsar drogas citotóxicas que costumam entrar na célula por difusão passiva. Embora algumas dessas bombas de efluxo de transporte de drogas e substratos sejam específicos, muitos são transportadores de múltiplos substratos. Estas bombas de múltiplas drogas podem muitas vezes realizar transporte de compostos hidrofóbicos, corantes e lipídios (Borges-Walmsley, McKeegan, and Walmsley, 2003).

Para verificar a presença e atividade das bombas de efluxo (*ATP-binding cassette – ABC*) na citometria de fluxo são usados os diferentes fluorocromos, *acetoximetil - calceína* (calceína-AM), *acetoximetil - 2', 7' -bis-(2-carboxietil)-5-(e -6)- carboxifl uoresceína* (BCECF-AM), *rodamina 123* (Rh123) e *iodeto de 3, 3' -dipentiloxacarbocianina* (DiOC5). Assim como anticorpos ou lectinas conjugados com fluorocromos como a fluoresceína e ficoeritrina (Prudêncio et al., 2000).

As características dos compostos fluorescentes daunorubicin e doxorubicin detectam linhagens celulares que expressam MDR de células não resistentes. A detecção de proteínas MDR com sondas fluorescentes permite observar bloqueio funcional da atividade das bombas de efluxo (Balzi and Goffeau, 1991).

1.12 Indução da resistência a drogas *in vitro*

A resistência de leveduras a compostos azólicos pode ser induzida em condições *in vitro* como já descritas em protocolos utilizando isolados clínicos de *Candida dubliniensis*.

(Nonaka, 2008). A indução de resistência a drogas, principalmente azólicos, tem permitido entendimento dos mecanismos de resistência através de análises moleculares (Moran et al., 1997). Por outro lado, a indução da resistência aos antibióticos permite observar mutações que resultam na mudança ou perda de uma ou toda uma sequência de aminoácidos (Brusick, 1972). Em estudos de *Saccharomyces* sp. com resistência induzida a cicloheximida foi verificada alteração na integridade estrutural nos ribossomos (Brusick, 1972).

1.13 Testes de suscetibilidade aos antifúngicos *in vitro*

The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) anteriormente conhecido como *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) desenvolveu método de referência, reconhecido como teste padrão de referência (Norma M27-A3) utilizando testes de diluição em caldo para determinar a suscetibilidade *in vitro* de leveduras frente a agentes antifúngicos, com proposta de leitura visual ou espectrofotométrica e tempo de incubação de 24 a 48 horas para o gênero *Candida* e de 48 horas para o gênero *Cryptococcus*. Este documento facilita a comparação de resultados entre diferentes laboratórios na determinação da suscetibilidade de leveduras (CLSI, 2008).

The Antifungal Susceptibility testing Sub-committee of the European on Antimicrobial Susceptibility Testing (AFST-EUCAST) desenvolveu protocolo baseado na primeira edição do documento do NCCLS M27 – A, introduzindo modificações tais como o aumento da quantidade do inóculo (cem vezes maior em relação ao método NCCLS/CLSI) e incremento da concentração final de D-glicose para 2% (dez vezes maior que o método NCCLS/CLSI) com o objetivo de alcançar a leitura do ponto de corte em 24 horas. Sucessivos estudos realizados demonstraram bons resultados na análise comparativa interlaboratorial utilizando esta metodologia (Vale-Silva & Buchta, 2006).

Diversas metodologias vêm sendo testadas como alternativas para testes de suscetibilidade antifúngica, dentre estes se destacam: E-Teste (AB Biodisc, Sweden) baseada na difusão do antifúngico em meio sólido com o uso de fitas plásticas contendo gradiente de concentração de diferentes drogas, método de disco difusão em Agar M44-A (NCCLS/CLSI, 2004) considerado de fácil realização, com proposta de leitura em 24 e ou 48 horas e vários *kits* comerciais (Vale-Silva & Buchta, 2006). VITEK2 é um método comercial automatizado

que determina por espectrofotometria o crescimento de levedura, assim permite a identificação e determinação da CIM simultaneamente. Este sistema possui cartão AST-S01 projetado para testes de suscetibilidade de dupla microdiluição miniaturizada para ANFB, 5FC, FLC e VRZ e determina a CIM em $\mu\text{g/mL}$. VITEK2 apresenta certa vantagem por possuir cartões prontos para identificação e testes de susceptibilidade, já que podem ser realizados simultaneamente, além de obter resultados em menor tempo de incubação. Embora, na obtenção de isolados resistentes recomenda-se a verificação do resultado com o método CLSI M27-A3 que é reconhecido como padrão ouro (Cuenca-Estrella et al., 2010).

O aumento no interesse das pesquisas em relação à sensibilidade antifúngica nos últimos dez anos tem contribuído para o aprimoramento da metodologia, principalmente na determinação da resistência a antifúngicos. Estudos realizados com gênero *Candida*, testadas frente a derivados azólicos, apresentaram crescimento residual ou efeito *trailing* em todas as concentrações das drogas utilizadas, particularmente após 48 horas de incubação (Revankar et al., 1998) (Arthington-Skaggs, 2000). Por esse motivo padronizaram-se pontos de corte para leituras em 24 horas e 48 horas (CLSI, 2008).

1.14 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é reconhecida como método moderno para estudo de células, onde podem ser analisadas várias propriedades físicas e biológicas, tais como: caracterização fenotípica das células, tamanho e granularidade celular e avaliação funcional e diferenciação de diversas características celulares intrínsecas como: conteúdo de DNA e RNA, modulação de receptores de superfície, produção de citocinas e cálcio mitocondrial, estado redox da célula e fluidez da membrana intracelular, atividade enzimática, apoptose e morte celular, pH intracelular, potencial de membrana plasmática. A análise de dados é feita através de programas computacionais nos quais histogramas de parâmetro único e parâmetros bivariantes, permitem a determinação da análise de fluorescência. Esta intensidade fornece dados de média, mediana, coeficiente de variação e da distribuição celular (Bacal, 2003).

Os fluorocromos marcam componentes celulares estruturais e funcionais, ligando-se especificamente e distribuindo-se em compartimentos celulares como núcleo, mitocôndria e vacúolo. Dentre os fluorocromos usados no teste de susceptibilidade antifúngica, destaca-se iodeto de propídeo (PI), que marca a molécula de DNA e emite fluorescência quando excitado

pelo laser do citômetro de fluxo (Dornelas, 2006). O fluorocromo Laranja de Acridina (LA), também é utilizado em testes de suscetibilidade, pois interage com DNA por intercalação e no RNA por atração eletrostática (Rudensky et al., 2005), utilizado também para determinação do ciclo celular (Darzynkiewicz, 1990).

O fluorocromo [2-cloro-4-(2,3dihidro-3-metil-(benzo-1,3-thiazol-2-il)-methilidene)-1fenilquinoliniumiodide] (FUN-1) é um composto cianina assimétrica halogenada, permeável à membrana citoplasmática, pela qual passa passivamente, independente de atividade metabólica da célula, expressando a cor verde-amarelo fluorescente no citoplasma. Na medida em que é metabolizado ativamente pela célula produz o acúmulo de pontos vermelho-laranja brilhantes, que representam estruturas cilíndricas intravacuolares, cuja intensidade aumenta progressivamente em células viáveis (Millard et al., 1997).

Estudos recentes destacaram que a citometria de fluxo, combinada com o método convencional CLSI M27-A2, é uma alternativa importante na análise da CIM e determinação da sensibilidade de leveduras frente a agentes antifúngicos, provando ser uma técnica com a qual se obtém bons resultados em menor tempo, em comparação com a metodologia convencional (Dornelas, 2006)(Vale-Silva & Buchta, 2006). Esta metodologia também tem sido utilizada para detectar a expressão de bombas de efluxo, demonstrando sua utilidade tanto nos testes de suscetibilidade *in vitro* quanto na verificação da atividade de bombas de efluxo como responsáveis pela resistência adquirida a antifúngicos em leveduras (Prudêncio et al., 2000).

2 JUSTIFICATIVA

O tipo molecular mais frequente de *C. neoformans* é VNI com dispersão global (Franzot et al., 1997), padrão também observado em criptococose oportunista no Brasil. No entanto com relação a criptococose primária, usualmente causada por *C. gattii*, observa-se o predomínio do tipo VGII no Norte e Nordeste do Brasil enquanto que o tipo VGI ocorre como causa de criptococose no Sul e Sudeste de nosso país, bem como regiões da Ásia e Austrália (Trilles et al., 2008). Tais diferenças epidemiológicas nos levaram a escolher estes tipos moleculares para o presente estudo.

Há necessidade de publicações sobre testes de suscetibilidade de *C. neoformans* e principalmente *C. gattii*, para melhor compreensão da sensibilidade deste complexo de espécies. A maioria de isolados clínicos de *C. neoformans* mostra-se sensível *in vitro* a FLZ, ITZ e AMB, entretanto há relatos de surgimento de isolados resistentes a 5FC (Chin, Cheong & Wong, 1989) (Sanglard, 2002) (Kantarcioglu et al., 2009). Com relação ao FLZ, antifúngico de uso em larga escala, observa-se surgimento de resistência *in vitro* e tem sido descrito em isolados de *Cryptococcus* obtidos de pacientes com meningite, submetidos à terapia prolongada ou como droga isolada na fase de indução (Posteraro et al., 2003).

Há relatos de que o tipo molecular está relacionado com a variação da suscetibilidade antifúngica *in vitro*, já que *C. gattii* VGII apresentou-se menos suscetível seguido dos tipos moleculares *C. gattii* VGI e *C. neoformans* VNI (Trilles et al., 2012) (Khan et al., 2009).

Atualmente o tratamento das formas graves de criptococose busca o uso combinado antifúngicos permitindo uma rápida redução da carga fúngica no tecido do hospedeiro, assim como, menor toxicidade possível. A terapia combinada de AMB + 5FC demonstram atividade fungicida mais rápida, quando comparada ao tratamento isolado com AMB. Nesta terapia combinada, observa-se menor proporção de pacientes com recaída, além de exames laboratoriais do LCR estéreis em menos de duas semanas (Brouwer et al., 2004).

A produção de melanina é um fenótipo vinculado às espécies patogênicas do gênero *Cryptococcus*, sendo que na lesão de sistema nervoso central já foi demonstrado o depósito de melanina na parede deste fungo (Pedroso et al., 2007). A melanina é reconhecida como fator de virulência e tem sido mencionada como possível fator que interfere na suscetibilidade aos antifúngicos (Kwon-Chung & Rhodes, 1986) (Williamson, 1997b). Nos meios de cultura para

fungos usados em laboratório de rotina, como Sabouraud e Mycosel, não ocorre indução da produção de melanina. Também nos testes padronizados pelo CLSI os meios utilizados não permitem a expressão desse fenótipo. Portanto, consideramos necessário testar e comparar a suscetibilidade antifúngica *in vitro* de células de *Cryptococcus* com e sem expressão de melanina.

A dificuldade no tratamento das micoses e frequente recaída estimula a busca de metodologias padronizadas e reprodutíveis para o estudo de suscetibilidade *in vitro*, bem como monitoramento do surgimento de isolados resistentes, além da seleção de novas drogas com potencial terapêutico. Este tem sido um desafio para o caso dos fungos relacionados a doenças humanas e de animais.

A principal vantagem da citometria de fluxo é a avaliação de diversos parâmetros em milhares de células individuais num curto espaço de tempo, o que permite inclusive, avaliar sub-populações diferentes como também analisar células vivas em suspensão. A citometria de fluxo é considerada uma ferramenta que permite a prática multidisciplinar, pois, beneficia avanços ocorridos em diversos campos como a imunologia, a biologia molecular, análises clínicas, testes de suscetibilidade *in vitro* etc. O uso de diferentes fluorocromos permitem identificar sub-populações distintas, portanto podem analisar-se grupos heterogêneos (Orfao et al., 1995).

Testes realizados com *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp. demonstraram que a citometria de fluxo associada ao uso de fluorocromos apresenta-se como alternativa, para obtenção de resultados rápidos e confiáveis em curtos tempos de incubação nos testes de microdiluição em caldo, padronizado pelo CLSI, para estudar a suscetibilidade *in vitro* de leveduras (Pina-Vaz et al., 2005)(Vale-Silva & Buchta, 2006). A citometria de fluxo tem sido utilizada também na verificação da atividade de bombas de efluxo, como responsáveis da resistência adquirida a drogas antifúngicas, assim é possível analisar padrões de resistência/suscetibilidade em leveduras (Prudêncio et al., 2000).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar fenótipos de susceptibilidade dos principais tipos moleculares relacionados à criptococose no Brasil comparando os tipos moleculares VNI de *Cryptococcus neoformans*, VGI e VGII de *Cryptococcus gattii*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Determinar o perfil da suscetibilidade *in vitro* de *C. neoformans* e *C. gattii* para obtenção da concentração inibitória mínima de fluconazol, itraconazol, 5-fluorocitosina, voriconazol e anfotericina B isoladamente e de forma combinada de anfotericina B com 5-fluorocitosina e anfotericina B com voriconazol;
- 2- Determinar concentração inibitória mínima por leitura em citômetro de fluxo nos testes de suscetibilidade de *C. neoformans* VNI e *C. gattii* VGI e GVII frente a fluconazol, itraconazol e anfotericina B;
- 3- Definir a concentração mínima letal de 5FC e AMB, testadas isoladamente e em combinação;
- 4- Avaliar a ação da melanina na suscetibilidade antifúngica de *C. neoformans* e *C. gattii* frente 5-fluorocitosina e anfotericina B na forma combinada e isolada de 5-fluorocitosina;
- 5- Induzir a resistência *in vitro* para fluconazol em isolados *C. neoformans* VNI e *C. gattii* VGI e VGII para padronizar os fluorocromos: *acetoximetil - calceína* (calceina-AM), *acetoximetil - 2', 7' -bis-(2-carboxietil)-5-(e -6)- carboxifl uoresceína* (BCECF-AM), *rodamina 123* (Rh123) e *iodeto de 3, 3' -dipentiloxacarbocianina* (DiOC5) na citometria de fluxo para verificar a expressão de bombas de efluxo.
- 6- Comparar a expressão de bombas de efluxo dos diferentes tipos moleculares antes e após indução *in vitro* de resistência ao fluconazol.

4. RESULTADOS

Resultados na forma de artigos científicos

CAPÍTULO I

(Artigo aceito para publicação)

O capítulo I aborda a determinação do perfil da suscetibilidade antifúngica *in vitro* de *C. neoformans* VNI e *C. gattii* VGI, para obtenção de CIM de fluconazol utilizando método padrão CLSI M27-A3 e citometria de fluxo. Estes resultados fazem parte dos objetivos específicos 1 e 2.

[Med Mycol.](#) 2013 Jul 1. [Epub ahead of print]

**Determination of the minimum inhibitory concentration of
Cryptococcus neoformans and *Cryptococcus gattii* against fluconazole by
flow cytometry.**

Determination of the minimum inhibitory concentration of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* against fluconazole by flow cytometry

BERNARDINA PENARRIETA MORALES*, IVAN NEVES JUNIOR*, LUCIANA TRILLES*, ÁLVARO LUIZ BERTHO†, RAQUEL DEVASCONCELLOS CARVALHAES DE OLIVEIRA*, MARILIA MARTINS NISHIKAWA‡, MÔNICA DOS SANTOS ELIAS*, BODO WANKE* & MÁRCIA DOS SANTOS LAZÉRA*

*Evandro Chagas Clinical Research Institute (IPEC), Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Rio de Janeiro,

†Immunoparasitology Laboratory, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, and ‡National Institute for Quality in Health, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

Recent studies have used flow cytometry (FCM) as an important alternative method to determine the antifungal susceptibility of yeasts compared to the broth microdilution Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) reference procedure. We present a comparative study of the broth microdilution method and flow cytometry to assess the *in vitro* antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* ($n = 16$) and *C. gattii* ($n = 24$) to fluconazole. The minimum inhibitory concentration (MIC) assays by flow cytometry were defined as the lowest drug concentration that showed ~50% of the count of acridine orange negative cells compared to that of the growth control. Categorical classification showed all *C. neoformans* isolates were susceptible to fluconazole. Three isolates of *C. gattii* were susceptible dose-dependent and the remaining 21 isolates were classified as susceptible. MICs comparison of both methodologies demonstrated 100% categorical agreement of the results obtained for *C. neoformans* and *C. gattii*. The MICs obtained with the CLSI-approved method and flow cytometry were compared by the Spearman correlation test and a significant $P_v = 0.001$. The flow cytometric method has the advantage of analyzing a large and constant number of cells in less time, i.e., 9 h incubation for fluconazole using acridine orange versus 72 h for broth microdilution method. In conclusion, the two methods were comparable and flow cytometry method can expedite and improve the results of *in vitro* susceptibility tests of *C. neoformans* and *C. gattii* against fluconazole and also allows comparative studies *in vitro/in vivo* more rapidly, which along with clinical data, could assist in selecting the most appropriate treatment choice.

Keywords flow cytometry, antifungal susceptibility, *Cryptococcus*

Introduction

Cryptococcus neoformans is a pathogenic fungus, the cosmopolitan agent of fungal meningoencephalitis in immune-compromised patients [1] including a high number

of occurrences in acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)-related deaths in sub-Saharan Africa [2], as well as being recognized as an important infectious agent throughout the world [3]. The mortality rate in infections caused by this fungus is still high, especially when diagnosis is delayed and the access to highly active antiretroviral therapy (HAART) in AIDS patients is limited [4].

Cryptococcus gattii, a close sibling species of *C. neoformans*, is endemic in tropical and subtropical climates [5], causing meningoencephalitis with high death

Received 30 November 2012; Received in final revised form 28 February 2013; Accepted 15 May 2013.

Correspondence: Bernardina Penarrieta Morales, Evandro Chagas Clinical Research Institute (IPEC), Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil. E-mail: bernardina.morales@ipec.fiocruz.br

© 2013 ISHAM

DOI: 10.3109/13693786.2013.806827

rates in hosts with normal immunity, especially in the emerging countries [6–9]. In the humid Brazilian Amazon (North) and in the semi-arid Northeast regions, *C. gattii* is the causative agent of meningitis in children and adolescents with high mortality in these groups, despite the use of colloidal amphotericin B (AMB) [10,11]. It has been speculated that *C. gattii* is more virulent and less susceptible to some antifungal drugs than *C. neoformans* based on *in vitro* investigations [12].

High doses of AMB associated with 5-fluorocytosine are indicated for induction therapy for cryptococcosis, followed by fluconazole (FCZ) in the consolidation phase [3]. FCZ is also indicated for the primary treatment of localized infections without evidence of dissemination [13,14]. Due to the increased significance of fungal infections and the introduction of new antifungal drugs, the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, formerly NCCLS) in the USA has developed (since 1985) protocols for *in vitro* susceptibility testing to aid physicians in their therapeutic choices for treating cryptococcosis. The standardization and reproductibility of broth microdilution methodology for *in vitro* susceptibility testing for yeasts, current CLSI M27-A3 [15,16], allows greater comparability of results among different laboratories. However, this method is considered laborious and time-consuming because it takes 24/48 h for incubation of *Candida* spp. and 72 h for *Cryptococcus* spp. and training of personnel, mainly to appropriately obtain the data from the testing. This encouraged the search for new methods to reduce incubation time and automate the collection of results. Recent studies have combined the use flow cytometry (FCM) with the conventional method CLSI M27-A3/M27-S3 and found it to be an important alternative procedure to establish the *in vitro* antifungal susceptibility of yeasts. FCM is a powerful technique for the diagnosis of hematological diseases and is widely used in clinical laboratories [17,18]. This technique has shown great potential in the classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissue using morphological phenotypic and genotypic parameters, as recommended by Bethesda International Consensus in 2006 to study the Lymphocytosis in FCM [18]. In addition, FCM combined with specific fluorochromes, like propidium iodide (PI), FUN-1 [2-chloro-4-(2,3-dihydro-3-methyl-(benzo-1,3-thiazol-2-yl)-methylidene)-1 phenylquinolinium iodide] and acridine orange (AO), has been used by many authors to determine the *in vitro* susceptibility of yeasts, especially *Candida* spp. The MIC values generated through the use of FCM are based on the analysis of large numbers of individual yeast cells which does not require protracted incubation periods [19–22]. However, there have been very few studies which have examined the application of

this method in assessing the antifungal susceptibility of *C. neoformans* and *C. gattii* [22].

Therefore, this work aims to optimize the *in vitro* antifungal susceptibility assay to obtain results in a shorter period of time for *C. neoformans* and *C. gattii* against fluconazole, the most common antifungal drug used in the treatment of cryptococcosis. For this we performed a comparison of MICs obtained by flow cytometry and the microdilution method (CLSI-M27-A3/M27-S3).

Material and methods

Strains

A total of 16 isolates of *C. neoformans* and 24 of *C. gattii* strains stored at the Culture Collection of Pathogenic Fungi in Evandro Chagas Clinical Research Institute at Oswaldo Cruz Foundation (IPEC/FIOCRUZ) at -70°C in 15% glycerol were employed in the studies. Purity, viability and genus identity of the strains were confirmed through the use of Niger seed agar medium (NSA) and biochemical tests (Vitek YBC, bioMérieux, Inc., Durham, NC, USA). The species were identified with CGB (canavanine-glycine bromothymol blue) medium test [23]. *Candida parapsilosis* INCQS 40038 (ATCC 22019) and *Candida krusei* INCQS 40147 (ATCC 6258) were included in the study as quality controls.

Antifungal agents

Fluconazole was obtained in powder form (Sigma-Aldrich Inc., St Louis, MO, USA). Stock solutions were prepared in dimethylsulfoxide-DMSO P.A. 99.70% (Vetec Fine Chemicals Ltd, Duque de Caxias, Brazil) at 5120 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and maintained at -70°C for up to 12 months [16].

Antifungal susceptibility testing CLSI

The microdilution tests were performed following the CLSI M27-A3 and M-27S3 broth microdilution guidelines [15,16]. Fluconazole dilutions ranging from 0.12–64 $\mu\text{g}/\text{ml}$ were prepared in flat-bottomed 96-well microplates using RPMI-1640 broth medium with L-glutamine without bicarbonate (Gibco™, New York, USA) buffered at pH 7.0 with (3-[N-Morpholino]-propanesulfonic acid) buffer >99% (Vetec Fine Chemicals Ltd, Duque de Caxias, Brazil), and supplemented with D-(+)-Glucose 2% (Sigma-Aldrich Inc., St Louis, MO, USA), modification accepted by the CLSI document [16,24]. The inocula were obtained from 48-h-old cultures of each test strain grown on drug-free Sabouraud dextrose Agar at 35°C . A pilot study showed that the growth of *Cryptococcus* cells was far better using 0.45%

saline solution rather than 0.85% in a short incubation time (2–12 h), so that FCM results could be reproducible. Therefore, the suspensions were prepared with 0.45% sterile saline and adjusted using Bio-Mérieux Densitoch instrument to match the turbidity of a 0.5 McFarland standard. The final concentration of the inoculum in the microplates was 0.5×10^3 to 2.5×10^3 CFU ml⁻¹ using RPMI1640 broth medium as described above.

Antifungal susceptibility testing by flow cytometry (FCM)

The minimum inhibitory concentration (MIC) of fluconazole was determined by a flow cytometric approach using acridine orange as fluorochrome (AO) (Sigma-Aldrich Inc., St Louis, MO, USA).

Fluconazole solutions were prepared following the broth microdilution guidelines [15] using RPMI 1640 media as described above. In order to reduce the dilution range of fluconazole we used final concentrations of from 1–64 µg/ml. Three hundred microliters were distributed in capped sterile tubes specific to flow cytometry and kept at –70°C up to 6 months or until used in the study.

To prepare the inoculum suspensions, strains were grown in Petri dishes containing drug-free Sabouraud dextrose agar (Difco Laboratories, Sparks, MD, USA) at 35°C for 48 h. Five to 10 colonies of approximately 1 mm in diameter each were suspended in sterile 0.45% saline, the turbidity was adjusted using Bio-Mérieux Densitoch instrument at a wavelength of 530 nm to 1 McFarland standard (approximately 300×10^6 CFU ml⁻¹). Portions of this inoculum suspension (300 µl) were distributed in tubes containing 300 µl of one of the drug dilutions (2–128 µg/ml).

To evaluate the action of AO at a final concentration of 11 mg/l as described in tests involving *Candida* spp. [25], cells of *C. neoformans* and *C. krusei* were analyzed with fluorescence microscopy (Olympus B × 40: 1). Cells suspension in sterile 0.45% saline matching turbidity of 0.5 McFarland were incubated for 30 min with AO in the dark and were defined as negative control or AO negative (viable cells) if green cells were observed. In contrast, cells treated with formaldehyde at a final concentration 1% incubated for 1 h prior to addition of the AO for 30 min were defined as positive control or AO positive (non-viable cells) when orange-red cells were found (data not shown). To determine the MIC obtained with flow cytometry for *C. neoformans* and *C. gattii*, we performed a pilot study using AO at 11 mg/l as an indicator of viability. The MIC of FCZ was defined as the lowest concentration that showed ~50% of viable cells, corresponding to the left quadrant of dot plot (Fig. 1).

Inoculum dilution acquisition was performed in Beckman Coulter XL-MCL flow cytometer and studies were conducted with a flow cytometric protocol in which size forward scatter (FSC) and granularity side scatter (SSC) at 675 nm fluorescence emission (FL4) 620V were measured. Data analysis was performed by a dual-parameter dot plot – FSC vs. AO fluorescence intensity, which was divided into two quadrants, i.e., left comprehending AO negative cells (viable cells), and right comprehending AO positive cells (non-viable cells). A gate was created (for *Cryptococcus* and *Candida*) in order to exclude debris and define the cell populations of interest.

In order to define the best incubation time for an appropriate reading in flow cytometry, we tested six representative strains of *C. neoformans* and *C. gattii*, and the quality control strains of *Candida krusei* and *C. parapsilosis*. The strains were incubated with continuous shaking at 200 rpm using Tecnal TE-420 incubator for 4, 8, 9, 12, 19 and 24 h at 35°C. After 30-min incubation with AO at 200 rpm, 10,000 cells were acquired in triplicate in flow cytometry. The lowest concentration which showed ~50% (MIC2) viable cells after incubation of the inoculum cells for 4, 8, 9, 12, 19 and 24 h were compared to the concentrations range of the quality control strains (*C. krusei* and *C. parapsilosis*) from the CLSI guidelines [15].

Once the incubation time was defined, MIC determinations of each of the 40 strains were carried out at two different stages to check reproducibility. Controls AO positive and AO negative were prepared for each strain according to the same test conditions described above (Fig. 1).

Analysis of results and statistics for microdilution (CLSI)

After 72-h incubation for *C. neoformans* and *C. gattii*, and 24–48 h for *C. krusei* and *C. parapsilosis* at 35°C, MICs were determined spectrophotometrically with microplate reader EPOCH. For the spectrophotometrical reading, Microsoft Excel software was used to determine the MIC2 (~50% inhibition growth) for fluconazole.

Analysis of results and statistics for flow cytometry

The MIC results obtained from flow cytometry were analyzed with the Statistical Package for Social Sciences (SPSS) version 16.0. The Spearman correlation coefficient was used to compare the MICs obtained by CLSI and FCM. The categorical classification for *Candida* sp. was used to interpretate *Cryptococcus* spp. MICs obtained by CLSI and FCM as the breakpoints for *Cryptococcus* species are not established [26,27].

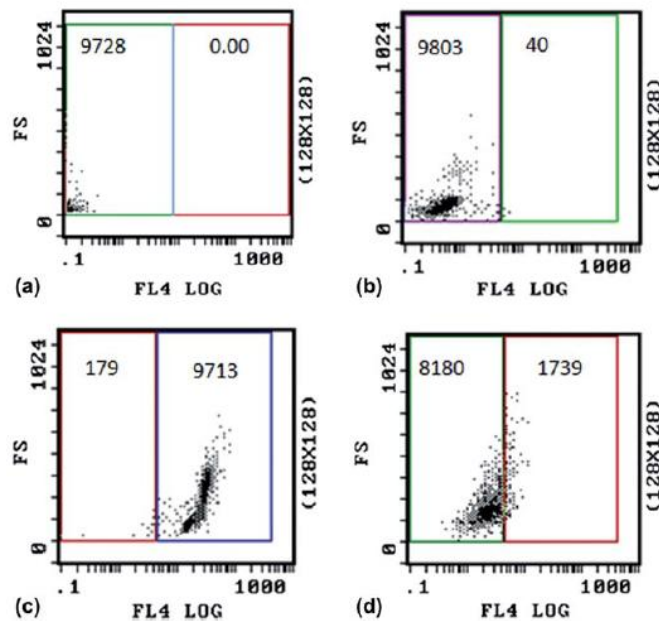


Fig. 1 Dot plot of the controls for *Cryptococcus neoformans*: (a) autofluorescence; (b) *C. neoformans* stained with acridine orange (AO) for 30 min; (c) *C. neoformans* dead cells, after 1-h incubation with 1% formaldehyde and stained with AO for 30 min; (d) Live cells, incubation at 200 rpm for 9 h and stained with AO for 30 min.

Results

The pilot study defined 9 h as the shorter time incubation period in which to obtain comparable MICs with FCM and CLSI methodologies, which adopts MIC limits: of 0.5–4.0 $\mu\text{g/ml}$ for *C. parapsilosis* and 16–64 $\mu\text{g/ml}$ for *C. krusei* in 24 h (Fig. 2). MIC ranges of the two quality control strains were within the CLSI established limits.

The MICs for fluconazole against *C. neoformans* and *C. gattii* obtained by CLSI and flow cytometry methods are shown in Table 1. The final MICs obtained with FCM and CLSI procedure ranged from <1–32 $\mu\text{g/ml}$ (Table 1). The MIC₅₀ and MIC₉₀ were 2 and 16 $\mu\text{g/ml}$ for FCM and 1 and 4 $\mu\text{g/ml}$ for CLSI. Categorical classification showed all *C. neoformans* isolates were susceptible to fluconazole, whereas three isolates of *C. gattii* were susceptible dose-dependent and the remaining 21 were classified as susceptible (Table 1). MICs comparison of both methodologies demonstrated 100% categorical agreement for *C. neoformans* and *C. gattii*. The MICs for *C. gattii* in CLSI method ranged from 0.12–32 $\mu\text{g/ml}$ and those found with FCM ranged from 1–32 $\mu\text{g/ml}$, whereas MICs for *C. neoformans* in the CLSI methods ranged from 0.25–4.0 $\mu\text{g/ml}$ and FCM ranged from 1–8 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 3).

In general, lower MICs were obtained with the CLSI method compared to FCM, especially for *C. neoformans*, despite eight isolates showing MICs <1 $\mu\text{g/ml}$ using the CLSI method (minimum dilution used for FCM) (Table 1).

The Spearman Correlation coefficient was used to compare the MICs obtained by the two methodologies and revealed a significant positive correlation coefficient, $P_v = 0.001$ obtained at the 0.01 level.

Discussion

Flow cytometry has been employed over the past few years for *in vitro* antifungal susceptibility testing (AST) in order to shorten the incubation time for slow growing molds [28] and providing greater accuracy in less time as the method analyzes larger number of cells allowing the detection of cell damage [20–22,25].

The AST methods used for *Cryptococcus* were standardized with *Candida* species that grow faster than members of the former species [15]. Therefore, FCM is of interest as it may overcome such limitations [20] of conventional procedures for *C. neoformans* and *C. gattii*. The current high price of the FCM equipment can be a

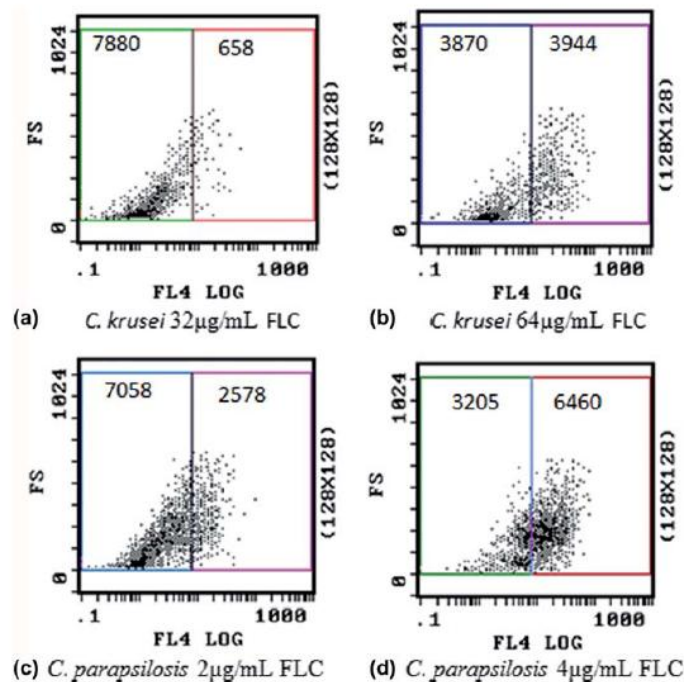


Fig. 2 Dot plot of the corresponding MIC and the previous dilution obtained from the quality control strains, *Candida krusei* INCQS 40147 (ATCC 6258) and *Candida parapsilosis* INCQS 40038 (ATCC 22019): (a) previous dilution of MIC *C. krusei*; (b) MIC of *C. krusei*; (c) previous dilution of MIC *C. parapsilosis*; (d) MIC of *C. parapsilosis*.

limiting factor in applying the methodology in clinical laboratories. However, in the laboratories which routinely used FCM for diagnostic and other purposes, AST could be performed with a positive cost/benefit ratio, especially when compared to the commercial methods that can be fiscally prohibitive.

Different fluorochromes have been used in antifungal susceptibility tests with FCM, especially for *Candida* species. For the analysis of *Cryptococcus* spp., the fluorochromes propidium iodide (PI) and FUN-1 were used by Ramani *et al.* [29], Chaturvedi *et al.* [30] and Joung *et al.* [19]. So far, variable results have been obtained with the few strains of *C. neoformans* that have been analyzed with FCM using PI and FUN-1 [22,31,32]. Green *et al.* [31] obtained comparable results between microdilution method and FCM using PI, but the authors tested only one strain of *C. neoformans* among several isolates of *Candida* spp. and *Saccharomyces cerevisiae*. Pina-Vaz *et al.* [22] also compared both methodologies, analysing three *Cryptococcus* and 63 *Candida* isolates, and obtained comparable results with FCM using FUN-1

after 1 h of incubation in tests involving itraconazole, voriconazole and caspofungin. Ramani and Chaturvedi [32] tested the *in vitro* AST of 16 strains of *C. neoformans* to amphotericin B and FCZ with FCM using PI and obtained results comparable to those found with the CLSI procedures after 4 and 6 h of incubation for amphotericin B and FCZ, respectively. However, FCM required the use of one more step, i.e., the addition of sodium deoxycholate at the end of incubation to improve the permeability for PI. According to Rudensky *et al.* [25], sodium deoxycholate results in gelling of the yeast suspension during cytometer reading, so they proposed the use of acridine orange (AO) as the viability indicator of *Candida* spp.

Most antifungal susceptibilities studies with FCM are based on the mean channel fluorescence of the dead cells, as used by Ramani *et al.*, with 50% increasing mean channel fluorescence for *Candida albicans* using PI [29]. However, another study demonstrated that a 30% increase in mean channel fluorescence was best correlated to the MICs of *Candida* spp. to FCZ [33].

Table 1 Minimum inhibitory concentration (MIC) of fluconazole obtained by Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and flow cytometry and categorical correlation of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*.

Isolates	CLSI and FCM		Correlation categorical**
	CLSI [‡] MIC ₂ [§] (µg/ml)	FCM [†] MIC ₂ (µg/ml)	
<i>C. neoformans</i>			
LMM*1426	1.00	8.00	S
LMM1494	<1	2.00	S
LMM1433	4.00	4.00	S
LMM1434	1.00	<1.00	S
LMM1443	4.00	4.00	S
LMM1446	1.00	4.00	S
LMM1445	<1	1.00	S
LMM1450	<1	2.00	S
LMM1452	4.00	4.00	S
LMM1455	1.00	4.00	S
LMM1457	1.00	2.00	S
LMM1468	1.00	1.00	S
LMM1473	1.00	2.00	S
LMM1475	1.00	2.00	S
LMM1496	2.00	2.00	S
LMM1498	2.00	4.00	S
<i>C. gattii</i>			
LMM201	<1	1.00	S
LMM202	2.00	1.00	S
LMM244	<1	1.00	S
LMM253	<1	1.00	S
LMM272	1.00	1.00	S
LMM326	2.00	1.00	S
LMM330	<1	<1.00	S
LMM347	1.00	1.00	S
LMM362	2.00	1.00	S
LMM378	<1	<1.00	S
LMM384	1.00	1.00	S
LMM1430	4.00	1.00	S
LMM1436	2.00	2.00	S
LMM1422	2.00	4.00	S
LMM1425	32.00	32.00	SDD
LMM1429	32.00	32.00	SDD
LMM1431	2.00	2.00	S
LMM1432	2.00	8.00	S
LMM1435	32.00	32.00	SDD
LMM1437	4.00	4.00	S
LMM1438	4.00	8.00	S
LMM1441	1.00	8.00	S
LMM1463	1.00	8.00	S
LMM1493	1.00	8.00	S

S, susceptible; SDD, susceptible dose-dependent; *Laboratory Medical Mycology; [‡]broth microdilution guidelines; [§]~50% optical density value of the growth control; [†]FCM, flow cytometry. **The Categorical classification for *Candida* sp. was used to interpret *Cryptococcus* spp. MICs obtained by CLSI and FCM as the breakpoints for *Cryptococcus* species are not established.

In this study the MICs found with FCM were obtained by ~50% of AO negative cells count, comparing with the AO negative of the growth control for each isolate. Thus, MICs results were based on living cells, as used

in the CLSI method. We obtained comparable results to those obtained with the CLSI method in our pilot study of *C. neoformans* and *C. gattii* susceptibility against FCZ with 9-h incubation. A considerable number of living cells was lost in the growth control (drug-free) during 9-h incubation at 200 rpm. Approximately 1700 positive AO cells were detected compared to the control prepared 30 min prior to acquisitions by FCM. Thus, the fast death of cryptococcal cells observed in 9 h was one of the reasons to choose counting AO negative cells to determine the MICs by FCM. Moreover, the use of AO eliminated the need for the additional sodium deoxycholate [25].

Usually the FCM method to evaluate the *in vitro* fluconazole susceptibility using FUN-1 and PI provided rapid and reproducible results in 6–8 h for *Candida* species [32,33]. In contrast, our study determined 9 h as shortest incubation time for *C. neoformans* and *C. gattii*, but 12, 19 and 24 h presented a variation of one dilution.

The MICs ranges obtained by CLSI and FCM methods were similar, although 0.12 µg/ml or 1 µg/ml is the lowest dilution in CLSI and FCM, respectively. This difference may have influenced the statistical analysis since eight strains had MIC < 1 µg/ml with the CLSI method, but a significant positive correlation coefficient was still obtained. The range concentration of 1–64 µg/ml for FCM was used because in the categorical classification MICs ≤ 8 µg/ml indicate susceptible (S), 16–32 µg/ml susceptible dose-dependent (S-DD) and ≥ 64 resistant (R) strains [15]. Thus, when considered categorical classification, 100% agreement between both methodologies was observed for *C. neoformans* and *C. gattii* strains.

CLSI inoculum is small and variable (500–2,500 CFU/ml), while FCM method has the advantage of allowing the analysis of a large and constant number of cells, such as 10,000 cells (in this study), or 30,000 by Pina-Vaz *et al.* [22], yielding a more representative result. Thus, we consider inoculum size to be a critical factor for achieving reproducible results with isolates containing heterogeneous sub-populations of cells with different fluconazole susceptibilities, such as heteroresistance of *C. neoformans* described by Yamazumi *et al.* [34].

In conclusion, we present a rapid flow cytometry assay using acridine orange for *C. neoformans* and *C. gattii* susceptibility testing. Flow cytometry proved to be reproducible, with the additional advantage of analyzing a large and a constant number of cells, allowing comparative studies carried out on *Cryptococcus* isolates in less time (9 hours) than the standard CLSI M27-A3 method (72 h). The FCM method can expedite and improve the results of *in vitro* susceptibility tests of *C. neoformans* and *C. gattii*.

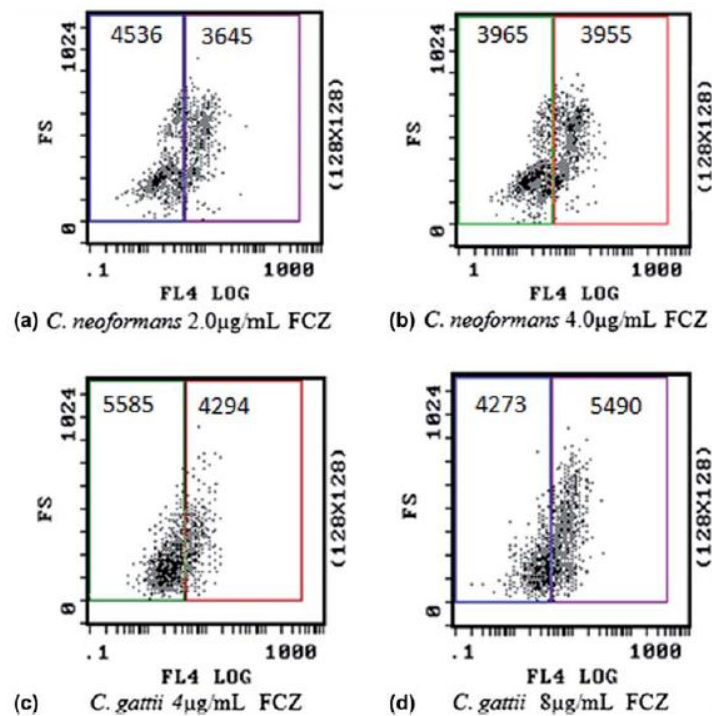


Fig. 3 Dot plot of the corresponding MIC and the previous dilution for representative strains of *Cryptococcus neoformans* (LMM1433) and *C. gattii* (LMM1493): (a) previous dilution of MIC *C. neoformans*; (b) MIC of *C. neoformans*; (c) previous dilution of MIC *C. gattii*; (d) MIC of *C. gattii*.

Acknowledgments

This work was financially supported by Clinical Research Institute / Oswaldo Cruz Foundation (IPEC/FIOCRUZ) Rio de Janeiro, Brasil. The authors thank Roland Mortimer and Rodrigo de Almeida Paes.

Declaration of interest: The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and the writing of the paper.

References

- Davis JA, Horn DL, Marr KA, Fishman JA. Central nervous system involvement in cryptococcal infection in individuals after solid organ transplantation or with AIDS. *Transpl Infect Dis* 2009; **11**: 432–437.
- Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, *et al.* Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS* 2009; **23**: 525–530.
- Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, *et al.* Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update

by the infectious diseases society of america. *Clin Infect Dis* 2010; **50**: 291–322.

- Hakim JG, Gangaidzo IT, Heyderman RS, *et al.* Impact of HIV infection on meningitis in Harare, Zimbabwe: a prospective study of 406 predominantly adult patients. *AIDS* 2000; **14**: 1401–1407.
- Dixit A, Carroll SF, Qureshi ST. *Cryptococcus gattii*: an emerging cause of fungal disease in North America. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2009; **2009**: 840452.
- Kidd SE, Hagen F, Tschärke RL, *et al.* A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 17258–17263.
- Carriconde F, Gilgado F, Arthur I, *et al.* Clonality and α -a recombination in the Australian *Cryptococcus gattii* VGII population – an emerging outbreak in Australia. *PLoS ONE* 2011; **6**: 16936.
- Ngamskulrungron P, Serena C, Gilgado F, Malik R, Meyer W. Global VGIIa isolates are of comparable virulence to the major fatal *Cryptococcus gattii* Vancouver Island outbreak genotype. *Clin Microbiol Infect* 2011; **17**: 251–258.
- Fraser JA, Giles SS, Wenink EC, *et al.* Same-sex mating and the origin of the Vancouver Island *Cryptococcus gattii* outbreak. *Nature* 2005; **437**: 1360–1364.
- Trilles L, Lazéra MS, Wanke B, *et al.* Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008; **103**: 455–462.

- 11 Santos WRA dos, Meyer W, Wanke B, et al. Primary endemic cryptococcosis *gattii* by molecular type VGII in the state of Pará, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008; **103**: 813–818.
- 12 Trilles L, Meyer W, Wanke B, Guarro J, Lazéra M. Correlation of antifungal susceptibility and molecular type within the *Cryptococcus neoformans*/ *C. gattii* species complex. *Med Mycol* 2011; **50**: 328–332.
- 13 Jarvis JN, Harrison TS. Pulmonary cryptococcosis. *Semin Respir Crit Care Med* 2008; **29**: 141–150.
- 14 Brouwer AE, Teparukkul P, Rajanuwong A, et al. Cerebrospinal fluid HIV-1 viral load during treatment of cryptococcal meningitis. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2010; **53**: 668–669.
- 15 Clinical and Laboratory Standards Institute. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast*. Approved standard, 3rd ed., document M27-A3 (ISBN 1-56238-666-2). Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
- 16 Clinical and Laboratory Standards Institute. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast*, 3rd Informational Supplement, document M27-S3 (ISBN 1-56238-667-0). Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
- 17 Stetler-Stevenson M, Braylan RC. Flow cytometric analysis of lymphomas and lymphoproliferative disorders. *Semin Hematol* 2001; **38**: 111–123.
- 18 Davis BH, Holden JT, Bene MC, et al. 2006 Bethesda international consensus recommendations on the flow cytometric immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia: medical indications. *Cytometry B Clin Cytom* 2007; **72**(Suppl. 1): S5–13.
- 19 Joung YH, Kim HR, Lee MK, Park AJ. Fluconazole susceptibility testing of *Candida* species by flow cytometry. *J Infect* 2007; **54**: 504–508.
- 20 Vale-Silva LA, Buchta V. Antifungal susceptibility testing by flow cytometry: is it the future? *Mycoses* 2006; **49**: 261–273.
- 21 Ramani R, Chaturvedi V. Flow cytometry antifungal susceptibility testing of pathogenic yeasts other than *Candida albicans* and comparison with the NCCLS broth microdilution test. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**: 2752–2758.
- 22 Pina-Vaz C, Costa-de-Oliveira S, Rodrigues AG, Espinel-Ingroff A. Comparison of two probes for testing susceptibilities of pathogenic yeasts to voriconazole, itraconazole, and caspofungin by flow cytometry. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 4674–4679.
- 23 Kwon-Chung KJ, Polacheck I, Bennett JE. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C). *J Clin Microbiol* 1982; **15**: 535–537.
- 24 Aller AI, Martín-Mazuelos E, Gutiérrez MJ, et al. Comparison of the Etest and microdilution method for antifungal susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans* to four antifungal agents. *J Antimicrob Chemother* 2000; **46**: 997–1000.
- 25 Rudensky B, Broidie E, Yinnon AM, et al. Rapid flow-cytometric susceptibility testing of *Candida* species. *J Antimicrob Chemother* 2005; **55**: 106–109.
- 26 Favalessa OC, Ribeiro LC, Tadano T, et al. First description of phenotypic profile and in vitro drug susceptibility of *Cryptococcus* spp yeast isolated from HIV-positive and HIV-negative patients in State of Mato Grosso. *Rev Soc Bras Med Trop* 2009; **42**: 661–665.
- 27 Nguyen MH, Yu CY. In vitro comparative efficacy of voriconazole and itraconazole against fluconazole-susceptible and -resistant *Cryptococcus neoformans* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; **42**: 471–472.
- 28 Alvarez-Barrientos A, Arroyo J, Cantón R, Nombela C, Sánchez-Pérez M. Applications of flow cytometry to clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev* 2000; **13**: 167–195.
- 29 Ramani R, Ramani A, Wong SJ. Rapid flow cytometric susceptibility testing of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 1997; **35**: 2320–2324.
- 30 Chaturvedi V, Ramani R, Pfaller MA. Collaborative study of the NCCLS and flow cytometry methods for antifungal susceptibility testing of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 2004; **42**: 2249–2251.
- 31 Green L, Petersen B, Steimel L, Haerber P, Current W. Rapid determination of antifungal activity by flow cytometry. *J Clin Microbiol* 1994; **32**: 1088–1091.
- 32 Ramani R, Chaturvedi V. Flow cytometry antifungal susceptibility testing of pathogenic yeasts other than *Candida albicans* and comparison with the NCCLS broth microdilution test. *J Antimicrob Chemother* 2000; **44**: 2752–2758.
- 33 Joung YH, Kim HR, Lee MK, Park AJ. Fluconazole susceptibility testing of *Candida* species by flow cytometry. *J Infect* 2007; **54**: 504–508.
- 34 Yamazumi T, Pfaller MA, Messer SA, et al. Characterization of heteroresistance to fluconazole among clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol* 2003; **41**: 267–272.

This paper was first published online on Early Online on xx xx xxxx.

CAPÍTULO II

(Artigo submetido)

O capítulo II aborda determinação do perfil da suscetibilidade antifúngica *in vitro* de *C. neoformans* VNI e *C. gattii* VGII, para obtenção de CIM de Anfotericina B utilizando método padrão CLSI M27-A3, Citometria de fluxo Vtek-2 e *time kill assays*. Estes resultados fazem parte dos objetivos específicos 1 e 2 a seguir:

- 1- Determinar o perfil da suscetibilidade *in vitro* de *C. neoformans* e *C. gattii* para obtenção da concentração inibitória mínima (CIM) de fluconazol, itraconazol, 5-fluorocitosina e anfotericina B isoladamente e de forma combinada de Anfotericina B com 5-fluorocitosina e Anfotericina B com Voriconazol
- 2- Determinar concentração inibitória mínima por leitura em citômetro de fluxo nos testes de suscetibilidade de *C. neoformans* VNI e *C. gattii* VGI e GVII frente a fluconazol, itraconazol e anfotericina B.

Susceptibility test *in vitro* of *Cryptococcus neoformans* VNI and *Cryptococcus gattii* VGII against amphotericin B by Vitek-2, Broth microdilution CLSI and Flow Cytometry

**Susceptibility test *in vitro* of *Cryptococcus neoformans* VNI and
Cryptococcus gattii VGII against amphotericin B by Vitek-2, Broth
microdilution CLSI and Flow Cytometry**

Short title: MICs Comparison of *Cryptococcus* against Amphotericin B

**Bernardina Penarrieta Morales¹, Luciana Trilles¹, Álvaro Luiz Bertho², Ivan Neves Junior,¹
Raquel de Vasconcellos C. de Oliveira¹, Bodo Wanke¹, Márcia dos Santos Lazéra¹**

bernardina.morales@ipef.fiocruz.br

1 Evandro Chagas Clinical Research Institute, Oswaldo Cruz Foundation (IPEC-FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil

2. Institute, Oswaldo Cruz Foundation (IOC-FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil

Key Words: *Cryptococcus*, Amphotericin B, CLSI M27 A3, Flow Cytometry, Vitek 2.

Abstract

C. neoformans VNI is the main agent of cryptococcosis associated to AIDS in the world. *C. gattii* VGII causes mainly endemic primary infection in immunocompetent hosts. To determine Minimum Inhibitory Concentration (MICs) in short period, we compared Vitek 2, flow cytometry (FCM) using FUN-1 with broth micro-dilution methods (CLSI M27 A3). The minimum incubation period was evaluated by Minimum Fungicidal Concentration (MFC) Procedure. Seventeen clinical isolates of *C. neoformans* VNI and eighteen of *C. gattii* VGII were analyzed. MIC₀ was determined by CLSI M27 A3 and Vitek 2. In FCM the MICs were defined by comparison of fluorescence intensity in FL4 LOG between respective negative controls and each strain. The MICs results showed 100% categorical and essential agreement. The median reading time to MICs by Vitek 2 was 19:06 hours and by FCM was two hours. MFC was carried out in two and six hour periods and all isolates were inhibited in two hours with 1 µg/ml. It is important to highlight the flow cytometry as an alternative method to determine MICs for AMB in two hours faster than CLSI and Vitek-2, with positive cost-benefit, in clinical laboratories which use the cytometer for other purposes.

Introduction

Cryptococcosis is a systemic mycosis acquired through the inhalation of viable propagules, basidiospores or dehydrated yeasts of *Cryptococcus neoformans* or *Cryptococcus gattii* (Brizendine, Baddley, & Pappas 2011), (Jarvis & Harrison 2008) which present eight major molecular types, VNI to VNIV for *C. neoformans* and VGI to VGIV for *C. gattii* (Meyer et al. 1999).

C. neoformans VNI is the main agent of cryptococcosis associated to AIDS in the world and is a significant opportunistic infection agent in solid organ transplant recipients (Singh et al. 2008). *C. gattii* VGII mainly causes a primary lung infection in HIV- negative patients, causing non-specific respiratory symptoms with different radiologic presentations depending on the host's immune status and is usually under diagnosed (Santos et al. 2008), (Baddley et al. 2008). It may disseminate from the lung to other organs, especially to the central nervous system (Baddley et al. 2008). *C. gattii* VGII is the principal agent of endemic cryptococcosis in normal hosts in South America, including a large area of Amazonia (Santos et al. 2008), (Luciana Trilles et al. 2008), (Meyer et al. 2003). This genotype is also related to the outbreak in Vancouver Canada, which started in 1999 and then expanded to the Pacific coast of the United States of America (Meyer et al. 1999), (Kidd et al. 2004).

Amphotericin B (AMB), a drug available in the market for over 40 years, has been considered the gold standard for treating invasive fungal infections (Wingard et al. 1999), (Tiphine & Herbrecht 1999) including cryptococcal meningitis (Saag et al. 1992). Resistance to AMB is rarely observed, however, less sensitive isolates from HIV patients, usually infected by *C. neoformans* (Vanden et al. 1998), and less sensitive isolates of *C. gattii* have been reported, which could be related to the difficulty of cryptococcosis treatment (Moraes & Hamdan 2003).

High doses of AMB associated with *5-fluorocytosine* is the first choice as induction therapy for cryptococcosis (Day et al. 2013), followed by fluconazole in the consolidation phase (Perfect et al. 2010) CLSI M27 A3 broth micro-dilution method (Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2008) is used as reference to develop several automated or semi-automated commercial systems to

evaluate antifungal susceptibility tests: E-test (AB Biodisc, Sweden), based on the diffusion of the drug on a solid medium; the Agar disk diffusion method (Azevedo et al. 2011) and Vitek 2 for use in the clinical laboratory (Cuenca-Estrella et al. 2010). The Vitek 2 method, a fully automated commercial system, provides same-day identification and antibiotic susceptibility results. Several studies compared this automated commercial method with CLS M27 A3 and have show essential agreement (within 2 dilutions) for several antifungal agents against *Candida* spp.(Pfaller et al. 2007) and categorical agreement (based on CLSI method) was obtained for *C. neoformans* against AMB (Cejudo et al. 2010).

Many authors have developed studies using flow cytometry (FCM) with different fluorochromes, such as Acridine Orange (AO) (Rudensky et al. 2005), Propidium Iodide (PI) (Ramani & Chaturvedi 2000) and [2-choro-4-(2,3-dihydro-3-methyl-(benzo-1,3-thiazol-2-yl)-methylidene)-1-phenylquinolinium iodide] (FUN-1) to determine susceptibility of yeasts, especially *Candida* (Wenisch et al. 1997). FUN-1 is a cell membrane-permeable fluorochrome that produces a yellow-green fluorescence in the cytoplasm of living or dead cells, and gives rise to red intravacuolar cylindrical structures (CIVS) only in viable cells (Millard et al. 1997) (Wenisch et al. 1997). The Minimum inhibitory concentration (MIC) determination by FCM is based on the analysis of a large number of individual yeast cells not requiring long time incubation (Joung et al. 2007),(C. Pina-Vaz et al. 2005). However, there are few studies which have examined *C. neoformans* cells (C. Pina-Vaz et al. 2005), (Morales et al. 2013), (Cidália Pina-Vaz & Rodrigues 2010a), (Green et al. 1994) but none with the genotypes VNI and *C. gattii* VGII. Although FCM can be considered an expensive method for susceptibility testing in clinical laboratories, antifungal susceptibility test (AST) can be accomplished with a good cost / benefit ratio, in laboratories that possess the equipment for other diagnostic purposes.

In other study the Minimum Fungicidal Concentration (MFC) Procedure were used to evaluate the fungicidal activity of amphotericin B against clinical isolates of common and emerging *Candida* spp. (Cantón et al. 2003). In this present study MFC procedure is important to validate the methodologies

that aim to reduce the incubation period of *C. neoformans* and *C. gattii* to obtain the MFC (100% death) with AMB.

This study aims to determine MICs of amphotericin B in a shorter incubation period, of *C. neoformans* VNI and *C. gattii* VGII, so we compared Vitek 2 and FCM with broth microdilution method (CLSI/M27A-3) and checked the minimum incubation period by Minimum Fungicidal Concentrations procedures.

Materials and methods

Study Design

Seventeen clinical isolates of *C. neoformans* VNI and eighteen of *C. gattii* VGII were sub-cultured on Niger Seed Agar (NSA) to confirm purity and viability of these isolates, and also characterized by Vitek 2 (VK2C6700) Vitek YBC (bioMérieux, Inc., Durham, USA) and L-canavanine, glycine, and bromothymol blue (CGB) medium (Kwon-Chung & Bennett 1982). The molecular types were identified following Meyer *et al.* (Meyer *et al.* 2003),(Trilles *et al.* 2011) Two quality control strains were used in each test: *Candida parapsilopsis* INCQS 40038 (ATCC 22019) and *Candida krusei* INCQS 40147 (ATCC 6258). All *C. neoformans* and *C. gattii* isolates tested in this experiment were stored in the Pathogenic Fungal Collection of IPEC/FIOCRUZ.

Susceptibility testing

Broth Micro-dilution - The micro-dilution test was performed following the broth micro-dilution guidelines CLSI M27 A3 (Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2008) (CLSI document M27-S3 (2008)) AMB (Sigma-Aldrich Inc., St Louis, USA) stock-solutions were prepared with

Dimethyl Sulfoxide (DMSO) P.A. 99.70% (Vetec Fine Chemicals LTD, Duque de Caxias, Brazil) at 1600 µg/ml, and maintained at -70°C for up to 12 months.

Serial dilutions of AMB RPMI-1640 were prepared using broth medium with L-glutamine without bicarbonate (Gibco™, New York, USA) buffered at pH 7.0 with (3-[N-Morpholino]-propanesulfonic acid) buffer > 99%. (Vetec Fine Chemicals LTD, Duque de Caxias, Brazil) and supplemented with D-(+)-Glucose 2% (Sigma-Aldrich Inc., St Louis, USA) in a range of 0.03 to 16 µg/ml, and stored in 96 well micro-plates at -70°C for up to 6 months.

The inocula were prepared using RPMI-1640 medium. Isolates were cultured in Petri dishes containing Sabouraud dextrose agar (Difco™ Laboratories, Maryland, USA) for 48 hours at 35° C. Two to five colonies of approximately 1 mm in diameter were suspended in 3 ml 0.45% sterile saline and vortexed. Turbidity was adjusted using a Bio-Mérieux Densichek instrument to match 0.5 McFarland. The final concentration of the inoculum in the micro-plates was approximately 0.5×10^3 - 2.5×10^3 CFU ml⁻¹, and the final concentration of AMB ranged from 0,015 – 8 µg/ml.

After 72 hours of incubation at 35°C, the MIC of AMB was defined as the lowest drug concentration at which 100% inhibition growth (MIC 0) was visualized.

Vitek 2 - Susceptibility testing with the Vitek 2 Compact W2420 -VK2 C6700- system (bioMérieux) was performed according to the manufacturer's instructions. Standardized suspension was prepared with 0.45% sterile saline and placed into a Vitek 2 antifungal susceptibility test card - AST-YS01 - Cards were filled using a vacuum-filling process, then after sealing placed into the automatic reader/incubator. The results are expressed as MIC values in µg/ml according to the manufacturer's instructions.

Flow Cytometry – We carried out a pilot study using *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* and *C. neoformans*, where incubation times commonly used by other authors were tested, 1h, 2h, 4h and 6h

of incubation (Cidália Pina-Vaz et al. 2005), (Ramani & Chaturvedi 2003) (data not shown). In this study 2 of incubation were selected to perform the antifungal susceptibility by FCM.

The MICs of AMB were determined in a Beckman Coulter XL-MCL Flow cytometer. The drug was prepared according to CLSI M27 A3, as described above, reserved in capped sterile tubes specific to flow cytometry and kept at -70°C until use or for up to six months. The final concentration intervals for AMB varied from 0.25 to 2 $\mu\text{g/ml}$.

The isolates were cultured in Petri dishes containing Sabouraud dextrose agar at 35°C for 48 h; five colonies of 1mm in diameter were suspended in sterile 0.45% saline and the turbidity was adjusted using a Bio-Mérieux Densichek instrument at a wavelength of 530 nm to 1 McFarland standard (approximately $300 \times 10^6 \text{ CFU ml}^{-1}$). The tests were incubated for 2h at 35°C with shaking at 200 rpm (Tecnal TE-420 Incubator) after addition of 300 μl of the inoculum to the drug solution range (300 μl).

After incubation with AMB, the cells were stained with 0.5 μM FUN-1 in the dark at room temperature for 30 min (Millard et al. 1997) (Wenisch et al. 1997) (Cidália Pina-Vaz et al. 2005). Positive controls (viable cells) were prepared with cell suspension to 0.5 Macfarland drug-free and stained for 30 minutes with FUN-1 prior to acquisition. The negative control (non-viable cells) was prepared in the same way as the positive control; however the cells in the negative control were treated with formaldehyde at a final concentration 1% and incubated for 1 hour prior to addition FUN-1 (figure 1).

Approximately 30.000 individual cells were analyzed in the Flow Cytometry at FL4 LOG (excited by light to 480 nm and emission 600nm) red fluorescence and at FL2 LOG (excited by light to 480 nm and emission 530nm) yellow-green fluorescence with FUN-1.

The mean fluorescence intensity in FL4 LOG with dead cells was considered the negative control, which was carried out for each strain tested. The MIC of AMB was defined as the lowest

concentration that produced 100% inhibition of growth (MIC₀), that is a comparable mean fluorescence intensity in FL4 LOG to the negative control (figure 1).

Minimum Fungicidal Concentration (MFC) Procedure

MFC was performed as described by van Duin & Nosanchuk (2002) and Cantón et al. (2003), with modifications. Broth micro-dilution susceptibility testing was carried out for the second time according to methodology described above. The microplates were incubated at 35° C for 2 and 6 hours, and after each time period, 10µl of all wells without visual growth were plated on Sabouraud dextrose agar. MFC was defined as the lowest concentration of AMB which showed the absence of growth after 72 h incubation at 35°C. CFU ml⁻¹ was obtained for the other dilutions.

Statistics

In exploratory analysis, the geometric mean, range and 90 percentile of MIC were analyzed. The MICs of different antifungal susceptibility methods were compared by non-parametric Spearman correlation (r), (Dias et al. 2006) using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS) version 16.0. P-values<0.05 showed statistical significance.

Results

A total of 35 isolates of *C. neoformans* VNI (n=17) and *C. gattii* VGII (n=18) were analyzed. All isolates showed optimal growth at 48 hours on Sabouraud drug free agar medium before the antifungal susceptibility test. The MICs of the quality control isolates were within the limit as recommended by CLSI reference method (CLSI document M27-S3 (2008)).

The Vitek 2 MIC results were available from 15:15 h to 31:00 h of incubation for all *C. neoformans* VNI and *C. gattii* VGII, 19:06 h was the median reading time. The median reading time of *C. neoformans* VNI was 20:08 h (range 15:15 h to 31:00 h) and for *C. gattii* VGII was 18:09 h (range 16:00 to 22:15 h).

CLSI M27 A3 MIC of most isolates was 1 µg/ml (62% of isolates), while Vitek 2 was 0.50 µg/ml (77% of isolates). Using FCM, the most common MICs observed were 0.50 µg/ml (40%) and 0.25 µg/ml (34%) as shown in table 1. MICs range, MIC₉₀ and geometric mean of *C. neoformans* VNI and *C. gattii* VGII against AMB obtained with CLSI M27 A3, Vitek 2 and FCM with different incubation periods are showed in table 2. Comparison of the 3 different methods used showed 100% of categorical (all isolates are susceptible, according to CLSI) and essential agreement (up to 2 dilutions) (Pfaller et al. 2007), (Dias et al. 2006), (Favalessa et al. 2009) were observed (table 2). However, MICs comparison showed no correlation between CLSI M27 A3 /VITEK-2 and FMC/VITEK-2 (p=0.87 and p=0.85, respectively), yet the comparison of MICs between CLSI M27 A3 and FMC showed positive significant correlation (r = 0.33, p=0.048). The MIC geometric means (GM) of all three methodologies were higher for *C. gattii* VGII than for *C. neoformans* VNI (table 2), although the difference was not statistically significant (p>0.05).

MFC were performed with two and six hours of incubation. The majority of *C. neoformans* VNI and *C. gattii* VGII isolates were inhibited with 0.5 µg/ml of AMB after two hours and six hours incubation. More details are shown in table 3 and figure 2.

Discussion

The treatment of cryptococcosis has undergone changes in the past few years. Recent studies report that a more prolonged treatment should be required for *C. gattii* infections (De Bedout et al. 1999) (Perfect et al. 2010). Moreover, the identification of the molecular type and understanding susceptibility testing are increasingly important (Chong et al. 2010). Several researchers have

performed comparative studies on different *in vitro* methodologies to determine the susceptibility of yeasts to antifungal drugs. In this study, we evaluate the MICs of *C. neoformans* VNI and *C. gattii* VGII against AMB comparing different methodologies.

CLSI M27 A3, used as reference to develop several automated or semi-automated commercial systems to evaluate antifungal susceptibility tests, is the most reliable methodology up to now, although it is not an easy process and the results are obtained after 72 hours. For this reason, automated methodologies, such as Vitek 2, have been tested (Cuenca-Estrella et al. 2010), (Cejudo et al. 2010). The method Vitek 2 is a fully automated commercial method system and has the advantage of determining fungal identification and MIC determination simultaneously. Pfaller *et al.* (Pfaller et al. 2007), Cejudo *et al.* (Cejudo et al. 2010), Peterson *et al.* (Peterson et al. 2011)] and Cuenca-Estrella *et al.* (Cuenca-Estrella et al. 2010) have compared Vitek 2 with CLSI M27 A3 method. Those studies agree that Vitek 2 method is easy to perform and no complex handling is required (Pfaller et al. 2007). However, Cejudo *et al.* reported that it is necessary to accomplish CLSI M27 A3 in order to confirm resistant isolates by Vitek 2 (Cejudo et al. 2010).

In the present study the comparison between CLSI M27 A3 and Vitek 2 showed good (100%) categorical (based on CLSI method) and essential MICs agreement (within 2 dilutions) for AMB. Other comparative studies between these two methodologies found similar results and have established good essential agreement (within 2 dilutions) for *Candida* spp. against several antifungal agents (Pfaller et al. 2007) Cejudo *et al.* (Cejudo et al. 2010) and Cuenca-Estrella *et al.* (Cuenca-Estrella et al. 2010) also observed good essential agreement for *C. neoformans* against AMB (69% and 92% for *C. neoformans* respectively).

Borghi E *et al.* (Borghi et al. 2010) analyzed 614 isolates of *Candida* sp. and 10 *C. neoformans* using CLSI M27 A3 method and Vitek 2, obtaining similar results for both methods against AMB for MIC₉₀ (0.5 µg/ml for Vitek 2 and 1.0 µg/ml for CLSI M27 A3). Identical values were obtained in the present study.

Not only CLSI M27 A3 and VITEK 2, but also FCM has been developed to determine MIC *in vitro* for antifungal susceptibility for yeasts, mainly *Candida* species, with satisfactory results (Ramani & Chaturvedi 2000), (Rudensky et al. 2005), (Vale-Silva & Buchta 2006). The main objective of FCM method is to reduce incubation time and perform automated reading whereas the CLSI M27 A3 requires 72 h. Besides, there are no studies analyzing susceptibility of different molecular types of cryptococcosis agents against AMB by FCM using FUN-1. Pina Vaz C & Rodrigues AG (Cidália Pina-Vaz & Rodrigues 2010b) obtained MICs in one hour of incubation for *C. neoformans*. In a previous pilot study, we tested one and two hours of incubation and good agreement was found between MICs obtained in two hours by FCM using FUN-1 and CLSI M27 A3 (72 hours), but results obtained in one hour of incubation by FCM were not reproducible for *C. neoformans* and *C. gattii* (data not shown). Other authors reported that three hours are required with AMB, using Propidium Iodide (PI) (Green et al. 1994), but it is necessary to add a detergent (sodium deoxycholate) to allow PI to access the nuclei, (another step in the methodology that may degenerate the membrane of the cell) (Ramani & Chaturvedi 2000).

In this present study, when comparing geometric mean values within each methodology, CLSI M27 A3, Vitek 2 and FCM, there was no statistically significant difference between *C. gattii* VGII and *C. neoformans* VNI strains, results that agree with previous study by Trilles et al. (2011), which reported amphotericin B as the only drug showing no differences in susceptibilities among VGI/VGII, VGI/VNI and VGII/VNI.

We obtained MICs by CLSI M27 A3 in 72 h; Vitek 2 average time 19:06 h, and FCM in two hours. Considering the minimum incubation period (2 h) obtained in FCM, showed good agreement with the period time obtained by time MFC used to check if AMB inhibits the growth of *Cryptococcus* in two and six hours, we concluded that two hours is a good incubation period to determine MICS by FCM. MFC showed that 1 µg/ml of AMB is enough to inhibit all strains in two hours. These results are in accordance with MICs obtained CLSI M27 A3.

The results demonstrated good categorical and essential agreement when CLSI M27 A3, Vitek 2 and FCM were compared. In conclusion it is important to highlight FCM as an alternative method to determine MICs for AMB in shorter time (two hours) incubation and MICs released in the same day, with positive cost-benefit in clinical laboratories which use cytometer for others purposes.

Acknowledgments

To Evandro Chagas Clinical Research Institute (IPEC-FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil, National Institute for Quality in health, (INCQS-FIOCRUZ) Rio de Janeiro, Brazil for providing quality control isolates, FAPERJ Project: Case n°. E-26/110.350/2010 and Roland Mortimer for English-language revision.

Declaration of interest:

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and the writing of the paper.

Table 1 List of isolated showing the minimum inhibitory concentrations (MIC) of *C. neoformans* VNI and *C. gattii* VGII against AMB obtained by CLSI Vitek 2, Flow Cytometry (FCM) and determination of Minimum Fungicidal Concentration (MFC) at two and six hours of incubation.

ISOLATE		MIC	MIC	MIC	MFC	MFC
LMM	M. TYPE	VITEK 2	FCM	CLSI	2H	6H
LMM1494	VNI	0.25	0.25	0.25	1.0	0.5
LMM1433	VNI	0.5	1.0	1.0	1.0	0.5
LMM1443	VNI	1.0	1.0	0.5	0.5	1.0
LMM1446	VNI	0.5	0.25	1.0	1.0	1.0
LMM1448	VNI	0.5	0.25	0.25	0.5	0.5
LMM1450	VNI	0.5	0.5	1.0	0.5	0.5
LMM1452	VNI	0.5	0.25	1.0	0.5	0.5
LMM1455	VNI	0.5	1.0	1.0	0.25	0.5
LMM1457	VNI	0.5	0.25	1.0	0.5	0.5
LMM1468	VNI	0.25	0.25	0.5	1.0	0.5
LMM1473	VNI	0.5	0.25	0.5	1.0	0.5
LMM1475	VNI	0.5	0.25	0.25	0.5	0.5
LMM1495	VNI	0.5	0.5	0.25	0.25	0.5
LMM1496	VNI	0.5	0.25	1.0	0.5	0.5
LMM1497	VNI	0.25	1.0	1.0	0.5	0.5
LMM1498	VNI	0.5	1.0	0.5	0.25	0.5
LMM1499	VNI	0.5	0.5	1.0	1.0	0.5
LMM1425	VGII	0.5	1.0	1.0	1.0	0.5
LMM1429	VGII	0.5	0.25	0.5	0.25	0.25
LMM1437	VGII	0.5	0.5	1.0	1.0	0.5
LMM1438	VGII	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
LMM1441	VGII	1.0	0.5	1.0	1.0	0.5
LMM1444	VGII	0.25	1.0	1.0	1.0	0.5
LMM1449	VGII	0.5	1.0	1.0	1.0	1.0
LMM1451	VGII	0.5	0.5	1.0	1.0	0.5
LMM1453	VGII	0.5	0.5	1.0	1.0	0.25
LMM1454	VGII	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
LMM1459	VGII	0.25	1.0	1.0	0.5	0.5
LMM1460	VGII	0.25	0.5	1.0	0.5	0.5
LMM1463	VGII	0.5	0.25	0.5	0.5	0.5
LMM1480	VGII	0.5	0.5	1.0	0.5	0.25
LMM1493	VGII	0.5	0.25	1.0	0.5	0.5
LMM17	VGII	0.5	0.5	1.0	0.5	0.5
LMM901	VGII	0.5	0.5	1.0	0.5	0.5
LMM994	VGII	0.5	0.5	0.5	1.0	0.5

LMM= "Medical Mycology Laboratory"; M. TYPE=Molecular type; CLSI= Broth microdilution.

Table 2 Comparison of incubation time using CLSI M27-A3, Vitek-2, Flow Cytometry methods, MICs range and MIC₉₀ of seventeen *C. neoformans* VNI and eighteen *C. gattii* VGII against amphotericin B.

Method (incubation time)	CLSI (72h)		FCM (2h)		VITEK-2 (15-31h)	
	<i>C. neoformans</i> VNI	<i>C. gattii</i> VGII	<i>C. neoformans</i> VNI	<i>C. gattii</i> VGII	<i>C. neoformans</i> VNI	<i>C. gattii</i> VGII
MICs Range	0.25-1	0.5-1	0.25-1	0.25-1	0.25-1	0.25-1
MIC ₉₀	1.0	1.0	1.0	1.0	0.5	0.5
GM of MICs	0.5	0.7	0.3	0.7	0.3	0.5

CLSI M27-A3 = Broth Microdilution Method

AMB = amphotericin B

MICs = Minimum inhibitory concentration

GM = geometric mean

Table 3 Inhibition of growth *in vitro* of Seventeen clinical isolates of *C. neoformans* VNI and eighteen of *C. gattii* GVII by Minimum Fungicidal Concentration (MFC) in two and six hours of incubation.

[] AMB μg/mL	MFC 2h		MFC 6h	
	<i>C. neoformans</i> VNI (N)	<i>C. gattii</i> GVII (N)	<i>C. neoformans</i> VNI (N)	<i>C. gattii</i> GVII (N)
0.12	0	0	0	0
0.25	3	1	0	3
0.5	8	9	15	14
1.0	6	8	2	1
2.0	17	18	17	18

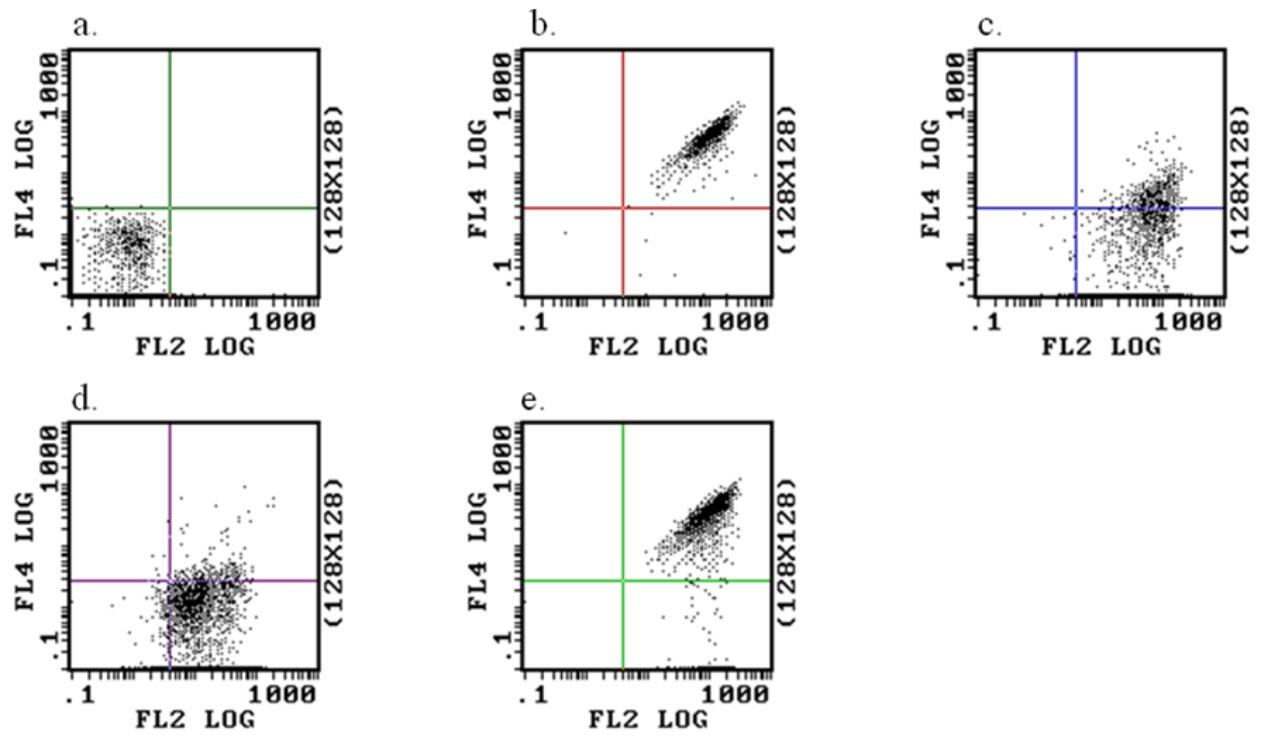


Figure 1. Representative dot-plot graphics obtained by flow cytometry. (a) auto-fluorescence of viable *C. neoformans* cells; (b) *C. neoformans* stained with FUN-1 – (viable cells), (c) *C. neoformans* stained with FUN-1 and treated with 1% formol (non-viable cells), (d) *C. neoformans* stained with FUN-1 and treated with 1 μ g/ml amphotericin B, (e) *C. neoformans* stained with FUN-1 and treated with 0.01 μ g/ml amphotericin B.

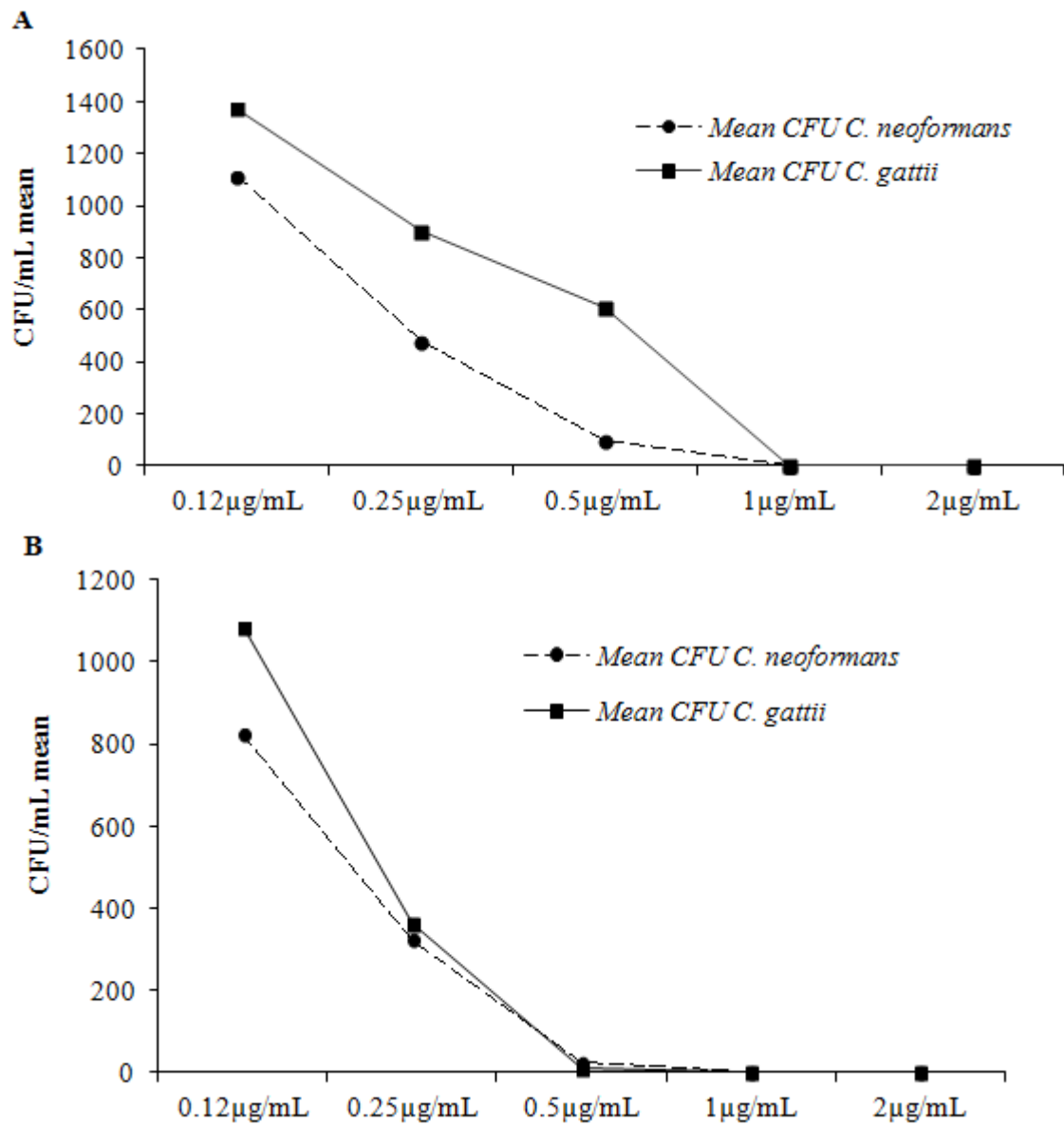


Figure 2 Graphic lines showing the mean of CFU mL⁻¹ obtained in minimum fungicidal concentration by plating the range from 0.12 to 2.0 µg/mL of AMB after two (A) and six hours (B) of incubation of *C. neoformans* VNI and *C. gattii* VGII against AMB.

References:

- Azevedo, Ana Carolina, Fernando César Bizerra, Daniel Arquimedes da Matta, Leila Paula de Almeida, Robert Rosas, and Arnaldo Lopes Colombo. 2011. "In Vitro Susceptibility of a Large Collection of *Candida* Strains against Fluconazole and Voriconazole by Using the CLSI Disk Diffusion Assay." *Mycopathologia* 171 (6): 411–416.
- Baddley, J W, J R Perfect, R A Oster, R A Larsen, G A Pankey, H Henderson, D W Haas, et al. 2008. "Pulmonary Cryptococcosis in Patients without HIV Infection: Factors Associated with Disseminated Disease." *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology* 27 (10): 937–43. doi:10.1007/s10096-008-0529-z.
- Borghi, Elisa, Roberta Iatta, Rita Sciota, Caterina Biassoni, Teresa Cuna, Maria Teresa Montagna, and Giulia Morace. 2010. "Comparative Evaluation of the Vitek 2 Yeast Susceptibility Test and CLSI Broth Microdilution Reference Method for Testing Antifungal Susceptibility of Invasive Fungal Isolates in Italy: The GISIA3 Study." *Journal of Clinical Microbiology* 48 (9): 3153–57. doi:10.1128/JCM.00952-10.
- Brizendine, Kyle D, John W Baddley, and Peter G Pappas. 2011. "Pulmonary Cryptococcosis." *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* 32 (6): 727–34. doi:10.1055/s-0031-1295720.
- Cantón, Emilia, Javier Pemán, Angel Viudes, Guillermo Quindós, Miguel Gobernado, and Ana Espinel-Ingroff. 2003. "Minimum Fungicidal Concentrations of Amphotericin B for Bloodstream *Candida* Species." *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 45 (3): 203–6.
- Cejudo, M A Trinidad González, Auxiliadora González Gallego, Emilia Cantón Lacasa, Ana Isabel Aller, Ana Romero, Javier Pemán García, Guillermo Quindós Andrés, and Estrella Martín-Mazuelos. 2010. "Evaluation of the VITEK 2 System to Test the Susceptibility of *Candida* Spp., *Trichosporon Asahii* and *Cryptococcus neoformans* to Amphotericin B, Flucytosine, Fluconazole and Voriconazole: A Comparison with the M27-A3 Reference Method." *Medical Mycology: Official Publication of the International Society for Human and Animal Mycology* 48 (5): 710–19. doi:10.3109/13693780903473343.
- Chong, Hin Siong, Rebecca Dagg, Richard Malik, Sharon Chen, and Dee Carter. 2010. "In Vitro Susceptibility of the Yeast Pathogen *Cryptococcus* to Fluconazole and Other Azoles Varies with Molecular Genotype." *Journal of Clinical Microbiology* 48 (11): 4115–20. doi:10.1128/JCM.01271-10.

- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2008. “CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast; Approved Standard - Third Edition. CLSI Document M27-A3. Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008. (CLSI M27-A3; 2008)”. CLSI M27-A3; 2008.
- “Clinical Practice Guidelines for the Management of Cryptococcal Disease: 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America.” 2011. Accessed August 29. <http://cid.oxfordjournals.org/content/50/3/291.full.pdf+html>.
- CLSI document M27-S3 (2008). “Clinical Laboratory Standards. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast; Third Informational Supplement.”
- “Comparative Analysis of Etest and Broth Microdilution Method (AFST-EUCAST) for Trends in Antifungal Drug Susceptibility Testing of Brazilian *Cryptococcus neoformans* Isolates.” 2012. Accessed March 1. <http://jmm.sgmjournals.org/content/55/12/1693.full.pdf+html>.
- Cuenca-Estrella, Manuel, Alicia Gomez-Lopez, Ana Alastruey-Izquierdo, Leticia Bernal-Martinez, Isabel Cuesta, Maria J Buitrago, and Juan L Rodriguez-Tudela. 2010. “Comparison of the Vitek 2 Antifungal Susceptibility System with the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Broth Microdilution Reference Methods and with the Sensititre YeastOne and Etest Techniques for in Vitro Detection of Antifungal Resistance in Yeast Isolates.” *Journal of Clinical Microbiology* 48 (5): 1782–86. doi:10.1128/JCM.02316-09.
- Day, Jeremy N, Tran T H Chau, Marcel Wolbers, Pham P Mai, Nguyen T Dung, Nguyen H Mai, Nguyen H Phu, et al. 2013. “Combination Antifungal Therapy for Cryptococcal Meningitis.” *The New England Journal of Medicine* 368 (14): 1291–1302. doi:10.1056/NEJMoa1110404.
- De Bedout, C, N Ordóñez, B L Gómez, M C Rodríguez, M Arango, A Restrepo, and E Castañeda. 1999. “In Vitro Antifungal Susceptibility of Clinical Isolates of *Cryptococcus neoformans* Var. *Neoformans* and *C. Neoformans* Var. *Gattii*.” *Revista Iberoamericana de Micología* 16 (1): 36–39.
- Dias, Amanda L T, Flavia E Matsumoto, Marcia S C Melhem, Eriques G da Silva, Marcos E Auler, Antonio M de Siqueira, and Claudete R Paula. 2006. “Comparative Analysis of Etest and Broth Microdilution Method (AFST-EUCAST) for Trends in Antifungal Drug Susceptibility Testing of Brazilian *Cryptococcus neoformans* Isolates.” *Journal of Medical Microbiology* 55 (Pt 12): 1693–99. doi:10.1099/jmm.0.46789-0.

- Favalessa, Olivia Cometti, Luciano Correa Ribeiro, Tomoko Tadano, Cor Jesus Fernandes Fontes, Flávio Basili Dias, Bruno Pereira Albuquerque Coelho, and Rosane Christine Hahn. 2009. “[First Description of Phenotypic Profile and in Vitro Drug Susceptibility of *Cryptococcus* Spp Yeast Isolated from HIV-Positive and HIV-Negative Patients in State of Mato Grosso].” *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 42 (6): 661–65.
- Green, L, B Petersen, L Steimel, P Haerber, and W Current. 1994. “Rapid Determination of Antifungal Activity by Flow Cytometry.” *Journal of Clinical Microbiology* 32 (4): 1088–91.
- Jarvis, Joseph N, and Thomas S Harrison. 2008. “Pulmonary Cryptococcosis.” *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* 29 (2): 141–50. doi:10.1055/s-2008-1063853.
- Joung, Young Hee, Hye Ryoum Kim, Mi Kyung Lee, and Ae Ja Park. 2007. “Fluconazole Susceptibility Testing of *Candida* Species by Flow Cytometry.” *The Journal of Infection* 54 (5): 504–8. doi:10.1016/j.jinf.2006.09.016.
- Kidd, S E, F Hagen, R L Tschärke, M Huynh, K H Bartlett, M Fyfe, L Macdougall, T Boekhout, K J Kwon-Chung, and W Meyer. 2004. “A Rare Genotype of *Cryptococcus gattii* Caused the Cryptococcosis Outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada).” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (49): 17258–63. doi:10.1073/pnas.0402981101.
- Kwon-Chung, K J, I Polacheck, and J E Bennett. 1982. “Improved Diagnostic Medium for Separation of *Cryptococcus neoformans* Var. *Neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus Neoformans* Var. *Gattii* (serotypes B and C).” *Journal of Clinical Microbiology* 15 (3): 535–37.
- Meyer, W, K Marszewska, M Amirmostofian, R P Igreja, C Hardtke, K Methling, M A Viviani, et al. 1999. “Molecular Typing of Global Isolates of *Cryptococcus neoformans* Var. *Neoformans* by Polymerase Chain Reaction Fingerprinting and Randomly Amplified Polymorphic DNA—a Pilot Study to Standardize Techniques on Which to Base a Detailed Epidemiological Survey.” *Electrophoresis* 20 (8): 1790–99. doi:10.1002/(SICI)1522-2683(19990101)20:8<1790::AID-ELPS1790>3.0.CO;2-2.
- Meyer, W., A. Castañeda, S. Jackson, M. Huynh, E. Castañeda, and others. 2003. “Molecular Typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* Isolates.” *Emerging Infectious Diseases* 9 (2): 189.

- Meyer, W., A. Castañeda, S. Jackson, M. Huynh, E. Castañeda, and others. 2003. "Molecular Typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* Isolates." *Emerging Infectious Diseases* 9 (2): 189.
- Millard, P J, B L Roth, H P Thi, S T Yue, and R P Haugland. 1997. "Development of the FUN-1 Family of Fluorescent Probes for Vacuole Labeling and Viability Testing of Yeasts." *Applied and Environmental Microbiology* 63 (7): 2897–2905.
- Moraes, E M P, N S Primola, and Júnia Soares Hamdan. 2003. "Antifungal Susceptibility of Clinical and Environmental Isolates of *Cryptococcus neoformans* to Four Antifungal Drugs Determined by Two Techniques." *Mycoses* 46 (5-6): 164–68.
- Morales, Bernardina Penarrieta, Ivan Neves Junior, Luciana Trilles, Alvaro Luiz Bertho, Raquel De Vasconcellos Carvalhaes De Oliveira, Marília Martins Nishikawa, Mônica Dos Santos Elias, Bodo Wanke, and Márcia Dos Santos Lazéra. 2013. "Determination of the Minimum Inhibitory Concentration of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* against Fluconazole by Flow Cytometry." *Medical Mycology: Official Publication of the International Society for Human and Animal Mycology*. doi:10.3109/13693786.2013.806827.
- Perfect, John R, William E Dismukes, Francoise Dromer, David L Goldman, John R Graybill, Richard J Hamill, Thomas S Harrison, et al. 2010. "Clinical Practice Guidelines for the Management of Cryptococcal Disease: 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America." *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 50 (3): 291–322. doi:10.1086/649858.
- Peterson, J. F., M. A. Pfaller, D. J. Diekema, M. G. Rinaldi, K. M. Riebe, and N. A. Ledeboer. 2011. "Multicenter Comparison of the Vitek 2 Antifungal Susceptibility Test with the CLSI Broth Microdilution Reference Method for Testing Caspofungin, Micafungin, and Posaconazole against *Candida* Spp." *Journal of Clinical Microbiology* 49 (5): 1765–71.
- Pfaller, M A, D J Diekema, G W Procop, and M G Rinaldi. 2007. "Multicenter Comparison of the VITEK 2 Antifungal Susceptibility Test with the CLSI Broth Microdilution Reference Method for Testing Amphotericin B, Flucytosine, and Voriconazole against *Candida* Spp." *Journal of Clinical Microbiology* 45 (11): 3522–28. doi:10.1128/JCM.00403-07.
- Pina-Vaz, C., S. Costa-de-Oliveira, A. G Rodrigues, and A. Espinel-Ingroff. 2005. "Comparison of Two Probes for Testing Susceptibilities of Pathogenic Yeasts to Voriconazole, Itraconazole, and Caspofungin by Flow Cytometry." *Journal of Clinical Microbiology* 43 (9): 4674.

- Pina-Vaz, Cidália, Sofia Costa-de-Oliveira, Acácio G Rodrigues, and Ana Espinel-Ingroff. 2005. "Comparison of Two Probes for Testing Susceptibilities of Pathogenic Yeasts to Voriconazole, Itraconazole, and Caspofungin by Flow Cytometry." *Journal of Clinical Microbiology* 43 (9): 4674–79. doi:10.1128/JCM.43.9.4674-4679.2005.
- Pina-Vaz, Cidália, and Acácio Gonçalves Rodrigues. 2010a. "Evaluation of Antifungal Susceptibility Using Flow Cytometry." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 638: 281–89. doi:10.1007/978-1-60761-611-5_21.
- . 2010b. "Evaluation of Antifungal Susceptibility Using Flow Cytometry." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 638: 281–89. doi:10.1007/978-1-60761-611-5_21.
- Ramani, R., and V. Chaturvedi. 2000. "Flow Cytometry Antifungal Susceptibility Testing of Pathogenic Yeasts Other than *Candida albicans* and Comparison with the NCCLS Broth Microdilution Test." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44 (10): 2752.
- Ramani, R., M. Gangwar, and V. Chaturvedi. 2003. "Flow Cytometry Antifungal Susceptibility Testing of *Aspergillus fumigatus* and Comparison of Mode of Action of Voriconazole Vis-a-Vis Amphotericin B and Itraconazole." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47 (11): 3627.
- Rudensky, Bernard, Ellen Broidie, Amos M Yinnon, Tanya Weitzman, Esther Paz, Nathan Keller, and David Raveh. 2005. "Rapid Flow-Cytometric Susceptibility Testing of *Candida* Species." *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 55 (1): 106–9. doi:10.1093/jac/dkh492.
- Saag, M S, W G Powderly, G A Cloud, P Robinson, M H Grieco, P K Sharkey, S E Thompson, A M Sugar, C U Tuazon, and J F Fisher. 1992. "Comparison of Amphotericin B with Fluconazole in the Treatment of Acute AIDS-Associated Cryptococcal Meningitis. The NIAID Mycoses Study Group and the AIDS Clinical Trials Group." *The New England Journal of Medicine* 326 (2): 83–89. doi:10.1056/NEJM199201093260202.
- Santos, Wallace Raimundo A dos, Wieland Meyer, Bodo Wanke, Solange P S Evangelista Costa, Luciana Trilles, Jose Luiz M do Nascimento, Rita Medeiros, et al. 2008. "Primary Endemic *Cryptococcus gattii* by Molecular Type VGII in the State of Pará, Brazil." *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 103 (8): 813–18.
- Singh, Nina, Françoise Dromer, John R Perfect, and Olivier Lortholary. 2008. "Cryptococcosis in Solid Organ Transplant Recipients: Current State of the Science." *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 47 (10): 1321–27. doi:10.1086/592690.

- Tiphine, M, V Letscher-Bru, and R Herbrecht. 1999. "Amphotericin B and Its New Formulations: Pharmacologic Characteristics, Clinical Efficacy, and Tolerability." *Transplant Infectious Disease: An Official Journal of the Transplantation Society* 1 (4): 273–83.
- Trilles, L., W. Meyer, B. Wanke, J. Guarro, and M. Lazéra. 2011. "Correlation of Antifungal Susceptibility and Molecular Type within the *Cryptococcus neoformans/C. gattii* Species Complex." *Medical Mycology* (0): 1–5.
- Trilles, Luciana, Márcia dos Santos Lazéra, Bodo Wanke, Raquel Vasconcelos Oliveira, Gláucia Gonçalves Barbosa, Marília Martins Nishikawa, Bernardina Penarrieta Morales, and Wieland Meyer. 2008. "Regional Pattern of the Molecular Types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil." *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 103 (5): 455–62.
- Trilles, Luciana, Wieland Meyer, Bodo Wanke, Josep Guarro, and Marcia Lazéra. 2011. "Correlation of Antifungal Susceptibility and Molecular Type within the *Cryptococcus neoformans/C. gattii* Species Complex." *Medical Mycology: Official Publication of the International Society for Human and Animal Mycology*. doi:10.3109/13693786.2011.602126. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21859388>.
- Vale-Silva, Luís André, and Vladimír Buchta. 2006. "Antifungal Susceptibility Testing by Flow Cytometry: Is It the Future?" *Mycoses* 49 (4): 261–73. doi:10.1111/j.1439-0507.2006.01243.x.
- Van Duin, D., A. Casadevall, and J. D. Nosanchuk. 2002. "Melanization of *Cryptococcus Neoformans* and *Histoplasma capsulatum* Reduces Their Susceptibilities to Amphotericin B and Caspofungin." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46 (11): 3394–3400. doi:10.1128/AAC.46.11.3394-3400.2002.
- Vanden Bossche, H, F Dromer, I Improvisi, M Lozano-Chiu, J H Rex, and D Sanglard. 1998. "Antifungal Drug Resistance in Pathogenic Fungi." *Medical Mycology: Official Publication of the International Society for Human and Animal Mycology* 36 Suppl 1: 119–28.
- Wenisch, C, K F Linnau, B Parschalk, K Zedtwitz-Liebenstein, and A Georgopoulos. 1997. "Rapid Susceptibility Testing of Fungi by Flow Cytometry Using Vital Staining." *Journal of Clinical Microbiology* 35 (1): 5–10.

Wingard, J R, P Kubilis, L Lee, G Yee, M White, L Walshe, R Bowden, E Anaissie, J Hiemenz, and J Lister. 1999. "Clinical Significance of Nephrotoxicity in Patients Treated with Amphotericin B for Suspected or Proven Aspergillosis." *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 29 (6): 1402–7. doi:10.1086/313498.

CAPÍTULO III

(Artigo submetido)

Medical Mycology



**Combination of amphotericin B and 5-flucytosine on
Cryptococcus neoformans VNI and *Cryptococcus gattii* VGII
in presence or absence of melanin**

O capítulo III aborda determinação do perfil da suscetibilidade antifúngica *in vitro* de *C. neoformans* VNI e *C. gattii* VGII, para obtenção de CIM e CIFI de Anfotericina B e 5-fluorocitosina. Para tal foi utilizando método padrão CLSI M27-A3 e a técnica de tabuleiro de xadrez. Também foram observados os efeitos da melanina na combinação de anfotericina B e 5-fluorocitosina, através da determinação da CML. Estes resultados abordam parcialmente os objetivos 1; 3 e 4 a seguir:

- 1- Determinar o perfil da suscetibilidade *in vitro* de *C. neoformans* e *C. gattii* para obtenção da concentração inibitória mínima (CIM) de fluconazol, itraconazol, 5-fluorocitosina e anfotericina B isoladamente e de forma combinada de Anfotericina B com 5-fluorocitosina e Anfotericina B com Voriconazol
- 3- Definir a concentração mínima letal (CML) de 5FC e AMB, testadas isoladamente e em combinação.
- 4- Avaliar a ação da melanina na suscetibilidade antifúngica de *C. neoformans* e *C. gattii* frente 5-fluorocitosina e anfotericina B na forma combinada e isolada de 5-fluorocitosina.

Combination of amphotericin B and 5-flucytosine on Cryptococcus neoformans VNI and Cryptococcus gattii VGII in presence or absence of melanin

Short title: *Combination of amphotericin B and 5-flucytosine on Cryptococcus spp.*

Key words: *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*, Melanin, Amphotericin B, 5-flucytosine

Bernardina Penarrieta Morales¹, Rafaella Miranda Moraes¹, Luciana Trilles¹, Bodo Wanke¹, Márcia Lazera¹

Mycology Laboratory of Evandro Chagas Clinical Research Institute (IPEC), Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil¹

Abstract

Current treatment regimens involving antifungal combination therapy have been used for the treatment of deep-tissue mycosis to improve the results obtained with therapy alone. In the present study, *in vitro* combination of amphotericin B (AMB) and ***5-Fluorocytosine*** (5FC) against different clinical isolates agents of cryptococcosis (17 *Cryptococcus neoformans* VNI and 18 *Cryptococcus gattii* VGII) were analyzed. Besides, the influence of the melanin expression and different glucose concentration on the determination of synergism or antagonism of AMB combined with 5FC was also analyzed. The majority of *C. neoformans* VNI strains (16/17) were indifferent against the combination of AMB and 5FC with L-DOPA, and 1 strain showed partial synergism. *C. gattii* VGII showed partial synergism (2/18) and additive action (4/18), but most isolates (12/18) were indifferent. In the absence of L-DOPA the detection of the additive effect increases ($P=0.03$), mainly for VGII (8/18). In the medium containing 2% glucose without L-DOPA a greater synergic interaction was observed (17/35) for both molecular types analyzed ($P<0.05$). Thus, constitution of the medium interferes with the results and analysis of the drugs interaction on *Cryptococcus* spp. strains, highlighting the importance of the addition, specially, of 2% glucose instead of 0.2% to the medium for detection of synergic interaction between AMB and 5FC.

Introduction

Cryptococcosis is a systemic mycosis, caused by encapsulated yeasts of the genus *Cryptococcus*. *Cryptococcus neoformans* is cosmopolitan in immune-compromised patients, and may present itself as primary cryptococcosis, endemic in tropical and subtropical areas primarily caused by *Cryptococcus gattii*. Both species can cause meningoencephalitis with or without evident pulmonary lesions [1].

The treatment of choice for cryptococcosis by *C. neoformans* depends on both the anatomic sites of involvement and the host's immune status [2]. Amphotericin B (AMB) is the regimen of choice for disseminated cryptococcosis. The limiting factor of this drug is to cause cellular toxicity, with frequent nephrotoxicity, in these cases lipid formulation is given to the patient [3]. High doses of AMB associated with 5-fluorocytosine (5FC) is the first choice as induction therapy for invasive cryptococcosis, followed by fluconazole in the consolidation phase [4]. In immune-competent hosts, careful observation may be important for choice of antifungal therapeutic scheme considering the occurrence of infection [2] [4 - 6]. Relapses after treatment have been reported in primary *C. gattii* infections [7]. On the other hand, in vitro studies point to the occurrence of less susceptible isolates of *C. gattii*. This can be related to the difficulty of cryptococcosis treatment [7, 8]. thus induction AMB plus 5FC is recommended for *C. gattii* neurological cryptococcosis (6 weeks) and when localized to the lung (2 weeks) [9].

Current treatment regimens involving antifungal combination therapy have been used for the treatment of deep-tissue mycosis to improve the results obtained with therapy alone,

especially in patients affected by multi-resistant agents that do not respond to standard treatment [4] [10-12].

Combination therapy with AMB and 5FC showed faster fungicidal activity when compared to treatment with AMB alone and a lower proportion of patients with relapse was observed. In laboratory tests, sterile cerebrospinal fluid (CSF) was detected early, at least two weeks after the treatment. In addition, interaction of drugs allowed rapid reduction of fungal load in tissue host, as well as lowering possible toxicity [13].

Melanin production is related to the pathogenic species of the genus *Cryptococcus* and melanin deposit on the wall of *C. neoformans* has been demonstrated in the central nervous system of patients with cryptococcosis [14, 15]. Melanin is recognized as a virulence factor and has been mentioned as a possible factor which interferes with antifungal susceptibility [16 - 18]. Melanin acts as an antioxidant, protecting the integrity of the cells and interfering with susceptibility to antifungal agents; it also protects the cell from extreme temperatures and nullifies the action of antibodies that mediate phagocytosis [19, 20].

The critical role of glucose has been recognized for virulence development as well as being a source of carbon for *Cryptococcus* [21].

In the present study, *in vitro* combination of AMB and 5FC against different clinical isolates, agents of cryptococcosis (*C. neoformans* VNI and *C. gattii* VGII) were studied. Besides, the influence of the melanin expression and different glucose concentration on the determination of synergism or antagonism of AMB plus 5FC was also analyzed.

Material and methods

To analyze *in vitro* interactions of AMB and 5-FC against *C. neoformans* (VNI) and *C. gattii* (VGII) different groups were studied: 1- checkerboard protocol without L-Dopa, using 2% glucose; 2a- the same procedure using 0.2% glucose without L-Dopa; 2b- the same procedure using 0.2% glucose with L-Dopa.

Strains

For this test 35 isolates were used: seventeen *C. neoformans* VNI and eighteen *C. gattii* VGII. Purity and viability tests were performed by inoculation of the strains on Petri dishes containing Agar Niger Seed (*Guizotia abyssinica*) (ANS), incubated at 25 °C for 48 hours, transferred to Sabouraud Agar (SC) drug-free (Difco™ Laboratories, Mariland, USA). Two quality control strains were used in each test: *Candida parapsilopsis* INCQS 40038 (ATCC 22019) and *Candida krusei* INCQS 40147 (ATCC 6258). All *C. neoformans* and *C. gattii* isolates tested in this experiment were stored in the Pathogenic Fungal Collection of IPEC/FIOCRUZ.

Antifungal drugs

To assess susceptibility, the standardized method CLSI M27-A3 (2008) [22] and [23] was followed. The reference drugs were used in powder form: amphotericin B (AMB) (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA) diluted in dimethyl sulfoxide- DMSO 99.70% (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA), and 5-fluorocytosine (5FC) (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA) diluted in sterile distilled water. The drug solutions were filtered through a 0.22 micrometer membrane and were stored at -70°C for up to one year.

Serial dilutions of drugs to Checkerboard test with 0.2% and 2% glucose

The drug dilutions were prepared in RPMI-1640 medium with L-Glutamine powder without bicarbonate (Gibco™, New York, USA), buffered with MOPS - Buffer acid [3-Morlino] P. propanosulfônico A. (Vetec Fine Chemicals LTD, Duque de Caxias, Brazil) plus glucose (Difco™ Laboratories, Maryland, USA) at final concentration 2% or 0.2%, adjusted to pH 7.0 with hydrochloric acid and sodium hydroxide and sterilized by filtration through a 0.22 micrometer membrane. The micro-dilutions were prepared in the following ranges, final concentration: 0.004 to 2µg/ml for AMB and 0.25 to 32µg/ml for 5FC. Then dilutions of 5FC 100 µl were distributed to each well in order of increasing concentration from row line H12 to A12 (of microplates). For the serial dilutions of AMB 100 µl were distributed in each well of the H11 line ascending concentration to H2. The first column was reserved for sterility control and growth control as shown in Figure 1. The combination of AMB and 5FC was distributed in wells in ascending concentration as shown in Figure 1 (Vitale et al. 2,005).

The microplates were stored at -70°C for up to six months. Each batch of microplates was tested for quality control as recommended by CLSI M27-A3 using control strains *C. parapsilopsis* and *C. krusei*.

Inoculum without L-DOPA

The inoculum was suspended from two to five colonies of diameter approximately 1mm (grown in drug-free SC for 48 hours at 35 °C) in 5 ml of sterile saline (0.85% NaCl). This suspension was vortexed for approximately 15 seconds and the cell density adjusted with

sterile saline using Bio-Mérieux Densichek instrument to match the turbidity to 0.5 McFarland (1×10^6 at 5×10^6 CFU / ml). The suspension was diluted with RPMI1640 (glucose 0.2% or 2%) to a concentration of $5.0 \times 10^2 - 2.5 \times 10^3$ CFU / ml and inoculated into micro U-bottom plates with AMB and 5FC previously prepared.

Inoculum with L-DOPA

To determine the MIC of isolates expressing melanin, the inoculum was prepared with RPMI1640 0.2% up to approximately $5.0 \times 10^2 - 2.5 \times 10^3$ CFU / ml, and 2 mM of L-3,4-Dihydroxyphenyl-alanine (L-DOPA) in dimethyl sulfoxide - DMSO 99.70% (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA) [17]. After preparation, the inocula were distributed on the plates with the drugs previously prepared.

Interpretation of CLSI Results

The antifungal susceptibility test was analyzed by visual reading performed with the aid of tilted mirror support plate, after 72 hours incubation at 35°C. MIC-0 of AMB and MIC-2 of the 5-FC were determined in line H and column 12 of the micro-plate, respectively. In each micro-plate one isolate was analyzed; sterility control of RPMI 1640 and growth control of isolate were also analyzed in the first column of the microplate.

Interpretation of results of Checkerboard dilution test

The fractional inhibitory concentration (FIC) was determined in the absence of growth in the well with the lowest concentration of AMB using checkerboard dilution test. To determine FIC indices (FICIs) and synergism or antagonism were checked out following previous publications [24 - 27]. Thus the FIC index (FICI) was obtained as follows: $A/MICa + B/MICb = FICA + FIC B = FICI$; where **A** is MICs of AMB in combination; **B** is MICs of 5FC in combination; **MICa** is MIC of AMB alone; **MICb** is MIC of 5FC alone; then FICIs values were interpreted as follows: Synergism < 0.5; partial synergism from 0.5 to 0.75; additive effect from 0.76 to 1, 0; indifference > 1 to 4.0; and antagonism > 4.0 [24 - 27].

Minimum lethal concentration *experiments for the CLSI and Checkerboard dilution tests*

To determine the minimum lethal concentration (MLC) of AMB and 5FC, combined or not, with and without L-Dopa, the determination of MIC and FIC was carried out. Thus, the microplates were homogenized and 10µl of all the wells without cell growth were inoculated in plates containing SC Agar. The readings were done by counting of colonies after 72 hours of incubation at 35° C. The dilution which presented ≤ 5 colonies forming units (CFU) $\geq 80\%$ of death was considered as the MLC.

Statistics

For comparison of MICs and FICIs of *C. neoformans* VNI and *C. gattii* VGII, three different analyses were performed: **a-** 0.2% glucose medium with L-Dopa; **b-** 0.2% glucose medium without L-Dopa; and **c-** 2.0% glucose medium without L-Dopa. The Mann-Whitney

Test was used for compare the different molecular types and the Wilcoxon Test was used to compare the methodologies.

Results

All isolates presented expected growth in drug-free SC in 48 hours at 35° C. The MICs of quality control strains, *Candida parapsilopsis* and *Candida krusei*, were within the range recommended by CLSI [22, 23].

Antifungal susceptibility testing *in vitro* results, in combination and alone, of AMB and 5FC, with and without L-DOPA and different glucose concentrations are shown in Table 1.

Analyses of the results the MICs independent of molecular type (Wilcoxon Test), the effects of L-DOPA was not possible to visualize: For AMB was observed in presence, GM 0.20 and in absence, GM 0.26 with $p_v = 0.01$. For 5FC in presence, GM 1.12 and in absence, MG 3.69 with $p_v = 0.73$ was also observed.

In regarding the addition of glucose in the MICs independent of molecular type exposed to AMB and 5FC, higher GM with $p_v = 0.01$ with glucose 2.0% only for AMB was observed.

The results obtained from the interaction tests AMB and 5FC demonstrated the following results of CIFI: with L-DOPA 0.74-2.56 for *C. neoformans* VNI and 0.51-2.4 for *C. gattii* VGII; without L-DOPA, results of CIFI of 0.48-2.40 for *C. neoformans* VNI and 0.36-2.40 for *C. gattii* VGII. The results of interaction AMB and 5FC for molecular type are described in table 2.

For 5FC Analysis of the minimum lethal concentration results, MLC with and without L-DOPA, showed that all of the isolates tested grew in the greater concentration test used in this study ($>32\mu\text{g/mL}$).

For the combination of AMB and 5FC, the different MLC results obtained in presence and absence of L-DOPA in *C.gattii* VGII (GM 0.25) and *C.neoformans* VNI (GM 0.33) were not statistically significant ($p>0.05$). However, the analysis of all 35 strains showed greater GM values of MLC in the presence of L-DOPA (MG=0.48) than in its absence (MG=0.28), and this difference was statistically significant ($p=0.001$) – Wilcox Test.

Discussion

The therapy combination brought up several questions because *in vitro* results obtained had been controversial [27] [28] when comparing to clinical outcomes/responses. Moreover, antifungal mono-therapy had showed good performance in some cases, however, combination therapy may be a possible treatment in patients with invasive infections that do not respond well to mono-therapy [10].

The addition of L-DOPA to culture medium for susceptibility testing makes this method more complex, since it is necessary to freshly prepare it in order to protect it from air and light due to its instability as recommended by Sigma-Product information-Aldrich (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA)

In order to have expression of melanin by *Cryptococcus* a low concentration of glucose is necessary [19], this is the reason why 0.2% glucose was used in the tests with L-DOPA in this study.

Previous studies which analyzed MIC of *C. neoformans* found no difference in the results in isolates expressing melanin [16], however, in our study higher values of GM independent of molecular type for AMB, were observed in the absence of L-DOPA with significant $p_v = 0.01$.

In this study, comparing the MICs observed individually for each drug, we observed that in the presence of AMB the molecular type VGII with L-DOPA showed GM greater than VNI, but this difference was not statistically significant ($p_v = 0.56$). Regarding 5FC we observed that the molecular type VGII presented GM greater than VNI, with significant P value ($p_v = 0.01$). In the absence of L-DOPA was observed, GM greater for VGII with significant P value for AMB and 5FC (table 2).

Ikeda et al., 2003 after analyzing MICs of AMB and fluconazole were only able to show the melanin as a protective factor by analyzing viable fungal cells [16]. However, in our study it was not possible to verify the action of melanin, for 5FC, since the results obtained were higher than CML $>32\mu\text{g/ml}$ for all isolates analyzed with and without L-Dopa.

Comparing the MICs obtained with 0.2 and 2.0% glucose it was observed that: the GM of VNI is higher than GVII for AMB, but it is not statistically significant ($p_v=0.9$) with 2% glucose. However, the GM of 5FC is higher for molecular type VGII for two glucose concentrations, and this difference is statistically significant according to Mann-Whitney T.

In relation to the results obtained in the interaction of AMB and 5FC we verified in the medium with L-DOPA synergism was not detected in 17 isolates of *C. neoformans*, the majority being indifferent (16/17). In these same conditions for VGII partial synergism was observed (2/18) and additive action (4/18), the majority being indifferent (12/18). In the absence of L-DOPA the detection of the additive effect increases, mainly for VGII (8/18) as shown in table 2.

In the medium containing 2% glucose and without L-DOPA a greater synergic interaction was observed (17/35) for both molecular types analyzed. However, constitution of the medium interferes with the results and analysis of the drug interaction with *Cryptococcus* analyzed, mainly through the increase of glucose concentration from 0.2% to 2%. In this case, the partial synergism observed (3/35) with 0.2% glucose increased to (13/35) with 2% glucose, highlighting the importance of the addition of 2% glucose to the medium for detection of synergic interaction in the drugs analyzed.

In comparing the 35 isolates analyzed using the Wilcoxon Test it was observed that the values of GM of MIC obtained for AMB and 5FC are higher when there is no addition of L-DOPA to the medium. But, a significant statistic was only observed for the values of AMB. A higher value of GM and $p_v = 0.01$ was observed in medium with 2% glucose only for Amfotericin B, which was not seen for 5FC. The addition of glucose at 2% to the medium, probably can accelerate cellular multiplication because glucose is used as source carbon by *Cryptococcus* [21]. However, Nguyen & Yu [29] and Rodríguez-Tudela *et al.* [30] reported that high concentrations of glucose can result in elevated MICs.

Gomez *et al.* [31], related that melanin can link itself to AMB and prevents the fungicidal action of this drug [31]. In our study, the minimum lethal concentration values of the combination of AMB and 5FC are higher in the presence of L-DOPA, suggesting that the production of melanin concomitant to simultaneous exposure *in vitro* to these two antifungal has a protection role the same possibly also occurring *in vivo*, for example, in pulmonary tissue where a low level of glucose is observed and the production of melanin is favored and contribute to the virulence as mentioned by Mednick *et al.* [32].

The increase of synergic interaction and additive interaction is evident in medium with 2.0% glucose mainly for the molecular type VGII. On the other hand, in the test carried out with L-DOPA, highlights to the large number of isolates with indifferent interaction.

The results of this study collaborate to affirm the importance of the combination AMB and 5FC in the treatment as related by Day et al. and Loyse et al. [11][12].

Schwartz et al. [33] carried out an experimental study where mice inoculated with *C. neoformans* resistant to 5FC, developed disseminated Cryptococcosis, but when treated with the combination AMB and 5FC there was control of the same evidencing the additive effect of the interaction between both drugs.

Despite some authors [29] [30] mention that the addition of glucose to a final concentration of 2% does not interfere in the MICs results for types of Cryptococcosis, in this study we observed the importance for studies to define the concentration of glucose, *in vitro* studies which enable a better correlation *in vitro/in vivo* for species of *Cryptococcus*, especially in the analysis of antifungal drug combination. However, the standard method of microdilution in broth CLSI M27-A3 uses 0.2% glucose; the same allows the optional use of 2% glucose in the medium to test susceptibility to *Cryptococcus*. Thus, the RPMI medium in final concentration of 2% glucose may be used in susceptibility tests to antifungal agents for *Cryptococcus*.

In relation to the addition of L-Dopa to the medium to analyze interaction of AMB with 5FC we observed that this alters the final results, reducing the detection of additive interaction and synergism between the two antifungal agents, which indicates the necessity for future studies.

Acknowledgments

To Evandro Chagas Clinical Research Institute (IPEC-FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil for financial support and National Institute for Quality in health, (INCQS-FIOCRUZ) Rio de Janeiro, Brazil for providing quality control isolates

Declaration of interest

The author and co-authors did not report any potential conflict of interest in this study and are responsible for the content and writing of the paper.

References

1. Negróni R. Cryptococcosis. *Clin Dermatol*. 2012;**30**: 599–609.
2. Saag MS, Graybill RJ, Larsen RA, *et al*. Practice guidelines for the management of cryptococcal disease. Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2000;**30**: 710–718.
3. Chaya R, Padmanabhan S, Anandaswamy V, Moin A. Disseminated Cryptococcosis presenting as cellulitis in a renal transplant recipient. *J Infect Dev Ctries*. 2013;**7**: 60–63.
4. Perfect, JR, Dismukes WE, Dromer F, *et al*. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of america. *Clin Infect Dis*. 2010; **50**: 291–322.
5. Jarvis JN, Harrison TS. Pulmonary cryptococcosis. *Semin Respir Crit Care Med*. 2008; **29**: 141–150.
6. Brizendine KD, Baddley JW, Pappas PG. Pulmonary cryptococcosis. *Semin Respir Crit Care Med*. dezembro de 2011; **32**: 727–734.
7. Moraes EMP, Prímola NS, Hamdan JS. Antifungal susceptibility of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* to four antifungal drugs determined by two techniques. *Mycoses*. 2003; **46**: 164–168.
8. Trilles L, Fernández-Torres B, Lazéra M dos S, Wanke B, Guarro J. In vitro antifungal susceptibility of *Cryptococcus gattii*. *J Clin Microbiol*. 2004; **42**: 4815–4817.
9. Chen SC-A, Korman TM, Slavin MA, *et al*. Antifungal therapy and management of complications of cryptococcosis due to *Cryptococcus gattii*. *Clin Infect Dis*. 22 de maio de 2013; **57**: 543-551.
10. Cuenca-Estrella M. Combinations of antifungal agents in therapy--what value are they? *J Antimicrob Chemother*. 2004; **54**: 854–869.

11. Day JN, Chau TTH, Lalloo DG. Combination antifungal therapy for cryptococcal meningitis. *N Engl J Med*. 2013; **368**: 2522–2523.
12. Loyse A, Bicanic T, Jarvis JN. Combination antifungal therapy for cryptococcal meningitis. *N Engl J Med*. 2013; **368**: 2522.
13. Brouwer AE, Rajanuwong A, Chierakul W, *et al*. Combination antifungal therapies for HIV-associated cryptococcal meningitis: a randomised trial. *Lancet*. 2004; **363**: 1764–1767.
14. Pedroso R dos S, da Costa KRC, Ferreira JC, Candido RC. [Evaluation of melanin production by *Cryptococcus* species in four different culture media]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007; **40**:566–568.
15. Casadevall A, Rosas AL, Nosanchuk JD. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Curr Opin Microbiol*. 2000; **3**: 354–358.
16. Ikeda R, Sugita T, Jacobson ES, Shinoda T. Effects of melanin upon susceptibility of *Cryptococcus* to antifungals. *Microbiol Immunol*. 2003; **47**: 271–277.
17. Van Duin D, Casadevall A, Nosanchuk JD. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002; **46**: 3394–3400.
18. Nosanchuk JD, Casadevall A. Budding of melanized *Cryptococcus neoformans* in the presence or absence of L-dopa. *Microbiology (Reading, Engl)*. 2003; **149**: 1945–1951.
19. Williamson PR. Laccase and melanin in the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *Front Biosci*. 1997; **2**: 99–107.
20. Kwon-Chung KJ, Rhodes JC. Encapsulation and melanin formation as indicators of virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*. 1986; **51**: 218–223.
21. Liu T-B, Wang Y, Baker GM, Fahmy H, Jiang L, Xue C. The glucose sensor-like protein Hxs1 is a high-affinity glucose transporter and required for virulence in *Cryptococcus neoformans*. *PLoS ONE*. 2013; **8**: 64239.
22. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI M27-A3). CLSI. Referenece Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast; Approved Standard - Third edition. CLSI document M27-A3. Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
23. CLSI document M27-S3. CLSI. Referenece Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast; Third Informational Supplement. CLSI document M27-S3. Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
24. Joung D-K, Joung H, Yang D-W, *et al*. Synergistic effect of rhein in combination with ampicillin or oxacillin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Exp Ther Med*. 2012; **3**: 608–612.
25. Te Dorsthorst DTA, Verweij PE, Meletiadis J, *et al*. In vitro interaction of flucytosine combined with amphotericin B or fluconazole against thirty-five yeast isolates determined by both the fractional inhibitory concentration index and the response surface approach. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002; **46** : 2982–2989.
26. Schwarz P, Dromer F, Lortholary O, Dannaoui E. Efficacy of amphotericin B in combination with flucytosine against flucytosine-susceptible or flucytosine-resistant isolates of *Cryptococcus neoformans* during disseminated murine cryptococcosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; **50**: 113–120.
27. Te Dorsthorst DTA, Verweij PE, Meletiadis J, *et al*. In vitro interaction of flucytosine combined with amphotericin B or fluconazole against thirty-five yeast isolates determined by both the fractional inhibitory concentration index and the response surface approach. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002; **46**: 2982–2989.

28. Odds FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother.* 2003; **52**:1.
29. Nguyen MH, Yu CY. Influence of incubation time, inoculum size, and glucose concentrations on spectrophotometric endpoint determinations for amphotericin B, fluconazole, and itraconazole. *J Clin Microbiol.* 1999; **37**: 141–145.
30. Rodríguez-Tudela JL, Martín-Díez F, Cuenca-Estrella M, Rodero L, Carpintero Y, Gorgojo B. Influence of shaking on antifungal susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans*: a comparison of the NCCLS standard M27A medium, buffered yeast nitrogen base, and RPMI-2% glucose. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; **44**: 400–404.
31. Gómez BL, Nosanchuk JD. Melanin and fungi. *Curr Opin Infect Dis.* 2003; **16**: 91–96.
32. Mednick AJ, Nosanchuk JD, Casadevall A. Melanization of *Cryptococcus neoformans* affects lung inflammatory responses during cryptococcal infection. *Infect Immun.* 2005; **73**: 2012–2019.
33. Schwarz P, Dromer F, Lortholary O, Dannaoui E. Efficacy of amphotericin B in combination with flucytosine against flucytosine-susceptible or flucytosine-resistant isolates of *Cryptococcus neoformans* during disseminated murine cryptococcosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; **50**: 113–120.

Table 1 Results of MIC and FIC of amphotericin B (AMB) and 5-fluorocytosine (5FC) in the presence and absence of L-DOPA *C. neoformans* VNI (n = 17) and *C. gattii* VGII (n = 18) with glucose 0.2 and 2.0%

Strains	<i>C. neoformans</i>	<i>C. gattii</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>C. gattii</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>C. gattii</i>
	With L-DOPA (0.2%)		Without L-DOPA (0.2%)		Glucose 2%	
Parameters (glucose)						
Range AMB (A*)	0.06-0.5	0.06-0.5	0.12-0.5	0.12-1	0.25-1	0.25-1
Range 5FC (B*)	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12
Range of MICa	0.06-0.5	0.06-0.5	0.12-0.5	0.12-0.5	0.5-1	0,5-1
GM	0.19	0.21	0.20	0.33	0.66	0.65
Pv= Mann-Withney T	0.56		0.01		0.90	
Intervals of MIC b	0.25-1	0.5-8	0.12-4	0.25-4	0.12-1	0,12-2
GM	0.69	1.78	0.71	1.36	0.33	1.03
Pv= Mann-Withney T	0.01		0.05		0.01	

A*= MICs of amphotericin B in combination.

B*= MICs of 5FC in combination.

MICa = minimum inhibitory concentration of amphotericin B in combination.

MICb = minimum inhibitory concentration of 5FC in combination.

GM= geometric mean.

Table 2 Interaction results of amphotericin B plus 5-fluorocytosine with and without L-DOPA and 0.2 versus 2.0% of glucose for *C. neoformans* VNI and *C. gattii* VGII

Results of FICI Molecular type	With L-DOPA		Without L-DOPA		Without L-DOPA	
	Glucose 0.2%		Glucose 0.2%		Glucose 2.0%	
	VNI	VGII	VNI	VGII	VNI	VGII
Range of FICI	0.74-2.56	0.51 -2.4	0.48-2.48	0.36-2.48	0.3-1,5	0.3-1,2
Synergism < 0,5	-	-	1	2	1	3
Partial synergism 0,5 – 0,75	1	2	1	2	6	7
Additive 0,76 – 1,0	-	4	3	8	4	5
Indifferent >1 – 4,0	16	12	12	6	6	3
Antagonistic >4	-	-	-	-	-	-

FICI = fractional inhibitory concentration index.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	SC	8FC 2 AMB	8FC 1 AMB	8FC 0.5 AMB	8FC 0.25 AMB	8FC 0.12 AMB	8FC 0.06 AMB	8FC 0.03 AMB	8FC 0.015 AMB	8FC 0.008 AMB	8FC 0.004 AMB	32µg/ml FC
B	SC	0.25FC 2 AMB	4FC 1 AMB	4FC 0.5 AMB	4FC 0.25 AMB	4FC 0.12 AMB	4FC 0.06 AMB	4FC 0.03 AMB	4FC 0.015 AMB	4FC 0.008 AMB	4FC 0.004 AMB	16µg/ml FC
C	SC	0.25FC 2 AMB	2FC 1 AMB	2FC 0.5 AMB	2FC 0.25 AMB	2FC 0.12 AMB	2FC 0.06 AMB	2FC 0.03 AMB	2FC 0.015 AMB	2FC 0.008 AMB	2FC 0.004 AMB	8µg/ml FC
D	SC	0.25FC 2 AMB	1FC 1 AMB	1FC 0.5 AMB	1FC 0.25 AMB	1FC 0.12 AMB	1FC 0.06 AMB	1FC 0.03 AMB	1FC 0.015 AMB	1FC 0.008 AMB	1FC 0.004 AMB	4µg/ml FC
E	SC	0.25FC 2 AMB	0.5FC 1 AMB	0.5FC 0.5 AMB	0.5FC 0.25 AMB	0.5FC 0.12 AMB	0.5FC 0.06 AMB	0.5FC 0.03 AMB	0.5FC 0.015 AMB	0.5FC 0.008 AMB	0.5FC 0.004 AMB	2µg/ml FC
F	SC	0.25FC 2 AMB	0.25FC 1 AMB	25FC 0.5 AMB	0.25FC 0.25 AMB	0.25FC 0.12 AMB	0.25FC 0.06 AMB	0.25FC 0.03 AMB	0.25FC 0.015 AMB	0.25FC 0.008 AMB	0.25FC 0.004 AMB	1µg/ml FC
G	GC	0.12FC 2 AMB	0.12FC 1 AMB	0.12FC 0.5 AMB	0.12FC 0.25 AMB	0.12FC 0.12 AMB	0.12FC 0.06 AMB	0.12FC 0.03 AMB	0.12FC 0.015 AMB	0.12FC 0.008 AMB	0.12FC 0.004 AMB	0.5µg/ml FC
H	GC	2 AMB	1 AMB	0.5 AMB	0.25 AMB	0.12 AMB	0.06 AMB	0.03 AMB	0.015 AMB	0.008 AMB	0.004 AMB	0.25µg/ml FC

Figure 1 Arrangement of serial dilutions in microplates of checkerboard test.

SC= sterility control

GC= growth control

FC= 5-fluorocytosine

AMB= Amphotericin B

CAPÍTULO IV

(Artigo em processo de finalização)

O capítulo IV aborda indução à resistência ao FLZ em isolados de *C. neoformans* VNI, *C. gattii* VGI e VGII para padronizar os fluorocromos: *acetoximetil - calceína* (calceína-AM), *acetoximetil - 2', 7' -bis-(2-carboxietil)-5-(e -6)- carboxifl uoresceína* (BCECF-AM), *rodamina 123* (Rh123) e *iodeto de 3, 3' – dipentiloxacarbocianina* (DiOC5) na citometria de fluxo para verificar a expressão de bombas de efluxo. Consequentemente, comparar a expressão de bombas de efluxo dos diferentes tipos moleculares. Estes resultados fazem parte dos objetivos específicos 5 e 6 a seguir:

5- Induzir a resistência *in vitro* para fluconazol em isolados *C. neoformans* VNI e *C. gattii* VGI e VGII para padronizar os fluorocromos: *acetoximetil - calceína* (calceína-AM), *acetoximetil - 2', 7' -bis-(2-carboxietil)-5-(e -6)- carboxifl uoresceína* (BCECF-AM), *rodamina 123* (Rh123) e *iodeto de 3, 3' –dipentiloxacarbocianina* (DiOC5) na citometria de fluxo para verificar a expressão de bombas de efluxo.

6- Comparar a expressão de bombas de efluxo dos diferentes tipos moleculares antes e após indução *in vitro* de resistência ao FLZ.

Verificação da expressão de bombas de efluxo pela citometria de fluxo de *C. neoformans* VNI, *C. gatti* VGI e VGII frente a fluconazol

Verificação da expressão de bombas de efluxo pela citometria de fluxo de *C. neoformans* VNI, *C. gatti* VGI e VGII frente a fluconazol

Estudos com *Saccharomyces cerevisiae* e fungos oportunistas, tais como, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, e *Aspergillus fumigatus*; permitem afirmar que a resistência e diminuição da eficácia de drogas antifúngicas está relacionada a resistência à droga pleiotrópico (PDR) e bombas de efluxo da cassete de ligação ao ATP (ABC) superfamília transportador (1). *C. neoformans*, *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus* podem desenvolver resistência a diferentes tipos de drogas antifúngicas utilizadas (2). Poucos são os estudos para compreensão do mecanismo de resistência de fungos patogênicos oportunistas. Prudencio et al (2000) utilizou a citometria de fluxo e diversos fluorocromos para verificação atividade de bombas de efluxo em diferentes leveduras, no entanto, não incluiu *C. neoformans* no seu estudo (3).

O objetivo deste capítulo é comparar a expressão de bombas de efluxo, pela citometria de fluxo de *C. neoformans* VNI, *C. gattii* VGI e VGII resistentes a fluconazol (FLZ), obtidos por indução e seus respectivos não induzidos.

METODOLOGIA

Neste estudo foi desenvolvido protocolo usando citometria de fluxo para verificar presença de bombas de efluxo ativas para fluconazol.

Foi padronizada em estudo piloto com isolado *C. neoformans* ATCC 32045 (INCQS 40044) (3). A aquisição e análise foram realizados em Beckman Coulter XL-MC. Aproximadamente, 10.000 células por amostra foram analisadas com filtro FL1 LOG 525 nm *Band Pass*, (cor verde) Este trabalho foi realizado seguindo método realizado por Prudêncio et al. (2000) (3) o qual estudou seis diferentes espécies de leveduras exceto *Cryptococcus* spp.

Isolados em estudo

Neste estudo foram incluídos isolados induzidos à resistência ao fluconazol. Assim foram analisados 10 isolados induzidos e 19 não induzidos de *C. neoformans* VNI; 10

induzidos e 19 não induzidos de *C. gattii* VGII; 13 isolados induzidos e 16 não induzidos de *C. gattii* VGI.

Indução de resistência *in vitro*

Para obter menor concentração da droga capaz de inibir 50% do crescimento do fungo (CIM50) frente a fluconazol (FLZ) foi realizado teste de suscetibilidade antifúngica seguindo método de microdiluição em caldo CLSI M27-A3.

Imediatamente a determinação da CIM50 foi realizado teste para determinar a concentração mínima letal (CML). Este método consiste em inoculação de 10 μ L do poço visualmente transparente em placas de Petri contendo Sabouraud Agar (SC). Após incubação a 35°C durante 72h foi realizada a contagem de colônias, onde \leq a 5 colônias representa \geq 80% de morte celular.

Uma vez determinada a CIM50 pelo método CLSI, e o teste para verificação da CML; as colônias que apresentarem crescimento foram, então, subcultivadas em meio YPD ágar (1% de extrato de levedura [Oxoid], 2% peptona (Difco), 2% de glicose e 1,5% de ágar [Difco]; pH5,5) contendo FLZ o qual foi aumentado gradativamente de 4, 8, 16, 32 e 64 até 128 μ g/ml). As placas foram incubadas no mínimo 48 h em 35°C com cada concentração da droga.

Os isolados que apresentaram crescimento na placa contendo a maior concentração de FLZ (64 ou 128 μ g/ml) foram consideradas fluconazol-resistentes, e estas foram repicadas em SC Agar, livre de droga e incubadas por 48 h a 37°C. Para determinação da CIM pós-indução, todos os isolados foram submetidos a teste de suscetibilidade *in vitro* seguindo protocolo M27A-3 e E-Test. Além do mais, foi verificada a estabilidade da resistência adquirida, por passagens sucessivas em YPD Agar livre de droga.

Para efeito comparativo foram induzidos à resistência para FLZ 19 isolados de *C. neoformans* VNI, 19 isolados de *C. gattii* VGII e 16 isolados de *C. gattii* VGI. Uma vez atingida a resistência os isolados resistentes foram congelados em Nitrogênio líquido e ficaram aproximadamente dois anos até descongelamento para verificação das bombas de efluxo frente ao FLZ.

Preparação de fluconazol para acúmulo

Foram preparadas soluções-estoque de FLZ potência 100% (Sigma-Aldrich Inc., St Louis, USA) em dimetilsulfóxido-DMSO 99,70% (Vetec), e preservados em -70°C , por até um ano. As diluições de FLZ na concentração de 2,0 e 256,0 $\mu\text{g/mL}$ foram preparados em RPMI 1640 acrescido de glicose 2% e distribuídos 300 μL , em tubos com tampa específicos para leitura em citometro, estas preparações foram preservadas a -70°C por até seis meses, como recomendado pelo protocolo CLSI M27-A3.

Preparação do inóculo

O inóculo foi preparado a partir, de isolados com crescimento em Sabouraud Dextrose Agar livre de droga a 35°C por 48h, para tal foi preparada uma suspensão de aproximadamente 3×10^6 UFC/mL (1 MacFarland) em 3mL de tampão fosfato (PBS 1X), pH 7,0.

Acúmulo de fluconazol

Para induzir o acúmulo de fluconazol, nas células fúgicas, foi acrescentado 300 μL de inóculo para os tubos contendo 300 μmL nas concentrações de 2 $\mu\text{g/mL}$ e 128 $\mu\text{g/mL}$ de FLZ e foram incubados por 1h a 200rpm em 35°C . Após acúmulo da droga, foi acrescentado (fluorocromo). Exemplo: Dioc₅ concentração final de 1 μM e foi incubação a temperatura ambiente durante 10 minutos (sem agitação).

Protocolo para escolha do fluorocromo (Estudo piloto)

Para realização do teste inicial foi utilizado, *C. neoformans* ATCC 32045 (INCQS 40044). No estudo piloto foram testados os seguintes fluorocromos: **a.** 10 μM de calceina-AM incubado 30 minutos a temperatura ambiente; **b.** 5 μM de BCECF-AM, preparado em DMSO, incubado a 30°C por 30 minutos; **c.** 500mM de Rh123, preparado em etanol, incubado 10 minutos a temperatura ambiente; **d.** 1 μM de DiOC₅, preparado em etanol, incubado por 10 minutos a 30°C , sem agitação. Este último fluorocromo (Dioc₅ dependente de potencial de membrana e organelas) apresentou resultados reprodutíveis junto com CCCP, concentração final de 9 μM incubação com agitação durante 1 minuto a 35°C , usando como controle do bloqueio da atividade de bomba de efluxo (ABE). Para tal foram realizados os seguintes testes seguindo Prudêncio et al. (2000):

- tubo 1, controle sem marcação (autofluorescência)
- tubo 2, Controle Sem Droga + Dioc5 (CSD);
- tubo 3, Controle sem droga + Dioc5 + CCCP (CTCCCP);;
- tubo 5, Controle tratado com 1µg FLC+ Dioc5;
- tubo 5, Controle tratado com 1 µg FLC+ Dioc5 + CCCP
- tubo 6, Controle tratado com 64 µg FCL+ Dioc5;
- tubo 7, Controle tratado com 64 µg FCL+ Dioc5 + CCCP.

Após acúmulo e coloração com fluorocromo, os tubos contendo Dioc5 foram centrifugados a 6000rpm durante 5 minutos e o precipitado foi suspenso em PBS1X para leitura. Aproximadamente, 10.000 UFC foram analisadas por leitura citométrica.

Interpretação de resultados

Para avaliar a diferença entre o controle sem tratamento (CSD) (sem exposição ao FLZ) e o controle tratado com CCCP (CTCCCP) (condições inibitórias de protonóforos, e proteínas PDR); foi realizada a divisão (razão) entre CTCCCP e CSD da intensidade de fluorescência em 525 nm Band Pass. A razão destes valores >1,0 indica acúmulo de fluorocromo como consequência da inibição do transportador nessas condições.

A mesma razão da intensidade de fluorescência do isolado tratado (com acúmulo de FLZ) (CT) e seu respectivo não tratado (CSD); (CT/CSD) foi utilizada nos resultados dos isolados em estudo. Sendo assim, valores < 1,0 indicam presença de atividade de bomba de efluxo.

Estatística

Para análise da distribuição da normalidade dos dados foi usado “Kolmogorov-Smirnov Test”. Para comparar as Médias de Intensidade de Fluorescência (MIF) dentro de cada grupo, foi utilizado Wilcoxon, sendo assim, p-valores <0,05 nos testes estatísticos indicam diferenças estatisticamente significativas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do estudo piloto, para verificação atividade de bombas de efluxo, utilizando *Cryptococcus neoformans* ATCC 32045 (INCQS 40044) com o uso de Dioc5 e CCCP estão representados na Tabela 1.

A comparação da expressão de bombas de efluxo obtidos pela citometria de fluxo com uso de fluorocromo Dioc5 para isolados de *C. neoformans* VNI, *C. gattii* VGI e VGII induzidos e não induzidos frente a fluconazol estão demonstrados na Tabela 2.

Análise da Média de intensidade de fluorescência (MIF) dos tipos moleculares de *C. neoformans* VNI, *C. gattii* VGI e VGII induzidos (Resistentes) e não induzidos estão representados na Tabela 3.

Os histogramas sobrepostos da intensidade de fluorescência do acúmulo de Fluconazol + iodeto de 3, 3' -dipentiloxacarbocianina (Dioc5) e bloqueio por *Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone* (CCCP) estão demonstrados na Figura 1.

Na análise da distribuição da normalidade dos dados obtidos usando “Kolmogorov-Smirnov” para observar se a diferença entre a razão das médias de intensidade de fluorescência (MdX) entre as espécies (n total= 56) foi obtido $p=1,5$. Sendo assim, foi utilizado Wilcoxon para comparar as MdX dentro de cada grupo. P-valores $<0,05$ nos testes estatísticos indicam diferenças significantes como demonstrado na tabela 3.

A comparação da Mdx do isolado com acúmulo de $1\mu\text{g/mL}$ FLZ (MG = 0,82) com seu respectivo não tratado (MG = 132,81) do tipo molecular VGI, não induzido à resistência, foi estatisticamente significativo ao contratrio dos tipos moleculares VNI e VGII tanto com $1\mu\text{g/mL}$ FLZ quanto com $64\mu\text{g/mL}$ FLZ (tabela 3). Porém, os isolados VGI (MG $1\mu\text{g/mL}$ e $64\mu\text{g/mL}$ = 0,61 e 0,84 respectivamente) e VGII (MG $1\mu\text{g/mL}$ e $64\mu\text{g/mL}$ = 0,90 e 0,93 respectivamente) resistentes por indução foram estatisticamente significativos com acúmulo das duas concentrações de FLZ, ao contrário do tipo molecular VNI (Tabela 3).

Indução da resistência *in vitro* para fluconazol:

Os resultados pré e pós-indução *in vitro* de *C. gattii* e CIMs obtidas antes da indução apresentam CIMs muito variáveis entre CLSI e E-Test. O intervalo das CIMs, antes da indução, dentro de CLSI variou de 0,12 a $8\mu\text{g/mL}$; já para E-Test variou de 4 a $256\mu\text{g/mL}$. (tabela 4). As MICs obtidas pelo método E-Test apresentam-se mais elevadas em relação às MICs obtidas pelo método CLSI; esta diferença pode estar relacionada à quantidade final de inóculo usado nos testes, CLSI M27-A3 5×10^3 a $2,5 \times 10^3$ ufc/mL contra E-TEST 5×10^6 a $2,5 \times 10^6$ ufc/mL.

O tipo molecular VGII de *C. gattii* foi induzido em menor tempo, apresentando crescimento entre 3 a 5 dias com aumento progressivo das concentrações de FLZ, atingindo MICs >64 µg/mL;

Em geral *C. neoformans* VNI apresentou maior dificuldade na adaptação ao meio com com aumento gradativo das concentrações de FLZ, quando comparado ao tipo molecular VGII. Além do mais, após várias tentativas (2x ou 3x) de indução de resistência, algumas colônias do tipo VNI obtidas apresentaram-se muito pequenas (em 48 h) no método E-Test na leitura de confirmação da MIC. Para o tipo molecular VGI foi necessário até 10 dias de incubação com duas ou três passagens, com cada concentração em meio contendo FLZ, principalmente em concentrações elevadas, 32 a 256 µg/mL.

Avaliação da perda da resistência:

Para avaliação da perda de resistência foram realizadas de 14 passagens sucessivas em YPDA livre de droga, incubadas a 35°C por 48h e foi observado que 9/16 (56%) dos isolados de *C. gattii* VGII; 3/10 (30%) VGI e 5/13 (38%) de *C. neoformans* VNI não perderam a resistência adquirida em 14 passagens (tabelas 4, 5 e 6), no entanto em estudo realizado por Yamazumi et al. (2003) foi observado que isolados heteroresistentes de *C. neoformans* de origem clínica demonstraram ser reversíveis em oito passagens sucessivas em meio livre de Fluconazol, com exceção de um isolado (0,97%) dentre 107, o qual manteve-se resistente em 13 passagens. Apesar do número pequeno de *C. neoformans* analisado no presente estudo observa-se a heterogeneidade enquanto a perda da resistência em relação aos resultados obtidos por Yamazumi et al. (2003) (4).

Segundo Varma & Kwon-Chung (2010)(5) todos os isolados de *C. gattii* expressaram heteroresistência ao FLZ variando de 4 a 32µg/mL, no presente estudo usando o método E-Test, para verificar a resistência pós-indução ao FLZ, foi verificado que de 13 VGI variaram de 8 a >256 µg/mL e de 18 VNI a variação observada foi de 1 a >256 µg/mL. No entanto os 19 isolados VGII apresentaram 64 e >256 µg/mL demonstrando elevada capacidade de adquirir resistência ao FLZ. Observando-se também a facilidade do crescimento durante o processo de indução em relação aos tipos moleculares VGI e VNI (tabelas 4, 5 e 6).

No presente estudo os testes de suscetibilidade antifúngica e de indução dos tipos moleculares VNI, VGI e VGII foram incubados a 35°C por 72 hs, durante a indução, optou-se por essa temperatura já que os três tipos moleculares apresentam crescimento ótimo nos testes

de microdiluição em caldo realizado a 35°C. No entanto, Yamazumi et al. (2003) e Varma & Kwon-Chung (2010) (4) (5), afirmam não ter resultados no processo de indução, em temperatura maior a 30°C para *C. neoformans*.

Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que a expressão de heteroresistência ao FLZ varia dentro dos tipos moleculares e está diretamente relacionada com a exposição ao FLZ. Porém, são necessários futuros estudo com número amostral considerável para ver se a diferença é significativa principalmente entre os tipos moleculares VNI e VGI.

A compreensão da atividade de bombas de efluxo e interferência destas na resistência a antifúngicos podem permitir estratégias para superar a resistência a multi-drogas em fungos de interesse médico e melhorar a eficácia destas drogas (1). No presente estudo o flourocromo Dioc5 e bloqueador de protonoforos CCCP permitiram verificar que a maioria dos isolados, 65% (isolados não induzidos) e 90% (isolados induzidos) do tipo molecular VGII expulsam o fluorocromo, com certa vantagem em relação aos tipos moleculares VGI e VNI como demonstrado na tabela 2.

Tabela 1 Resultado do estudo piloto utilizando de *Cryptococcus neoformans* ATCC 32045 (INCQS 40044) com o uso de Dioc5 e CCCP.

MdX		MIF	Razão (CT/CSD)
1	Controle sem marcação (autofluorescência)	6,12.	
2	Controle não tratado+ Dioc ₅ ;	210,0	
3	Controle não tratado+ Dioc ₅ + CCCP;	214,4	214,4/210,0 = 1,0
4	Controle tratado com 1µg FLZ+ Dioc ₅ ;	187,4	187,4/210,0 = 0,89
5	Controle tratado com 1µg FLZ+ Dioc ₅ + CCCP	252,7	252,7/210,0 = 1,2
6	Controle tratado com 64µg FLZ+ Dioc ₅ ;	185,0	185,0/210,0 = 0,88
7	Controle tratado com 64µg FLZ+ Dioc ₅ + CCCP.	270,8	270,8/210,0 = 1,2

ABE = Atividade de bombas de efluxo

MIF = Média de intensidade de fluorescência

CT/CSD<1=ABE

CT/CSD>1= Ausência de ABE

CT = Controle tratado

CSD = Controle sem droga

FLZ = Fluconazol

MIF = Média da intensidade de fluorescência em FL1 (525 nm *Band Pass*)

Dioc5 = *iodeto de 3, 3' -dipentiloxacarbocianina* (Dioc5)

Tabela 2 Comparação da expressão de bombas de efluxo obtidos pela citometria de fluxo com uso de fluorocromo DiOC5 para isolados de *C. neoformans* VNI, *C. gattii* VGI e *C. gattii* VGII induzidos e não induzidos frente a fluconazol.

[] fluconazol	<i>C. neoformans</i> VNI				<i>C. gattii</i> VGI				<i>C. gattii</i> VGII			
	1µg/mL		64µg/mL		1µg/MI		64µg/mL		1µg/mL		64µg/mL	
Não induzido	13/20	65%	9/20	45%	2/15	13%	5/15	33%	12/20	60%	13/20	65%
Induzido	3/10	30%	4/10	40%	11/13	84%	11/13	84%	9/10	90%	8/10	80%

Tabela 3. Análise da Média de intensidade de fluorescência (MIF) dos tipos moleculares de *C. neoformans* VNI, *C. gattii* VGI e VGII induzidos (Resistentes) e não induzidos.

Tipo molecular (n°)	pv * MIF tubo CT 1µg/mL FLZ - MIF tubo CSD (Sem FLC)	pv * MIF tubo CT 64µg/mLFLZ – MIF tubo CSD (Sem FLC)
VNI (20)	0,204	0,765
VGII (19)	0,147	0,107
VGI (13)	0,046	0,075
VNI Resist (10)	0,333	0,114
VGII Resist (10)	0,037	0,013
VGI Resist (13)	0,005	0,005

* Wilcoxon Signed Ranks Test

CT = Controle tratado

CSD = Controle sem droga

FLZ = Fluconazol

MIF = Média da intensidade de fluorescência em FL1 (525 nm *Band Pass*)

Dioc5 = *iodeto de 3, 3' -dipentiloxacarboianina* (Dioc5)

Tabela 4. Resultados expressos em valores de CIM ($\mu\text{g} / \text{mL}$) dos pré e pós-indução *in vitro* de 19 isolados de *C. gattii* VGII.

ISOLADO	CLSI CIM 50	CML	E-Test 48H pré- indução	CLSI pós- indução	E-Test, Durante e pós- indução	Crescimento em 72h Durante a indução	E-Test pós 14 passagens em YPDA
LMM1425	8	64	>256	32	>256	Ok	*
LMM1429	2	64	>256	32	>256	Ok	>256
LMM1435	4	16	32	128	>256	lento	>256
LMM1437	2	32	24	*	>256	Ok	1
LMM1438	4	64	*	4	>256	Ok	>256
LMM1435	1	32	8	16	>256	Ok	>256
LMM1444	4	64	4	64	>256	Ok	>256
LMM1449	0,25	32	24	64	>256	lento	>256
LMM1451	4	64	3	64	>256	Ok	>256
LMM1453	2	>64	16	64	>256	Ok	*
LMM1454	2	8	8	16	>256	Ok	>256
LMM1459	0,25	32	12	16	>256	Ok	*
LMM1460	1	64	12	32	64	lento	4
LMM1463	0,12	32	16	64	>256	Ok	24
LMM1480	0,12	>64	6	32	>256	Ok	32
LMM1493	2	>64	8	64	>256	Ok	12
LMM17	0,12	64	24	32	>256	Ok	24
LMM901	1	64	24	32	>256	Ok	8
LMM994	4	64	16	32	>256	Ok	>256

LMM = Laboratório de Micologia Médica

CML = Concentração mínima letal.

CLSI = Teste de diluição em caldo

CIM = Concentração inibitória mínima

* teste não realizado.

Tabela 5. Resultados expressos em valores da CIM ($\mu\text{g/mL}$) obtidos pré e pós-indução *in vitro* de (16) *C. gattii* VGI. * teste não realizado.

ISOLADO	CLSI CIM		E-Test 48H pré-ind	CLSI pós-indução	E-Test, pós-indução	Crescimento em 72h Durante a indução	E-Test pós 14 passagens em YPDA
	50	CML					
LMM201	1	64	*	64	16	3x lento	*
LMM202	4	64	8	32	16	3x lento	*n/ cresc
LMM244	2	64	8	16	16	2xlento	*
LMM253	2	64	6	1	8	lento	4
LMM272	4	8	6	64	64	lento	32
LMM326	2	8	4	32	64	Ok	3
LMM330	1	1	0,7	8	64	2x lento	*
LMM347	4	64	8	*	*	Ok	12
LMM353	1	16	12	8	64	3x	*
LMM359	4	64	8	64	64	Ok	6
LMM362	2	>64	8	8	*	3x	*
LMM378	1	1	1,5	*	*	Ok	1,5
LMM384	1	8	1	64	>256	mucoide	>256
LMM1430	2	*	8	32	>256	3x lento	*
LMM1436	2	*	6	64	64	Ok	12
LILI10	0,5	8	24	64	64	Ok	24

2x= segunda tentativa

3x= terceira tentativa

LMM = Laboratório de Micologia Médica

CML = Concentração mínima letal.

CLSI = Teste de diluição em caldo

CIM = Concentração inibitória mínima

YPDA = yeast peptone dextrose adenine

* teste não realizado.

Tabela 6 Resultados expressos em valores da CIM ($\mu\text{g} / \text{mL}$) obtidos pré e pós-indução *in vitro* de (19) *C. neoformans* VNI.

ISOLADO	CLSI		E-Test 48H pré-ind	CLSI pós- indução em 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$	E-Test, Durante e pós- indução	Crescimento	
	CIM 50	CML				o em 72h Durante indução 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$	E-Test pós 14 passagens em YPDA
LMM1426	4	64	16	32	>256	ok	>256
LMM1494	0,5	64	0,5	2X 2	1	2x lento	2
LMM1433	2	8	12	32	64	3x lento	*
LMM1434	0,5	<8	4	32	64	2x lento	12
LMM1443	0,25	32	12	64	>256	ok	32
LMM1446	0,5	16	12	64	64	3x lento	*
LMM1448	0,12	16	*	16	>256	ok	2
LMM1450	0,25	<8	8	32	64	3x lento	*
LMM1452	2	64	12	64	2x >256	ok	8
LMM1455	2	32	*	16	64	lento	16
LMM1457	0,25	16	12	32	>256	Ok	24
LMM1468	1	32	6	8	32	3x lento	*
LMM1473	1	>64	6	*	*	3x lento	*
LMM1475	0,25	16	4	16	16	2x lento	8
LMM1495	0,5	64	6	32	8	2x lento	32
LMM1496	4	>64	6	32	64	3x lento	*
LMM1497	0,5	>64	4	32	64	2x lento	6
LMM1498	2	32	4	64	64	2x lento	48
LMM1499	0,12	32	12	32	>256	ok	4

LMM = Laboratório de Micologia Médica

CML = Concentração mínima letal.

CLSI = Teste de diluição em caldo

CIM = Concentração inibitória mínima

YPDA = yeast peptone dextrose adenine

* teste não realizado.

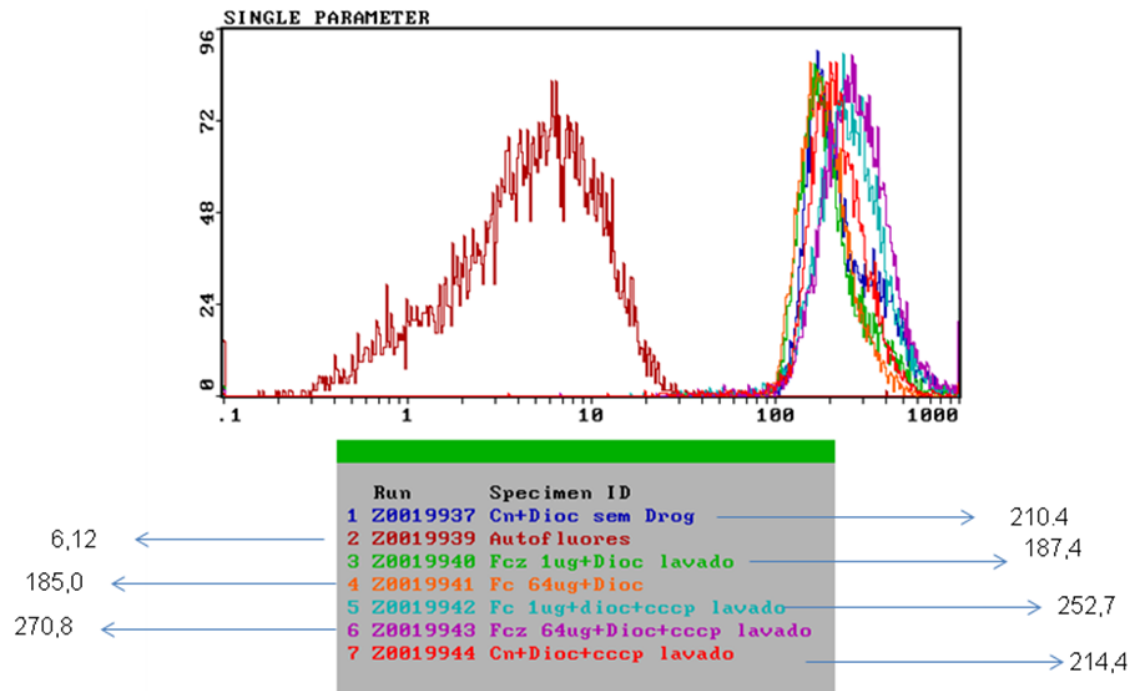


Figura1. Histogramas da intensidade de fluorescência (indicada pelas setas) (filtro FL1 LOG 525 nm *Band Pass*, - cor verde-) para verificar acúmulo de Fluconazol + e *iodeto de 3, 3' - dipentiloxacarbocianina* (Dioc5) e bloqueio por Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (cccp).

Referências Bibliográficas

1. Wang Q, Cui Z-F. [Pleiotropic drug resistance ABC transporters in fungi]. *Yi Chuan Hered Zhongguo Yi Chuan Xue Hui Bian Ji*. 2011 Oct;33(10):1048–56.
2. Morschhäuser J. Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi. *Fungal Genet Biol FG B*. 2010 Feb;47(2):94–106.
3. Prudêncio C, Sansonetty F, Sousa MJ, Côrte-Real M, Leão C. Rapid detection of efflux pumps and their relation with drug resistance in yeast cells. *Cytometry*. 2000 Jan 1;39(1):26–35.
4. Yamazumi T, Pfaller MA, Messer SA, Houston AK, Boyken L, Hollis RJ, et al. Characterization of heteroresistance to fluconazole among clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol*. 2003 Jan;41(1):267–72.
5. Varma A, Kwon-Chung KJ. Heteroresistance of *Cryptococcus gattii* to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Jun;54(6):2303–11.

5 METODOLOGIA (Geral)

5.1 Microrganismos

Foram selecionados para análise 19 isolados de *C. neoformans* do tipo molecular VNI, 16 de *C. gattii* VGI e 19 VGII, totalizando 54 cepas de origem clínica. Foram incluídas no estudo duas cepas controle *Candida parapsilopsis* INCQS 40038 (ATCC 22019); *Candida krusei* INCQS 40147 (ATCC 6258) e cepas *C. neoformans* INCQS 40044 (ATCC 32045) e *C. gattii* INCQS 40141 (ATCC 56990). Todos os isolados encontram-se preservados a -70°C em solução glicerol 15% (Sigma-Aldrich Inc., St Louis, USA) na Coleção de Culturas de Fungos Patogênicos do IPEC/Fiocruz.

5.2 Tipagem molecular

Para confirmar o tipo molecular dos isolados de *C. neoformans* VNI e *C. gattii* VGI e VGII, foi realizado a técnica de *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) utilizando primer do gene *URA5* (Orotidina pirofosforilase monofosfato) e enzimas de restrição *HhaI* e *Sau96I*. Foram utilizadas como cepas-padrão WM 148 (sorotipo A, VNI), WM 626 (sorotipo A, VNII), WM 628 (sorotipo AD, VNIII), WM 629 (sorotipo D, VNIV), WM 179 (sorotipo B, VIG), WM 178 (sorotipo B, VGII), WM 161 (sorotipo B, VGIII), e WM 779 (sorotipo C, VGIV) (Meyer et al. 1999).

5.3 Análises de Suscetibilidade antifúngica *in vitro*, método de microdiluição (CLSI M27A-3)

A determinação do perfil da suscetibilidade de *C. neoformans* e *C. gattii* para obtenção da concentração inibitória mínima (CIM) frente ao FLZ, ITZ, 5FC e AMB isoladamente segue o método padronizado CLSI M27- A3 protocolo e suplemento (Clinical and Laboratory Standards Institut (CLSI), 2008)(CLSI document M27-S3, (2008)).

5.3.1 Preparo do inóculo

Foram reativadas cepas preservadas em glicerol 15% a -70°C. Após a recuperação, os isolados em estudo foram estocados em Skim-milk -20°C para utilização durante o estudo. A reativação foi realizada seguindo procedimento operacional padrão, documento interno, do laboratório através de inoculação em placas de Petri contendo meio Agar semente de Níger

(*Guizotia abyssinica*) (ASN); incubadas a 25°C por 48 horas; transferidas para tubos contendo Sabouraud 2% Glucose Agar inclinado (SC), livre de droga, (Difco™ Laboratories, Mariland, EUA). Inicialmente foi verificada a expressão de melanina (presença enzima fenol-oxidase) usando Agar semente de Níger (ASN) e confirmação das espécies de *C. gattii* e *C. neoformans* submetendo-as ao teste bioquímico Canavanina Glicina e azul de Bromotimol (CGB) além do teste bioquímico automatizado Vitek YBC (bioMérieux, Inc., Durham, USA) seguindo instruções do fabricante.

O preparo do inóculo foi realizado seguindo protocolo CLSI M27-A3. Assim, foram suspensas de duas a cinco colônias de diâmetro de aproximadamente 1mm (com crescimento 48 horas a 35°C) em 5mL de solução salina estéril (0,85% NaCl). Essa suspensão foi agitada em vórtex por 15 segundos e a densidade celular ajustada em escala padrão McFarland 0,5 usando instrumento Bio-Mérieux Densichek. Foram obtidas suspensões de 1×10^6 a 5×10^6 ufc/mL. A suspensão foi diluída em RPMI1640 até a concentração de $5,0 \times 10^2 - 2,5 \times 10^3$ ufc/mL para inoculação em micro placas de fundo em U com drogas previamente preparadas.

5.3.2 Drogas Antifúngicas

Para a avaliação da suscetibilidade, foram utilizadas drogas sob a forma de referência em pó tais como: derivados azólicos, FLZ potência 100% (Sigma-Aldrich Inc., St Louis, USA), ITZ potência 98% (Sigma-Aldrich Inc., St Louis, USA), derivado poliênico, AMB potência 80% (Sigma-Aldrich Inc., St Louis, USA) e uma pirimidina fluorada 5FC potência 100% (Sigma-Aldrich Inc., St Louis, USA).

Foram preparadas soluções-estoque de AMB, FLZ e ITZ em dimetilsulfóxido 99,70% (DMSO) (Vetec) (Sigma-Aldrich Inc., St Louis, USA), e 5FC em água destilada estéril, estas soluções foram filtradas com membrana 0,22 µm e estocadas a -70°C por até 6 meses. A AMB foi protegida da luz devido a fotolabilidade.

5.3.3 Preparo de diluições seriadas das drogas

As diluições das drogas foram preparadas com meio RPMI-1640 em pó com L-glutamina sem bicarbonato (Gibco™, New York, EUA), tamponado com MOPS – Buffer ácido [3-morlino] propanosulfônico P. A. (Vetec Química Fina LTDA, Duque de Caxias, Brasil), acrescido de dextrose (Difco™ Laboratories, Mariland, EUA) concentração final 2% e 0,2%. O pH foi ajustado a 7,0 e esterilizado por filtração, com membrana 0,22 µm. Em

seguida foram distribuídos 100µL em cada poço da microplaca, com exceção da primeira e última coluna reservadas para controle de esterilidade (CE) e o controle de crescimento (CC) respectivamente. As microdiluições foram preparadas nos seguintes intervalos de concentração final: 0,015 a 8µg/mL para AMB e ITZ, de 0,12 a 64µg/mL para 5FC e FLZ e estocados a -70°C por até seis meses. Esses intervalos abrangem as concentrações dos pontos de corte das cepas-controle *C. parapsilopsis* e *C. krusei*, já que ainda não foram determinados os pontos de corte específicos para o gênero *Cryptococcus*. Para preparar e realizar os testes foram usadas microplacas com tampa estéreis descartáveis de fundo em U e fundo reto.

5.3.4 Suscetibilidade antifúngica e melanina

O preparo do inóculo para determinar a CIM dos isolados expressando melanina, foi realizado como descrito anteriormente, porém o crescimento do isolado foi em ASN e a última suspensão foi diluída em RPMI1640 ($5,0 \times 10^2 - 2,5 \times 10^3$ ufc/mL) com acréscimo de L-3,4-Dihydroxyphenyl-alanine (L-DOPA) concentração final 2mM (Garcia-Rivera et al. 2005) (Van Duin D. et al., 2002). Para estes testes foram utilizados micro placas com fundo em U com drogas previamente preparadas.

5.3.5 Interpretação dos Resultados (CLSI M27A-3)

Os resultados da microdiluição foram analisados por leitura visual realizada com auxílio de suporte para microplaca e espelho inclinado, após incubação de 72 horas a 35°C em microplacas com fundo em U, onde o crescimento fúngico foi avaliado em cada um dos poços com uma escala de 0 a 4. O valor 4 foi atribuído para aquele poço cujo crescimento é igual ao crescimento controle (CC), isto é, 0% de inibição, 3 para 25% de inibição, 2 para 50% de inibição (CIM2), 1 para 75% de inibição e, 0 ausência de crescimento fúngico (CIM0). Assim, a como a CIM foi a menor concentração do antifúngico capaz de inibir 50% (CIM2) do crescimento, exceto AMB (fungicida), que terá a CIM com 100% de inibição de crescimento (CIM0). Em cada microplaca foram analisadas as cepas-controle, além de controle de esterilidade do meio RPMI 1640 e controle do crescimento do isolado, sem exposição ao antifúngico, como determinado pelo método CLSI M27-A3.

5.3.6 Combinação de drogas (CLSI M27A-3) e método tabuleiro de xadrez

A preparação de microdiluições seriadas das drogas para combinação de AMB com 5FC e AMB com voriconazol (VRZ) na concentração final de 0,004 a 0,5 µg/mL foram realizadas seguindo protocolo CLSI M27A-3. Em uma primeira etapa foi realizado o teste com glicose 0,2%, com acréscimo de L-Dopa e sem acréscimo deste; e em segunda etapa foi realizado com concentração final de glicose 2%, sem acréscimo de L-Dopa. Este procedimento é semelhante ao anterior com uma única diferença, neste caso são distribuídos 50µL de cada droga a combinar, que resultará num volume de 100µL, em cada poço da microplaca, com exceção da primeira coluna reservada para CE e CC e última coluna reservada para teste de suscetibilidade da droga B (5FC). A última linha é reservada para droga A (AMB) como demonstrado no esquema a seguir. (Carl L. Pierson 1994).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CE	8 5FC 2 AMB	8 5FC 1 AMB	8 5FC 0,5 AMB	8 5FC 0,25 AMB	8 5FC 0,12 AMB	8 5FC 0,06 AMB	8 5FC 0,03 AMB	8 5FC 0,015 AMB	8 5FC 0,008 AMB	8 5FC 0,004 AMB	32 µg/ml 5FC
B	CE	4 5FC 2 AMB	4 5FC 1 AMB	4 5FC 0,5 AMB	4 5FC 0,25 AMB	4 5FC 0,12 AMB	4 5FC 0,06 AMB	4 5FC 0,03 AMB	4 5FC 0,015 AMB	4 5FC 0,008 AMB	4 5FC 0,004 AMB	16 µg/ml 5FC
C	CE	2 5FC 2 AMB	2 5FC 1 AMB	2 5FC 0,5 AMB	2 5FC 0,25 AMB	2 5FC 0,12 AMB	2 5FC 0,06 AMB	2 5FC 0,03 AMB	2 5FC 0,015 AMB	2 5FC 0,008 AMB	2 5FC 0,004 AMB	8 µg/ml 5FC
D	CE	1 5FC 2 AMB	1 5FC 1 AMB	1 5FC 0,5 AMB	1 5FC 0,25 AMB	1 5FC 0,12 AMB	1 5FC 0,06 AMB	1 5FC 0,03 AMB	1 5FC 0,015 AMB	1 5FC 0,008 AMB	1 5FC 0,004 AMB	4 µg/ml 5FC
E	CE	0,5 5FC 2 AMB	0,5 5FC 1 AMB	0,5 5FC 0,5 AMB	0,5 5FC 0,25 AMB	0,5 5FC 0,12 AMB	0,5 5FC 0,06 AMB	0,5 5FC 0,03 AMB	0,5 5FC 0,015 AMB	0,5 5FC 0,008 AMB	0,05 5FC 0,004 AMB	2 µg/ml 5FC
F	CE	0,25 5FC 2 AMB	0,25 5FC 1 AMB	0,25 5FC 0,5 AMB	0,25 5FC 0,25 AMB	0,25 5FC 0,12 AMB	0,25 5FC 0,06 AMB	0,25 5FC 0,03 AMB	0,25 5FC 0,015 AMB	0,25 5FC 0,008 AMB	0,25 5FC 0,004 AMB	1 µg/ml 5FC
G	CE	0,012 5FC 2 AMB	0,012 5FC 1 AMB	0,012 5FC 0,5 AMB	0,012 5FC 0,25 AMB	0,012 5FC 0,12 AMB	0,012 5FC 0,06 AMB	0,012 5FC 0,03 AMB	0,012 5FC 0,0015 AMB	0,12 5FC 0,008 AMB	0,12 5FC 0,004 AMB	0,5 µg/ml 5FC
H	CC	2 µg/ml ABM	1 µg/ml AMB	0,5 µg/ml AMB	0,25 µg/ml AMB	0,12 µg/ml AMB	0,06 µg/ml AMB	0,03 µg/ml AMB	0,015 µg/ml AMB	0,008 µg/ml AMB	0,004 µg/ml AMB	0,25 µg/ml 5FC

Esquema da distribuição em placas de microdiluição das drogas combinadas AMB e 5FC *in vitro*, pelo teste de tabuleiro de xadrez.

5.3.7 Preparação do inóculo.

O inóculo foi preparado como recomendado pelo CLSI M27-A3, a partir de isolados com crescimento em SC livre de droga a 35°C por 48h. Para o teste realizado na presença de L-DOPA preparou-se o inóculo com concentração final de 2mM de L-DOPA (Garcia-Rivera et al. 2005) preparado e filtrado no momento da realização do teste. Os testes realizados com L-Dopa foram protegidos da luz a partir do momento do preparo e durante a incubação a 35°C, por 72 horas.

5.3.8 Análise e Interpretação da Combinação de Drogas.

Para análise e interpretação da combinação de drogas é determinado o índice da concentração inibitória fracional (ICIF), do inglês *fractional inhibitory concentration index* (FCI), como usado classicamente na interação de drogas; A interação é definida como: sinérgica quando $ICIF \leq 0,5$; sinergismo parcial de 0,5 a 0,75; efeito aditivo de 0,76 a 1,0; indiferença >1 a 4,0 e antagonismo quando $>$ a 4,0 (D.-K. Joung et al. 2012) (Schwarz et al. 2006).

O ICIF é obtido pelo somatório das concentrações inibitórias fracionais (CIF) ou pela fórmula: $(A/CIMa = CIFA) + (B/CIMb = CIFB) = ICIF$. Onde: A= CIM da droga *a* em combinação; CIM *a* = CIM da droga *a* sozinha; B = CIM da droga *b* em combinação; CIM *b* = CIM da droga *b* sozinha.

5.4 Avaliação da Concentração Mínima Letal (CML)

A concentração mínima letal (CML), isto é, a menor concentração da droga que leva à morte do microrganismo (ação fungicida), foi realizada segundo Cantón et al. (2003), com modificações. Desse modo, para analisar a ação fungicida das combinações de drogas e dos testes com L-DOPA, foram inoculados 10 µL de cada poço visualmente transparente, sem observação de crescimento, (após determinação de CIM usando inóculo de $\sim 2,5 \times 10^3$ ufc/mL) em placas com meio Sabouraud Agar. A leitura foi realizada após incubação a 35°C por 72h, onde o crescimento de até cinco colônias significa morte de $\geq 80\%$ das células. Assim, foi considerado, CML na concentração com crescimento menor igual a cinco colônias.

5.5 Análises de suscetibilidade antifúngica *in vitro* pelo método por citometria de fluxo

Para determinar as CIMs de FLZ, ITZ e AMB os isolados foram adquiridas em citômetro Beckman Coulter XL-MCL e analisadas em Software System II (Beckman Coulter). As drogas foram preparadas de acordo com o protocolo CLSI M27-A3 (Clinical and Laboratory Standards Institut (CLSI).2008), reservadas em alíquotas de 300 µL em tubos com tampa estéreis (específicos para leitura em citômetro) a -70°C, por até seis meses, até a realização do teste. Os intervalos das concentrações finais foram de 0,015 a 2 µg/mL para AMB, 0,06 a 1,0 µg/mL ITZ, 0,25 a 32 µg/mL para 5FC e de 1,0 a 64 µg/mL para FLZ.

Para padronizar o teste de susceptibilidade *in vitro* na citometria de fluxo, foram testadas as cepas *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. neoformans*. Estas leveduras foram semeadas em placas de Petri contendo Sabouraud dextrose Agar (Difco™ Laboratories, Mariland, EUA) e incubadas a 35°C por 48 horas. Duas a cinco colônias de aproximadamente 1 mm de diâmetro foram suspensas em 5 mL de RPMI 1640 acrescido de dextrose 2%, essa suspensão foi ajustada para 0,5 McFarland, obtendo-se uma solução de $0,5 \times 10^6$ a $2,5 \times 10^6$ ufc/mL e 1,0 MacFarland para *Cryptococcus* obtendo uma solução de aproximadamente 300×10^6 ufc/mL, sendo que 300 µL do inóculo foram acrescentados aos 300 µL do intervalo da droga e encubados em 200 rpm durante 9 h para FLZ e 2 h para AMB

O fluorocromos Laranja de Acridina (LA) (Sigma-Aldrich Inc., St Louis, USA) foi usado na concentração final de 11 mg/L (Bernard Rudensky et al. 2005) (Morales, 2009) incubado, protegido da luz, por 30 minutos antes da leitura no citômetro. O fluorocromo 2-cloro-4-(2,3dihidro-3-metil-(benzo-1,3-thiazol-2-yl)-metilidene) 1phenylquinoliniumiodide FUN-1 foi usado na concentração de 0,5 µM, protegido da luz, por 30 minutos antes da leitura no citômetro (Pina-Vaz et al. 2005).

5.6 Análise de dados

A análise de dados foi realizada pelo software Excel 2003 e pelo software *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) versão 16.0. Estatística descritiva foi usada para calcular a CIM50 e CIM90. A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov ($p < 0,05$) e foi aplicado teste não-paramétrico de Mann-Whitney para a verificação de

diferenças das CIMs segundo as espécies *C. neoformans* VNI e *C. gattii* VGII. Os testes foram realizados separadamente para cada um dos métodos utilizados (citometria de fluxo e CLSI/M27A-2). Para comparar os diferentes métodos, foi utilizado o teste de Wilcoxon para dados pareados. Esse método considera o pareamento dos resultados para cada uma das amostras e para correlacionar as CIMs obtidas nos diferentes métodos foi usado análise não paramétrica de Spearman. P-valores $<0,05$ nos testes estatísticos indicaram diferenças estatisticamente significantes.

6 RESULTADOS GERAIS (não utilizados nos artigos)

Foi confirmado pela técnica PCR-RFLP o tipo molecular VNI de *Cryptococcus neoformans* VGI e VGII de *Cryptococcus gattii*. Nesta comparação foram usados isolados padrão de W. Meyer (WM): VGI WM179; VGII WM 178; VNI WM 148 e VNII WM 626.

Os resultados dos testes de suscetibilidade *in vitro* de *C. neoformans* VNI e *C. gattii* VGI e VGII frente a FLZ, ITZ, e AMB estão demonstrados na tabela 1, assim como, os intervalos das CIMs, CIM50, CIM90 e média geométrica (MG) do método de citometria de fluxo (CMF).

Tabela 1. Teste de suscetibilidade antifúngica de FLZ, ITZ e AMB de 54 isolados de *C. gattii* VGI, VGII e *C. neoformans* VNI pelo método CLSI M27- A3 e citometria de fluxo.

Tipo Molecular (n)	Parâmetros da CIM	CIM (µg/mL)					
		AMB		FLZ		ITZ	
		CLSI	CMF	CLSI	CMF	CLSI	CMF
VGII(19)	Intervalo	0,25-1	0,25-2	0,5-32	1-32	0,06-1	0,06-0,5
	CIM50	-	-	2	2	0,25	0,25
	CIM90	1	1	4	8	0,5	0,5
	MG	0,77	1,03	2,58	4	0,23	0,24
	CML	0,5-2,0		16,0- >64		2,0- >8,0	
VGI(16)	Intervalo	0,5-1	0,25-2	0,12-4	0,5-≤1	0,03-1	0,06-0,5
	CIM50	-	-	1	0,5	0,25	0,06
	CIM90	1	1	2	1	0,5	0,25
	MG	0,73	0,47	0,86	0,78	0,19	0,11
	CML	-	-	8,0->64	-	1,0-8	-
VNI (19)	Intervalo	0,25-1	0,5-1	0,25-4	0,5-16	0,01-0,5	0,06-0,5
	CIM50	-	-	1	2	0,12	0,25
	CIM90	1	1	2	8	0,5	0,5
	MG	0,72	0,89	1,15	2,58	0,17	0,34
	CML	-	-	4,0- >64	-	1,0- >8,0	-

AMB = Anfotericina B

CLSI M 27- A3= Testes de diluição em caldo

CMF = Citometria de Fluxo

FLZ = Fluconazol

ITZ = Itraconazol

MG = Média Geométrica

(-)não realizado

As CIMs de FLZ, ITZ e AMB correspondentes à percentagem de células danificadas de *C. gattii* VGI, VGII e *C. neoformans* VNI por CMF (obtidas em 9h de incubação) estão apresentados nas Tabelas 2, 3 e 4 respectivamente.

Tabela 2. Relação das CIMs ($\mu\text{g/mL}$) de FLZ, ITZ e AMB correspondente a percentagens de morte de *C. gattii* VGI obtidas pelo método de CMF.

$\mu\text{g/mL}$ (% MORTE) <i>Cryptococcus gattii</i> VGI			
	FLZ	ITZ	AMB
LMM201	≤ 1 (59,2)	$\leq 0,12$ (74,4)	1 (93,1)
LMM202	≤ 1 (56,4)	$\leq 0,12$ (70,4)	0,5 (82,6)
LMM244	≤ 1 (56,4)	$\leq 0,5$ (50,3)	0,25(89,8)
LMM253	≤ 1 (58,5)	$\leq 0,12$ (85,1)	0,5 (91,3)
LMM272	≤ 1 (63,1)	$\leq 0,12$ (77,5)	0,25 (89,2)
LMM326	≤ 1 (72,2)	$\leq 0,12$ (70)	0,5 (89,4)
LMM330	≤ 1 (73,5)	0,25 (93,8)	0,25 (95)
LMM347	≤ 1 (51,5)	0,25 (59,1)	0,25 (89,6)
LMM353	≤ 1 (58,3)	$\leq 0,12$ (53,7)	0,25 (91,05)
LMM359	≤ 1 (53,7)	$\leq 0,12$ (50,3)	0,25 (89)
LMM362	≤ 1 (63,8)	$\leq 0,12$ (58,9)	0,25 (82,5)
LMM378	≤ 1 (70,1)	$\leq 0,12$ (65,1)	0,25 (94,7)
LMM384	≤ 1 (71,6)	$\leq 0,12$ (72,6)	0,25 (94,9)
LMM1430	≤ 1 (66,8)	$\leq 0,12$ (66,2)	1 (82,1)
LMM1436	≤ 1 (64,2)	$\leq 0,12$ (70,5)	2 (78,2)
LILI10/10	≤ 1 (51,5)	0,5 (43,70)	1 (91,4)

FLZ = Fluconazol; ITZ = Itraconazol; AMB = Anfotericina B; CMF = Citometria de Fluxo; LMM = Laboratório de Micologia Médica; CIM = Concentração inibitória mínima

Tabela 3. Relação das CIMs ($\mu\text{g/mL}$) de FLZ, ITZ e AMB correspondente a percentagens de morte de *C. gattii* VGII obtidas pelo método de CMF.

	$\mu\text{g/mL}(\% \text{ MORTE}) C. gattii \text{ VGII}$		
	FLZ	ITZ	AMB
LMM1422	4 (68,5)	$\leq 0,12$ (51,2)	1 (84,8)
LMM1425	32 (53)	0,5 (66,4)	1 (85,6)
LMM1429	32 (40,4)	$\leq 0,12$ (62,2)	1 (84,8)
LMM1431	2 (62)	0,25 (64,3)	1 (67,8)
LMM1432	8 (53,7)	0,5 (50,3)	1 (74,9)
LMM1435	32 (50,2)	0,5 (52,5)	1 (82,2)
LMM1437	4 (52,9)	0,5 (51,5)	1 (79,7)
LMM1438	8 (65)	0,25 (62)	0,25 (80,7)
LMM1441	8 (53,5)	0,25 (42,1)	1 (95)
LMM1444	4 (53,1)	0,25 (60,1)	2 (88,7)
LMM1449	4 (62,1)	0,25 (46)	1 (92,6)
LMM1451	2 (66,3)	0,25 (51,3)	2 (84,8)
LMM1460	2 (73,4)	$\leq 0,12$ (40,1)	1 (82,2)
LMM1463	8 (59,8)	0,5 (53,1)	1 (85,1)
LMM1480	2 (44)	0,5 (44,1)	1 (81,7)
LMM1493	8 (56,2)	0,25 (54,1)	1 (97,1)
LMM17	2 (60,1)	0,5 (45,6)	0,5 (80,5)
LMM901	2 (60,2)	0,25 (39,5)	2 (87,6)
LMM994	8 (46,9)	0,5 (52,5)	2 (99,4)

FLZ = Fluconazol; ITZ = Itraconazol; AMB = Anfotericina B

CMF = Citometria de Fluxo; LMM = Laboratório de Micologia Médica

CIM = Concentração inibitória mínima

Tabela 4. Relação das CIMs ($\mu\text{g/mL}$) de FLZ, ITZ e AMB correspondente as percentagens de morte de *C. neoformans* obtidas pelo método de CMF.

	$\mu\text{g/mL}(\% \text{ MORTE}) C. neoformans \text{ VNI}$		
	FLZ	ITZ	AMB
LMM1426	8 (63,2)	0,5(47,8)	1 (96,8)
LMM1494	≤ 1 (61,7)	0,5(47,2)	1(86,9)
LMM1433	4 (49,9)	$\leq 0,12(52,2)$	1(99,5)
LMM1434	4 (47,6)	0,25(51,5)	1(94,3)
LMM1443	4 (65,8)	0,25(51,5)	1(91)
LMM1446	8(55,9)	0,5 (53,2)	1(98,2)
LMM1448	$\leq 1(50,4)$	0,5 (52,5)	1(820)
LMM1450	4(58,1)	0,5 (49)	0,5 (92,5)
LMM1452	4(51,4)	0,5 (49)	1(83,3)
LMM1455	4(52)	0,5 (49)	1(80,1)
LMM1457	4(63)	0,5 (42,3)	0,5(85,3)
LMM1468	2(70,6)	0,5 (46,2)	1(80,1)
LMM1473	16(51,4)	0,5 (51,4)	1(79,7)
LMM1475	4(71,3)	0,25 (48,7)	0,5(86,7)
LMM1495	8(69,4)	0,25 (48)	1(91,3)
LMM1496	8(69,4)	0,25 (48)	1(80,3)
LMM1497	2(60,2)	0,5 (48,5)	1(92,4)
LMM1498	4(62)	0,5 (53,5)	1(95,3)
LMM1499	2(52)	$\leq 0,12$ (65,1)	1(90,4)

FLZ = Fluconazol; ITZ = Itraconazol; AMB = Anfotericina B

CMF = Citometria de Fluxo; LMM = Laboratório de Micologia Médica

CIM = Concentração inibitória mínima

Nos resultados observados na combinação de VRZ e AMB foi observado antagonismo em quatro isolados do tipo molecular VNI, na presença de L-DOPA com glicose 0,2%, os outros quatro isolados do mesmo tipo molecular apresentaram indiferença. Para o tipo molecular VGII na presença de L-DOPA foram observados dois isolados com antagonismo e os seis restantes apresentaram indiferença, no entanto, na ausência de L-DOPA foram observados três isolados com sinergismo parcial dentre 15 analisados (tabela 5).

Tabela 5. Combinação de voriconazol e anfotericina B na presença e ausência de L-DOPA para *C. neoformans* e *C. gattii* com glicose 0,2 %

Parâmetros	<i>C. neoformans</i>		<i>C. gattii</i>	
	Com L-DOPA (8 isolados)	Sem L-DOPA (15 isolados)	Com L-DOPA (8 isolados)	Sem L-DOPA (15 isolados)
Intervalos de CIF A	1-8,3	1-208	1-4,1	0,48-2
Intervalos de CIF B	0,53-0,26	0,13-0,53	0,01-0,26	0,06-0,66
Intervalos de CIM a	0,03-0,25	0,06-0,25	0,03-0,5	0,25-0,5
Intervalos de CIM b	0,008-0,03	0,008-0,06	0,03-0,12	0,015-0,12
Intervalos de ICIF	1,5-8,8	1,26-3	1,13-4,26	0,54-2,53

CIM a = Concentração inibitória mínima de anfotericina B da forma isolada;
 CIM b = Concentração inibitória mínima de voriconazol da forma isolada;
 CIF A = Concentração Inibitória Fracional de anfotericina B em combinação;
 CIF B = Concentração Inibitória Fracional de voriconazol em combinação;
 ICIF = Índice da Concentração Inibitória Fracional.

Para verificar se o acréscimo da glicose (de 0,2 para 2,0%) interfere nos resultados da combinação de VZL e AMB foi realizado estudo com 19 isolados de *C. neoformans* e 20 de *C. gattii*, o resultado apresentou 100% de indiferença, como demonstrado na tabela 6.

Tabela 6. Interação de Voriconazol e Anfotericina B para *C. neoformans* e *C. gattii* na ausência de L-DOPA acrescido de glicose 2,0 %

	<i>C neoformans</i>	<i>C. gattii</i>
Parâmetros	(19 isolados)	(20 isolados)
Intervalos de CIF A	0,5-1,0	1,0
Intervalos de CIF B	0,2-1,0	0,26-1,0
Intervalos de CIM a	1,0	1,0
Intervalos de CIM b	0,008-0,03	0,008-0,03
Intervalos de ICIF	1,0-2,0	1,2-2,0

CIF A = Concentração inibitória fracional de anfotericina B,

CIF B = Concentração inibitória fracional de voriconazol,

CIM a = Concentração inibitória mínima de anfotericina B da forma isolada,

CIM b = Concentração inibitória mínima de voriconazol da forma isolada,

CIF = Concentração Inibitória Fracional,

ICIF = Índice da Concentração Inibitória Fracional.

Na figura 1, estão exibidos os resultados em dot plots que expressam tamanho celular (FS) versus intensidade de fluorescência pela incorporação de LA em FL4 LOG (filtro 675 nm *Band Pass*, cor laranja avermelhado), nesta figura foi verificada autofluorescência e controles de incorporação do fluorocromo nas células de *C. neoformans* (LMM143), o direcionamento das células para o quadrante direito - do dot plot - indicam incorporação do fluorocromo pela célula com membranas danificadas pelo formaldeído (1% incubadas por 1h antes do acréscimo da LA).

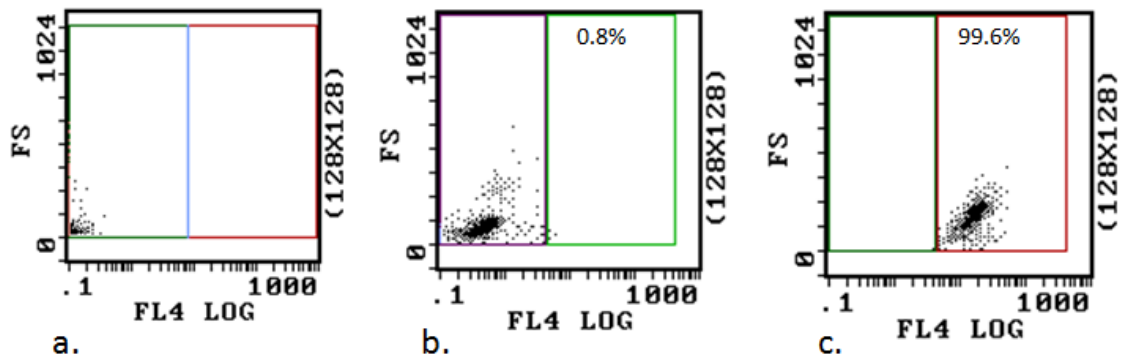


Figura 1. Dot plots de tamanho (FS) versus intensidade de fluorescência pela incorporação de Laranja de Acridina (LA) (FL4 LOG) : **a.** Autofluorescência; **b.** *C. neoformans* corado com LA por 30min, **c.** *C. neoformans*, células mortas depois de 1h de incubação com formaldeído 1% e corado com LA por 30 minutos.

A figura 2, exibe histograma da análise de sobreposição da intensidade de fluorescência de LA no eixo x do controle vivo. As diluições 1-8-64 μ g / mL de FLZ e controle de morte com formaldeído 1% obtidos na citometria de fluxo do isolado *C. neoformans* (LMM143) são apresentadas a seguir.

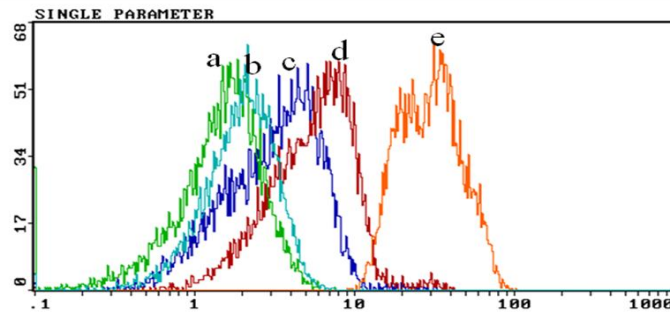


Figura 2. Histogramas obtidos pela citometria de fluxo, análise de sobreposição de eixo x mostrando a intensidade de fluorescência da impregnação de LA (FL4 LOG filtro 675 nm Band Pass cor laranja avermelhado) de *C. neoformans* com uso de LA e tratado com fluconazol: **a.** Controle vivo; **b.** 1 μ g/mL; **c.** 8 μ g/mL; **d.** 64 μ g/mL; **e.** Controle de células mortas tratadas com 1% de formaldeído, durante 1h de incubação.

As figuras 3-5, mostram dot plots da percentagem de células danificadas obtidos a partir dos controles de qualidade, *C. krusei* e *C. parapsilopsis*, para AMB, ITZ, FLZ usados como controle de qualidade do teste e padronização para determinar as concentrações inibitórias mínimas pela citometria de fluxo para *C. neoformans* e *C. gattii*.

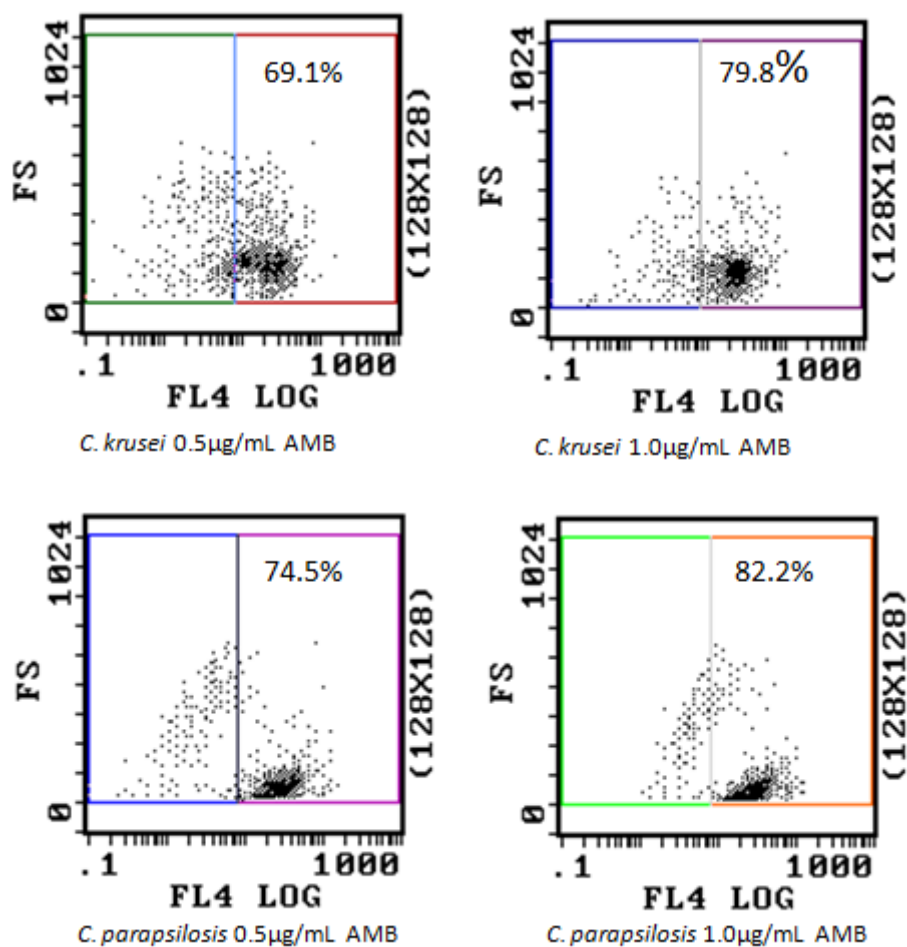


Figura 3. Dot plots de tamanho (FS) versus intensidade de fluorescência pela incorporação de (LA) em FL4 LOG filtro 675 nm Band Pass cor laranja avermelhado, de *Candida krusei* INCQS 40147 (ATCC 6258) e *Candida parapsilosis* INCQS 40038 (ATCC 22019) frente a AMB com sua respectiva CIM e a diluição anterior.

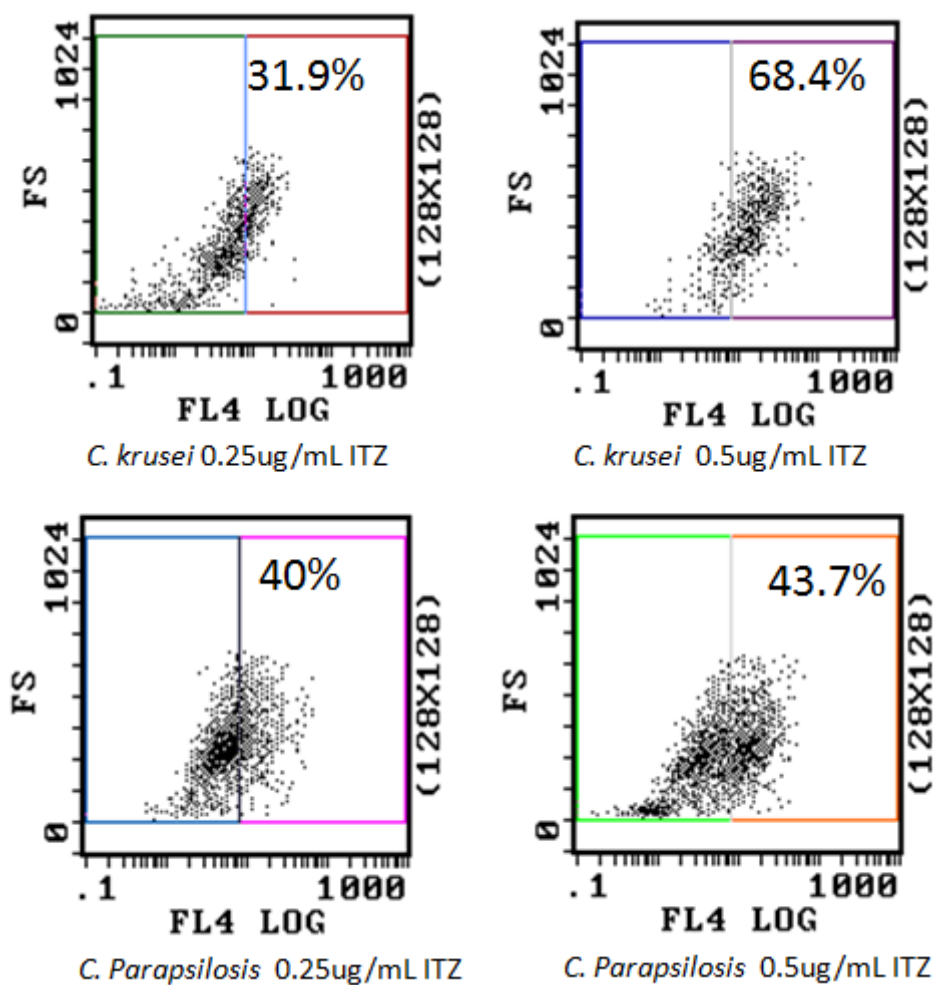


Figura 4. Dot plots de tamanho (FS) versus intensidade de fluorescência pela incorporação de (LA) em FL4 LOG filtro 675 nm Band Pass cor laranja avermelhado, de *Candida krusei* INCQS 40147 (ATCC 6258) e *Candida parapsilosis* INCQS 40038 (ATCC 22019) frente ao ITZ com sua respectiva CIM e a diluição anterior.

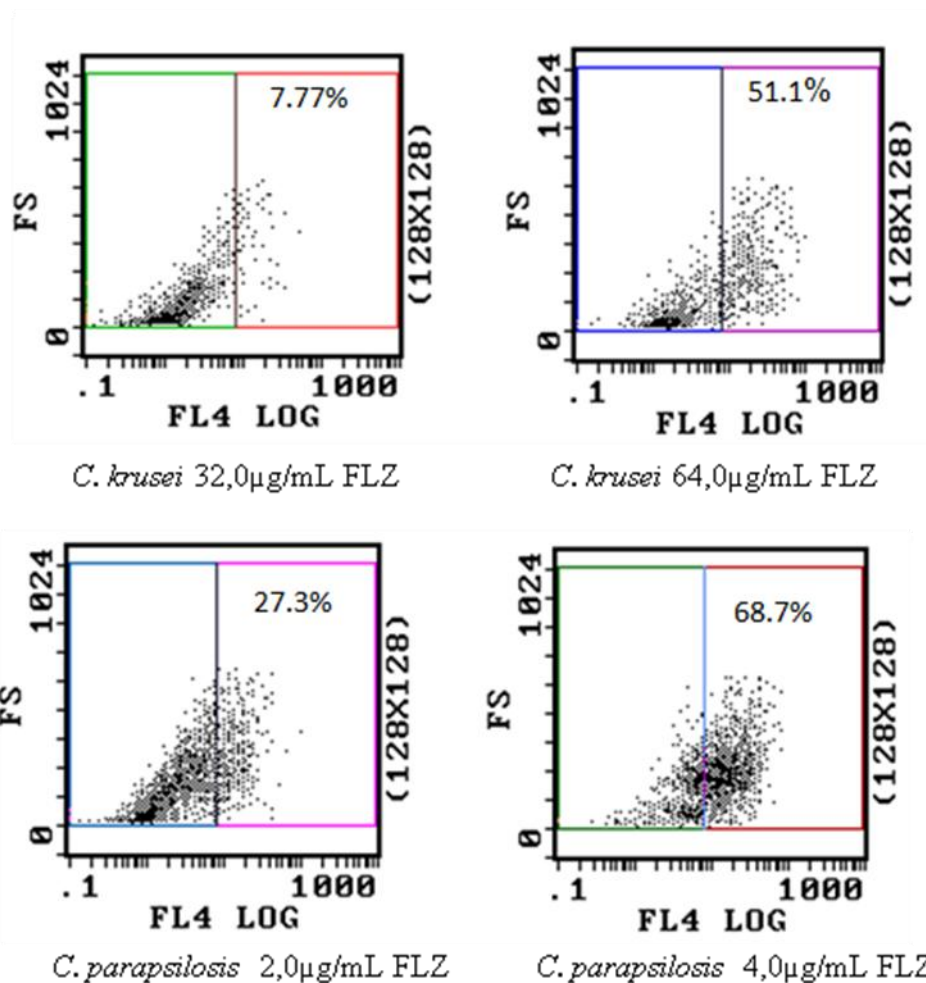


Figura 5. Dot plots de tamanho (FS) versus intensidade de fluorescência pela incorporação de (LA) em FL4 LOG filtro 675 nm Band Pass cor laranja avermelhado, de *Candida krusei* INCQS 40147 (ATCC 6258) e *Candida parapsilosis* INCQS 40038 (ATCC 22019) frente ao FLZ com sua respectiva CIM e a diluição anterior.

A figuras 6-8 mostram dot plots de *C. neoformans* e *C. gattii* frente a AMB, ITZ e FLZ, respectivamente, estas figuras demonstram no quadrante direito do dot plot percentagem de células mortas correspondentes as CIM e diluição anterior da respectiva droga.

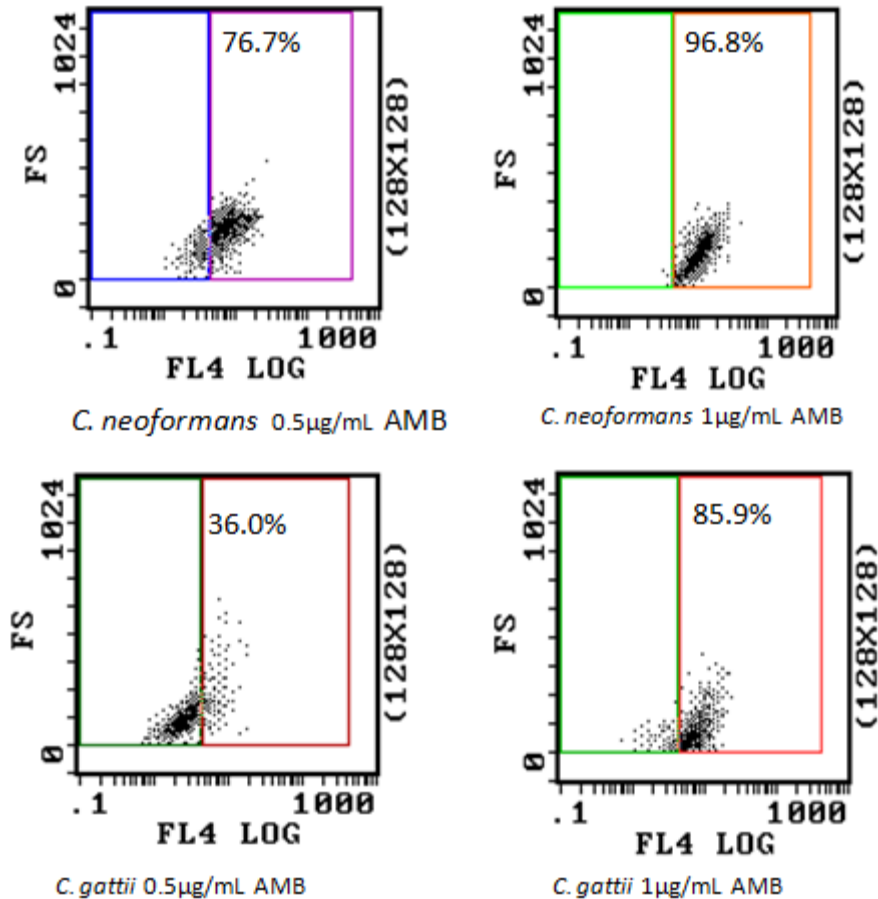


Figura 6. Dot plots de tamanho (FS) versus intensidade de fluorescência pela incorporação de (LA) em FL4 LOG filtro 675 nm Band Pass cor laranja avermelhado, de *C. neoformans* LMM1433 VNI, e *C. gattii* LMM1493 VGII, mostrando percentagem de morte de células frente a AMB com sua respectiva CIM e a diluição anterior.

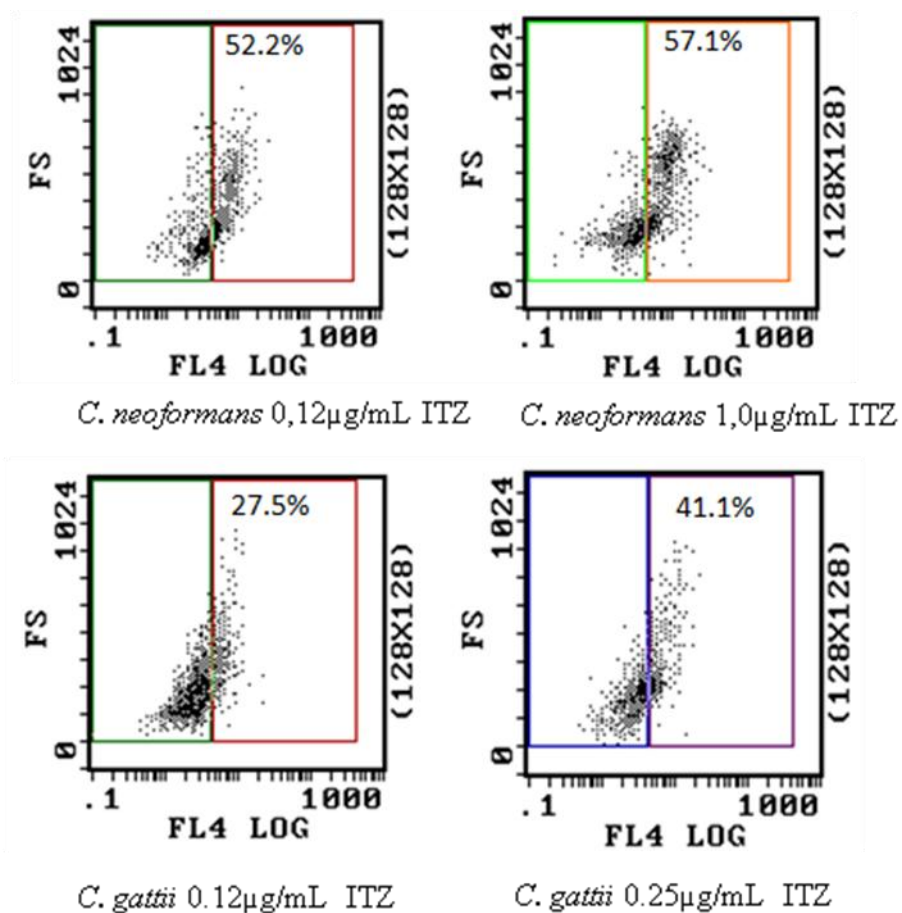


Figura 7. Dot plots de tamanho (FS) versus intensidade de fluorescência pela incorporação de (LA) em FL4 LOG filtro 675 nm Band Pass cor laranja avermelhado, de *C. neoformans* LMM1433 VNI, com sua respectiva MICs e 1 μ g/mL de ITZ. *C. gattii* LMM1493 VGII, mostrando percentagem de morte de células frente ao ITZ com sua respectiva CIM e a diluição anterior.

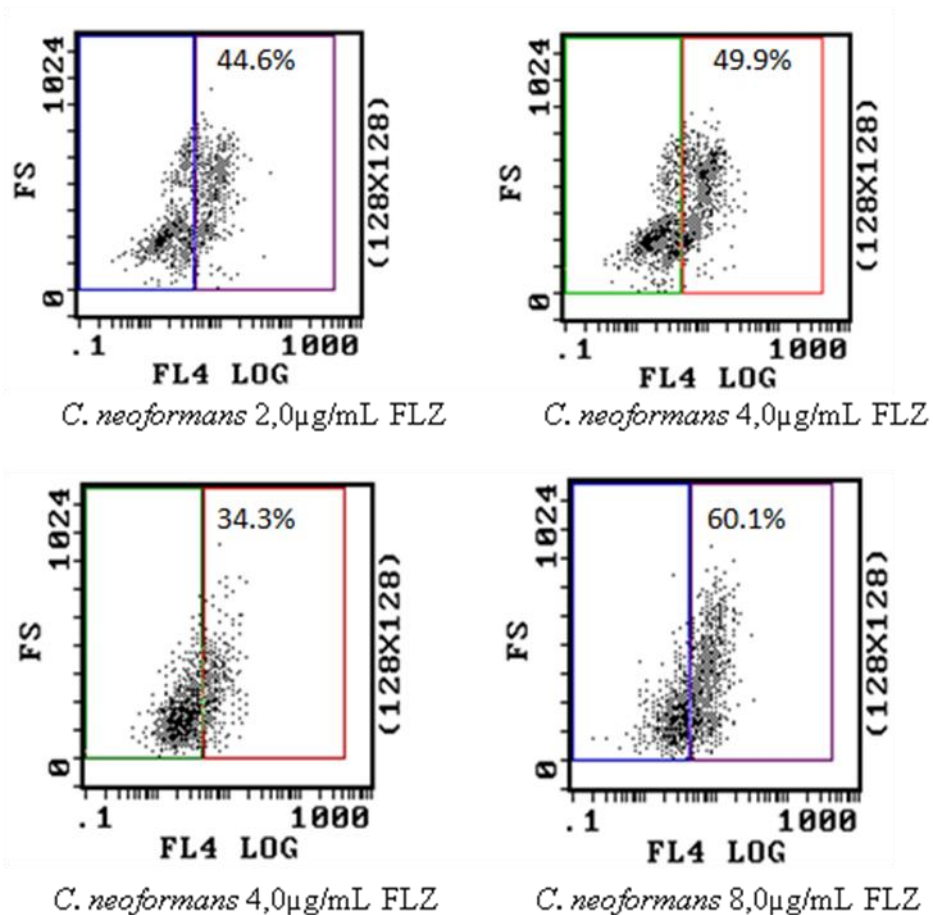


Figura 8. Dot plots de tamanho (FS) versus intensidade de fluorescência pela incorporação de (LA) em FL4 LOG filtro 675 nm Band Pass cor laranja avermelhado de *C. neoformans* LMM1433 VNI, e *C. gattii* LMM1493 VGII, mostrando percentagem de morte de células frente ao FLZ com sua respectiva CIM e a diluição anterior.

+

7 DISCUSSÃO

A maioria dos trabalhos que usa citometria de fluxo para estudo de suscetibilidade utilizaram isolados das espécies de *Candida* spp, com utilização de fluorocromos iodeto de propídeo (PI) e FUN-1 (Ramani, Ramani, and Wong 1997)(Y. H. Joung et al. 2007), no presente estudo foram utilizados fluorocromos Laranja de Acridina (LA) e FUN-1 para a determinação das CIMs de isolados *Cryptococcus neoformans* VNI e *Cryptococcus gattii* VGI e VGII.

Green et al. (1994) (Green et al. 1994) testou um isolado de *C. neoformans* dentro de um grupo de leveduras e não obteve resultados esperados com PI para este fungo. Pina-Vaz et al. (2005) (Pina-Vaz et al. 2005) testou FUN-1 e PI para 60 isolados de *Candida* spp. e três isolados de *C. neoformans* para itraconazol (ITZ), voriconazol e caspofungina. Porém, não teve resultados comparáveis com PI apesar de afirmar ter excelentes resultados com FUN-1 em 1h de incubação para ITZ, voriconazol e caspofungina. Ramani e Chaturvedi (2000) Ramani e Chaturvedi (2000b) utilizaram PI para anfotericina B(AMB) e fluconazol (FLZ) em 81 isolados, dos quais 16 eram *C. neoformans* e obtiveram resultados comparáveis com CLSI M27 - A3 (CLSI) em 4h e 6h para AMB e FLZ respectivamente. No entanto, estes autores utilizaram a adição de desoxicolato de sódio para aumentar a permeabilidade de PI, o que pode também aumentar a penetração e ação da droga testada na célula fúngica.

Até o momento, número reduzido de isolados de *C. neoformans* foram analisados por PI e ou FUN-1, com resultados variáveis. Em nosso estudo realizamos estudo-piloto testando PI com e sem *deoxycholate* para AMB, ITZ e FLZ e não obtivemos resultados comparáveis com o método CLSI.

Segundo Rudensky et al. (2005) (Rudensky et al. 2005) o desoxicolato de sódio forma coágulos (*gelificação*) na suspensão de leveduras durante a leitura no citômetro, sendo assim este autor propõe o uso de LA como indicador de viabilidade para *Candida* spp. Decidimos então fazer um estudo-piloto com este fluorocromo para *C. neoformans* e *C. gattii* e obtivemos resultados bastante satisfatórios, comparáveis com o método CLSI (figura, 3 e 4). É importante ressaltar que a leitura pelo método CLSI em nosso estudo foi realizado por espectrofotometria em leitor de microplacas e que o meio RPMI1640 utilizado nos dois

métodos contêm concentração final de 2% de glicose. Estas mudanças são recomendadas pelo protocolo CLSI, como alternativa para acelerar o crescimento de *C. neoformans* e *C. gattii*. Além do mais, a incubação foi realizada com agitação contínua a 200rpm a 35°C para o método de CMF. Assim sugere-se que estas alterações foram importantes para obtenção de resultados comparáveis com o método CLSI utilizando LA. Diferentemente, (Ramani e Chaturvedi 2000a) não obtiveram resultados satisfatórios com LA. A metodologia utilizada por estes autores não é comparável à do presente estudo, pois utiliza RPMI1640 com dextrose 1% e não menciona incubação com agitação contínua, o que consideramos importante para obter resultados homogêneos e comparáveis em menor tempo de incubação para leitura.

Além dos poucos estudos para *C. neoformans*, nenhum com análise de CMF com LA para *C. gattii* está disponível na literatura. Assim, esta ferramenta mostra-se interessante para determinação de testes de suscetibilidade antifúngica de *C. neoformans* e *C. gattii*, já que estes fungos de importância clínica apresentam crescimento lento. Em nosso estudo as CIMs de 5FC obtidas na CMF, com uso de LA e FUN-1, não foram comparáveis com o método CLSI e não apresentaram reprodutibilidade (dados não mostrados).

Analisando os parâmetros intervalos, CIM 50 em CIM 90, foi possível verificar concordância de resultados de CMF e CLSI, com variação de \pm duas diluições (concordância essencial), para AMB, FLZ e ITZ demonstrando a utilidade da CMF para os testes de suscetibilidade antifúngica para ambos os agentes da criptococose. Com relação aos resultados de percentual de morte pela CMF frente ao FZC, foram observadas CIMs uniformes para VGI (≤ 1 um/mL) e variadas para VNI (1 a 16 μ g/mL) e VGII (2 a 32 μ g/mL) como demonstrado na tabela 2. Com relação ao ITZ, os resultados de percentual morte mostram CIMs uniformes para VGI (12 com 0,12 μ g/mL) e com variação para VNI (0,12 a 0.5) e VGII (0,12 a 0.5). Já com relação a AMB pela CMF, os tipos VGI e VNI mostram resultados predominantemente uniformes, mas com relação ao tipo VGII, foram observados 4 isolados com 2 μ g/mL dentre os 19 analisados. Tais resultados foram verificados em triplicata pela CMF demonstrando reprodutibilidade deste método, onde padronizamos 9h de incubação para leitura. O resultado da AMB está dentro dos limites das CIMs (0.25-2.0 e 0.5-2.0 μ g/mL) em 24h de incubação das cepas controle de qualidade *C. parapsilosis* e *C. krusei* respectivamente (susceptíveis a AMB) como recomendado pelo CLSI M27 –A3, na tabela 6 do protocolo CLSI M27-S3.

Os resultados pela CMF apresentaram diferença estatística significativa ($p = 0.001$) quando comparamos VGII com VGI afirmando a menor suscetibilidade *in vitro* do tipo molecular VGII. Do mesmo modo, o tipo VGI mostrou-se menos sensível a AMB do que o VNI com p valor significativo ($p = 0.001$). Neste estudo, as Médias Geométricas (MG) de VGII apresentam valores maiores daqueles observados para os tipos VGI e VNI com relação a todas as drogas analisadas por CMF. Portanto não somente para azólicos, mas também para AMB foi observada menor suscetibilidade *in vitro* de isolados clínicos do tipo VGII do Brasil, concordando com estudo realizado por Trilles et al. (2012), que utilizou o método CLSI.

Para a comparação de suscetibilidade antifúngica entre os tipos moleculares, o método CLSI apresentou resultados similares, mas não significativos estatisticamente ($p = 0.80$) no presente trabalho. Portanto esses resultados sugerem maior sensibilidade do método CMF, o que pode ser atribuído à análise de número constante e amplo de células (10.000) enquanto que o CLSI parte de inóculo variável e menor $5,0 \times 10^2 - 2,5 \times 10^3$ ufc/mL. Consideramos este aspecto crítico para obtenção de resultados reprodutíveis em isolados heterogêneos contendo sub-populações com diferente suscetibilidade a antifúngicos. Sob esse aspecto chama atenção a potencial heterogeneidade dos agentes da criptococose.

Em relação à combinação de AMB e 5FC, os dados obtidos são coerentes com resultados relatados e pesquisas realizadas *in vivo*, os resultados e discussões desta combinação estão no capítulo III desta tese.

Os resultados obtidos na combinação *in vitro* de voriconazol (VRZ) e AMB no presente estudo (tabelas 5 e 6) não refletem os achados de pesquisa realizada em modelo murino que demonstrou que a combinação VRZ e AMB aumentou a sobrevivência dos animais e reduziu a quantidade de leveduras de *C. neoformans* no tecido pulmonar (Silva et al. 2011). No nosso estudo verificamos que os agentes da criptococose do tipo molecular VGII e VNI são suscetíveis, *in vitro*, a baixas concentrações de VRZ ($\leq 0,12 \mu\text{g/mL}$). Estes resultados são concordantes com estudo realizado por Mavrogiorgos et al. (2006) que verificaram a eficácia deste triazólico de terceira geração -VRZ- utilizando modelo murino de infecção e demonstraram que esta droga reduz significativamente o polissacarídeo de *C. neoformans* no soro, e prolonga a sobrevivência dos camundongos letalmente infectados (Mavrogiorgos et al. 2006).

Quanto aos resultados obtidos em meio indutor de melanina, a expressão desta implicou na modificação de resultados dos testes *in vitro* da combinação de 5FC e AMB, com

redução da detecção de sinergismo destas drogas, e aumento da indiferença, como detalhado no capítulo III.

O estudo de resistência ao FLZ instrumentado pela citometria de fluxo para análise das bombas de efluxo, com auxílio de fluorocromo DIOC₅, permitiu verificar que as células fúngicas dos agentes da criptococose expulsam o FLZ com facilidade. Além do mais, foi possível verificar, pelo método de indução *in vitro*, que há comportamento diferenciado entre os três tipos moleculares com relação à resistência de FLZ e permanência da resistência quando submetidos a passagens sucessivas em meio livre desta droga, estes resultados encontram-se detalhados no capítulo IV.

Na citometria de fluxo foi possível confirmar a reprodutibilidade dos resultados obtidos nos testes de suscetibilidade *in vitro* em curtos espaços de tempo. A leitura automatizada é outra vantagem oferecida nessa abordagem. Vale ressaltar que é importante a escolha do tipo de fluorocromo usado em relação ao mecanismo de ação da droga e que não obtivemos resultados reprodutíveis para 5FC com LA e FUN-1.

Com os resultados obtidos neste estudo esperamos contribuir para o conhecimento dos mecanismos relacionados à suscetibilidade *in vitro* a antifúngicos para os principais agentes da criptococose no Brasil.

8 CONCLUSÃO GERAL

1. Na análise do perfil da suscetibilidade *in vitro* de *C. neoformans* e *C. gattii* frente a FLZ, ITZ e AMB pelo método CLSI e citometria de fluxo, foi verificado que o tipo molecular VGII apresenta média geométrica maior em relação a VGI e VNI, demonstrando que o tipo molecular interfere nos resultados.

Na combinação de AMB e 5FC constatamos a necessidade de padronização da concentração da glicose para que estes testes possam ser futuramente relacionados a dados clínicos.

2. A Citometria de Fluxo pode ser uma alternativa de leitura automatizada, reprodutível, para os testes de suscetibilidade antifúngica, com potencial para monitorar o surgimento de resistência dos diferentes tipos moleculares de *C. neoformans* e *C. gattii* através da utilização dos fluorocromos: LA para FLZ, ITZ, AMB e FUN-1 para AMB.

3. A análise de CML foi importante para verificar a ação protetora da melanina frente AMB e 5FC.

4. A avaliação da ação da melanina pela adição de L-DOPA mostra que este pigmento reduz a ação sinérgica e o efeito aditivo na interação de AMB e 5FC. Isto indica necessidade de estudos futuros de correlação *in vitro* e *in vivo*.

5. A indução da resistência ao fluconazol é importante na verificação da expressão de bombas de efluxo *in vitro* de *C. neoformans* VNI, *C. gattii* VGI e GVII pela citometria de fluxo. O fluorocromo Dioc5 apresentou resultados reprodutíveis, em relação aos outros testados para verificar bombas de efluxo.

6. No presente estudo o fluorocromo Dioc5 e bloqueador de protonoforos CCCP permitiram verificar que cerca de 65% isolados não induzidos e 90% de isolados induzidos do tipo molecular VGII, expulsam, com certa vantagem o fluorocromo, em relação aos tipos moleculares VGI e VNI.

9 REFERÊNCIAS

- Antoniadou, Anastasia, and Dimitrios P Kontoyiannis. 2003. "Status of Combination Therapy for Refractory Mycoses." *Current Opinion in Infectious Diseases* 16 (6): 539–545.
- Arpita Singh, Robert J. Panting, Ashok Varma, Tomomi Saijo, Kevin J. Waldron, Ambrose Jong, Popchai Ngamskulrungraj, Yun C. Chang, Julian C. Rutherford, Kyung J. Kwon-Chung. Factors Required for Activation of Urease as a Virulence Determinant in *Cryptococcus neoformans*. mBio. 2013 May-Jun; 4(3): e 00220-13.
- Arthington-Skaggs, B A, D W Warnock, and C J Morrison. 2000. "Quantitation of *Candida albicans* Ergosterol Content Improves the Correlation between in Vitro Antifungal Susceptibility Test Results and in Vivo Outcome after Fluconazole Treatment in a Murine Model of Invasive Candidiasis." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44 (8): 2081–2085.
- Azevedo, Ana Carolina, Fernando César Bizerra, Daniel Arquimedes da Matta, Leila Paula de Almeida, Robert Rosas, and Arnaldo Lopes Colombo. 2011. "In Vitro Susceptibility of a Large Collection of Candida Strains against Fluconazole and Voriconazole by Using the CLSI Disk Diffusion Assay." *Mycopathologia* 171 (6) (June): 411–416. doi:10.1007/s11046-010-9387-1.
- Bacal, Nydia Strachman. 2003. *Aplicação Prática Em Citometria de Fluxo*. São Paulo: Editora Atheneu.
- Baddley, J W, J R Perfect, R A Oster, R A Larsen, G A Pankey, H Henderson, D W Haas, et al. 2008. "Pulmonary Cryptococcosis in Patients without HIV Infection: Factors Associated with Disseminated Disease." *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology* 27 (10) (October): 937–943. doi:10.1007/s10096-008-0529-z.
- Balzi, E, and A Goffeau. 1991. "Multiple or Pleiotropic Drug Resistance in Yeast." *Biochimica et Biophysica Acta* 1073 (2) (March 4): 241–252.
- Bicanic, Tihana, Robin Wood, Graeme Meintjes, Kevin Rebe, Annemarie Brouwer, Angela Loyse, Linda-Gail Bekker, Shabbar Jaffar, and Thomas Harrison. 2008. "High-Dose Amphotericin B with Flucytosine for the Treatment of Cryptococcal Meningitis in HIV-Infected Patients: A Randomized Trial." *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 47 (1) (July 1): 123–130. doi:10.1086/588792.

- Borges-Walmsley, M Ines, Kenneth S McKeegan, and Adrian R Walmsley. 2003. "Structure and Function of Efflux Pumps That Confer Resistance to Drugs." *The Biochemical Journal* 376 (Pt 2) (December 1): 313–338. doi:10.1042/BJ20020957.
- Borghi, Elisa, Roberta Iatta, Rita Sciota, Caterina Biassoni, Teresa Cuna, Maria Teresa Montagna, and Giulia Morace. 2010. "Comparative Evaluation of the Vitek 2 Yeast Susceptibility Test and CLSI Broth Microdilution Reference Method for Testing Antifungal Susceptibility of Invasive Fungal Isolates in Italy: The GISIA3 Study." *Journal of Clinical Microbiology* 48 (9) (September): 3153–3157. doi:10.1128/JCM.00952-10.
- Brion, Luc P, Smart E Uko, and David L Goldman. 2007. "Risk of Resistance Associated with Fluconazole Prophylaxis: Systematic Review." *The Journal of Infection* 54 (6) (June): 521–529. doi:10.1016/j.jinf.2006.11.017.
- Brizendine, Kyle D, John W Baddley, and Peter G Pappas. 2011. "Pulmonary Cryptococcosis." *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* 32 (6) (December): 727–734. doi:10.1055/s-0031-1295720.
- Brouwer, Annemarie E, Adul Rajanuwong, Wirongrong Chierakul, George E Griffin, Robert A Larsen, Nicholas J White, and Thomas S Harrison. 2004a. "Combination Antifungal Therapies for HIV-Associated Cryptococcal Meningitis: A Randomised Trial." *Lancet* 363 (9423) (May 29): 1764–1767. doi:10.1016/S0140-6736(04)16301-0.
- . 2004b. "Combination Antifungal Therapies for HIV-Associated Cryptococcal Meningitis: A Randomised Trial." *Lancet* 363 (9423) (May 29): 1764–1767. doi:10.1016/S0140-6736(04)16301-0.
- Brusick, D J. 1972. "Induction of Cycloheximide-Resistant Mutants in *Saccharomyces Cerevisiae* with N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine and ICR-170." *Journal of Bacteriology* 109 (3) (March): 1134–1138.
- Buchanan KL and Murphy JW. What makes *Cryptococcus neoformans* a pathogen? *Emerg Infect Dis.* 1998 Jan-Mar; 4(1): 71–83.
- CADERNOS DE ATENÇÃO BÁSICA MINISTÉRIO DA SAÚDE HIV/Aids. 2006. "Hepatites E Outras DST Cadernos de Atenção Básica." n.º , Brasília – DF. <http://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/abcd18.pdf>.
- Cantón, Emilia, Javier Pemán, Angel Viudes, Guillermo Quindós, Miguel Gobernado, and Ana Espinel-Ingroff. 2003. "Minimum Fungicidal Concentrations of Amphotericin B

for Bloodstream Candida Species.” *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 45 (3) (March): 203–206.

Carl L. Pierson. 1994. *Antimicrobial Susceptibility Testing in Clinical Laboratory Medicine*. Charper 49. publishing house Sans Tache. Williams & Wilkins. Baltimore Philadelphia Hong Kong London Munich Dydney Tokyo. 428 East Preston Street Baltimore, Maryland 21202, USA.: Kenneth D. McClatchey, M.FD., D.D.S.

Casadevall A, and Perfect JR. 1998. *Introduction to the Pathogen. In: A Casadevall & Perfect JR. Cryptococcus Neoformans*. Washington DC: ASM Press.

Casadevall, A, A L Rosas, and J D Nosanchuk. 2000. “Melanin and Virulence in *Cryptococcus neoformans*.” *Current Opinion in Microbiology* 3 (4) (August): 354–358.

Casali, Agnes Kiesling, Letícia Goulart, Livia Kmetzsch Rosa e Silva, Angela Medeiros Ribeiro, Aline Almeida Amaral, Sydney Hartz Alves, Augusto Schrank, Wieland Meyer, and Marilene Henning Vainstein. 2003. “Molecular Typing of Clinical and Environmental *Cryptococcus neoformans* Isolates in the Brazilian State Rio Grande Do Sul.” *FEMS Yeast Research* 3 (4) (June): 405–415.

Cavalcanti MAS. 1995. “Criptococose e seu agente no Meio Norte, estados do Piauí e Maranhão, Brasil. Rio de Janeiro.” Tese [Doutorado em Biologia parasitária], RJ: Fundação Oswaldo Cruz e Universidade Federal do Piauí (Teresina),.

Cejudo, M A Trinidad González, Auxiliadora González Gallego, Emilia Cantón Lacasa, Ana Isabel Aller, Ana Romero, Javier Pemán García, Guillermo Quindós Andrés, and Estrella Martín-Mazuelos. 2010. “Evaluation of the VITEK 2 System to Test the Susceptibility of *Candida* Spp., *Trichosporon Asahii* and *Cryptococcus Neoformans* to Amphotericin B, Flucytosine, Fluconazole and Voriconazole: A Comparison with the M27-A3 Reference Method.” *Medical Mycology: Official Publication of the International Society for Human and Animal Mycology* 48 (5) (August): 710–719. doi:10.3109/13693780903473343.

Chang, Y C, and K J Kwon-Chung. 1994. “Complementation of a Capsule-Deficient Mutation of *Cryptococcus neoformans* Restores Its Virulence.” *Molecular and Cellular Biology* 14 (7) (July): 4912–4919.

Chaya, Ramachandraiah, Srinivasan Padmanabhan, Venugopal Anandaswamy, and Aumir Moin. 2013. “Disseminated Cryptococcosis Presenting as Cellulitis in a Renal Transplant Recipient.” *Journal of Infection in Developing Countries* 7 (1): 60–63.

- Chen, Sharon C-A, Tony M Korman, Monica A Slavin, Deborah Marriott, Karen Byth, Narin Bak, Bart J Currie, et al. 2013. "Antifungal Therapy and Management of Complications of Cryptococcosis due to *Cryptococcus gattii*." *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* (May 22). doi:10.1093/cid/cit341.
- Chin, C S, Y M Cheong, and Y H Wong. 1989. "5-Fluorocytosine Resistance in Clinical Isolates of *Cryptococcus neoformans*." *The Medical Journal of Malaysia* 44 (3) (September): 194–198.
- Chong, Hin Siong, Rebecca Dagg, Richard Malik, Sharon Chen, and Dee Carter. 2010. "In Vitro Susceptibility of the Yeast Pathogen *Cryptococcus* to Fluconazole and Other Azoles Varies with Molecular Genotype." *Journal of Clinical Microbiology* 48 (11) (November): 4115–4120. doi:10.1128/JCM.01271-10.
- Clinical and Laboratory Standards Institutud (CLSI).2008, Clinical and Laboratory Standards Institutud (CLSI). "Clinical and Laboratory Standards Institutud (CLSI). Referenece Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast; Approved Standard - Third Edition."
- "Clinical Practice Guidelines for the Management of Cryptococcal Disease: 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America." 2011. Accessed August 29. <http://cid.oxfordjournals.org/content/50/3/291.full.pdf+html>.
- CLSI document M27-S3. 2008. "CLSI. Referenece Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast; Third Informational Suplement. CLSI Document M27-S3. Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008. (CLSI M27-S3; 2008)". CLSI. Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- "Comparative Analysis of Etest and Broth Microdilution Method (AFST-EUCAST) for Trends in Antifungal Drug Susceptibility Testing of Brazilian *Cryptococcus Neoformans* Isolates." 2012. Accessed March 1. <http://jmm.sgmjournals.org/content/55/12/1693.full.pdf+html>.
- Corrêa, M do P, E C Oliveira, R R Duarte, P P Pardal, F de M Oliveira, and L C Severo. 1999. "[Cryptococcosis in children in the State of Pará, Brazil]." *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 32 (5) (October): 505–508.
- Costa, Solange do P S E, Márcia dos S Lazéra, Wallace R A Santos, Bernardina P Morales, Cláudia C F Bezerra, Marília M Nishikawa, Gláucia G Barbosa, Luciana Trilles, José L M do Nascimento, and Bodo Wanke. 2009. "First Isolation of *Cryptococcus gattii* Molecular Type VGII and *Cryptococcus Neoformans* Molecular Type VNI from

- Environmental Sources in the City of Belém, Pará, Brazil.” *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 104 (4) (July): 662–664.
- Cuenca-Estrella, Manuel. 2004. “Combinations of Antifungal Agents in Therapy--What Value Are They?” *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 54 (5) (November): 854–869. doi:10.1093/jac/dkh434.
- Cuenca-Estrella, Manuel, Alicia Gomez-Lopez, Ana Alastruey-Izquierdo, Leticia Bernal-Martinez, Isabel Cuesta, Maria J Buitrago, and Juan L Rodriguez-Tudela. 2010. “Comparison of the Vitek 2 Antifungal Susceptibility System with the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Broth Microdilution Reference Methods and with the Sensititre YeastOne and Etest Techniques for in Vitro Detection of Antifungal Resistance in Yeast Isolates.” *Journal of Clinical Microbiology* 48 (5) (May): 1782–1786. doi:10.1128/JCM.02316-09.
- Darzynkiewicz, Z. 1990. “Differential Staining of DNA and RNA in Intact Cells and Isolated Cell Nuclei with Acridine Orange.” *Methods in Cell Biology* 33: 285–298.
- Datta, Kausik, Karen H. Bartlett, Rebecca Baer, Edmond Byrnes, Eleni Galanis, Joseph Heitman, Linda Hoang, et al. 2009. “Spread of *Cryptococcus gattii* into Pacific Northwest Region of the United States.” *Emerging Infectious Diseases* 15 (8) (August): 1185–1191. doi:10.3201/eid1508.081384.
- Day, Jeremy N, Tran T H Chau, and David G Lalloo. 2013a. “Combination Antifungal Therapy for Cryptococcal Meningitis.” *The New England Journal of Medicine* 368 (26) (June 27): 2522–2523. doi:10.1056/NEJMc1305981.
- . 2013b. “Combination Antifungal Therapy for Cryptococcal Meningitis.” *The New England Journal of Medicine* 368 (26) (June 27): 2522–2523. doi:10.1056/NEJMc1305981.
- Day, Jeremy N, Tran T H Chau, Marcel Wolbers, Pham P Mai, Nguyen T Dung, Nguyen H Mai, Nguyen H Phu, et al. 2013. “Combination Antifungal Therapy for Cryptococcal Meningitis.” *The New England Journal of Medicine* 368 (14) (April 4): 1291–1302. doi:10.1056/NEJMoa1110404.
- De Bedout, C, N Ordóñez, B L Gómez, M C Rodríguez, M Arango, A Restrepo, and E Castañeda. 1999. “In Vitro Antifungal Susceptibility of Clinical Isolates of *Cryptococcus neoformans* Var. *neoformans* and *C. neoformans* Var. *gattii*.” *Revista Iberoamericana de Micología* 16 (1) (March): 36–39.

- Doering, T L, J D Nosanchuk, W K Roberts, and A Casadevall. 1999. "C." *Medical Mycology: Official Publication of the International Society for Human and Animal Mycology* 37 (3) (June): 175–181.
- Dornelas RM,. 2006. "Comparativa Por Diferentes Metodologias Do Perfil de Susceptibilidade Aos Antifúngicos de Leveduras Isoladas de Espécimes Clínicos." Dissertação [Mestrado em Microbiologia], Rio de Janeiro: Instituto de microbiologia Programa Pós-Graduação IMPPG / UFRJ;
- Eisenman, Helene C, Joshua D Nosanchuk, J Beau W Webber, Ray J Emerson, Terri A Camesano, and Arturo Casadevall. 2005. "Microstructure of Cell Wall-Associated Melanin in the Human Pathogenic Fungus *Cryptococcus neoformans*." *Biochemistry* 44 (10) (March 15): 3683–3693. doi:10.1021/bi047731m.
- Eliopoulos, G M, and C T Eliopoulos. 1988. "Antibiotic Combinations: Should They Be Tested?" *Clinical Microbiology Reviews* 1 (2) (April): 139–156.
- Favalessa, Olivia Cometti, Luciano Correa Ribeiro, Tomoko Tadano, Cor Jesus Fernandes Fontes, Flávio Basili Dias, Bruno Pereira Albuquerque Coelho, and Rosane Christine Hahn. 2009. "[First Description of Phenotypic Profile and in Vitro Drug Susceptibility of *Cryptococcus* Spp Yeast Isolated from HIV-Positive and HIV-Negative Patients in State of Mato Grosso]." *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 42 (6) (December): 661–665.
- Franzot, S P, J S Hamdan, B P Currie, and A Casadevall. 1997. "Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* in Brazil and the United States: Evidence for Both Local Genetic Differences and a Global Clonal Population Structure." *Journal of Clinical Microbiology* 35 (9) (September): 2243–2251.
- Frases, Susana, Angela Salazar, Ekaterina Dadachova, and Arturo Casadevall. 2007. "*Cryptococcus neoformans* Can Utilize the Bacterial Melanin Precursor Homogentisic Acid for Fungal Melanogenesis." *Applied and Environmental Microbiology* 73 (2) (January): 615–621. doi:10.1128/AEM.01947-06.
- Fyfe, M, L MacDougall, M Romney, M Starr, M Pearce, S Mak, S Mithani, and P Kibsey. 2008. "*Cryptococcus gattii* Infections on Vancouver Island, British Columbia, Canada: Emergence of a Tropical Fungus in a Temperate Environment." *Canada Communicable Disease Report = Relevé Des Maladies Transmissibles Au Canada* 34 (6) (June): 1–12.
- Garcia-Rivera, Javier, Helene C Eisenman, Joshua D Nosanchuk, Philip Aisen, Oscar Zaragoza, Tiffany Moadel, Ekaterina Dadachova, and Arturo Casadevall. 2005.

“Comparative Analysis of *Cryptococcus neoformans* Acid-Resistant Particles Generated from Pigmented Cells Grown in Different Laccase Substrates.” *Fungal Genetics and Biology: FG & B* 42 (12) (December): 989–998. doi:10.1016/j.fgb.2005.09.003.

Gómez, Beatriz L, and Joshua D Nosanchuk. 2003. “Melanin and Fungi.” *Current Opinion in Infectious Diseases* 16 (2) (April): 91–96. doi:10.1097/01.aco.0000065076.06965.04.

GOVERNO DO. ESTADO DO CEARÁ. Secretaria da Saúde. 2013. “Informe Epidemiológico. AIDS.” Fevereiro/ . Página / 10. www.saude.ce.gov.br/index.php/boletins?download=40%3Ainforme-aids.

Green, L, B Petersen, L Steimel, P Haerber, and W Current. 1994. “Rapid Determination of Antifungal Activity by Flow Cytometry.” *Journal of Clinical Microbiology* 32 (4) (April): 1088–1091.

Ikeda, Reiko, Takashi Sugita, Eric S Jacobson, and Takako Shinoda. 2003. “Effects of Melanin upon Susceptibility of *Cryptococcus* to Antifungals.” *Microbiology and Immunology* 47 (4): 271–277.

Jarvis, Joseph N, and Thomas S Harrison. 2008. “Pulmonary *Cryptococcosis*.” *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* 29 (2) (April): 141–150. doi:10.1055/s-2008-1063853.

Joung, Dae-Ki, Hee Joung, DA-Wun Yang, Dong-Yeul Kwon, Jang-Gi Choi, Seo Woo, Dong-Young Shin, Oh-Hyun Kweon, Kee-Tae Kweon, and Dong-Won Shin. 2012. “Synergistic Effect of Rhein in Combination with Ampicillin or Oxacillin against Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*.” *Experimental and Therapeutic Medicine* 3 (4) (April): 608–612. doi:10.3892/etm.2012.459.

Joung, Young Hee, Hye Ryoum Kim, Mi Kyung Lee, and Ae Ja Park. 2007. “Fluconazole Susceptibility Testing of *Candida* Species by Flow Cytometry.” *The Journal of Infection* 54 (5) (May): 504–508. doi:10.1016/j.jinf.2006.09.016.

Kantarcioğlu, A Serda, Teun Boekhout, Ayhan Yücel, and Kemal Altas. 2009. “Susceptibility Testing of *Cryptococcus Diffluens* against Amphotericin B, Flucytosine, Fluconazole, Itraconazole, Voriconazole and Posaconazole.” *Medical Mycology: Official Publication of the International Society for Human and Animal Mycology* 47 (2) (March): 169–176. doi:10.1080/13693780802213407.

- Khan, Z U, H S Randhawa, W Chehadeh, Anuradha Chowdhary, T Kowshik, and Rachel Chandy. 2009. “*Cryptococcus neoformans* Serotype A and *Cryptococcus gattii* Serotype B Isolates Differ in Their Susceptibilities to Fluconazole and Voriconazole.” *International Journal of Antimicrobial Agents* 33 (6) (June): 559–563. doi:10.1016/j.ijantimicag.2008.11.007.
- Kidd, S E, F Hagen, R L Tschärke, M Huynh, K H Bartlett, M Fyfe, L Macdougall, T Boekhout, K J Kwon-Chung, and W Meyer. 2004a. “A Rare Genotype of *Cryptococcus gattii* Caused the Cryptococcosis Outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada).” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (49) (December 7): 17258–17263. doi:10.1073/pnas.0402981101.
- Kidd, S. E., F. Hagen, R. L. Tschärke, M. Huynh, K. H. Bartlett, M. Fyfe, L. Macdougall, T. Boekhout, K. J. Kwon-Chung, and W. Meyer. 2004b. “A Rare Genotype of *Cryptococcus gattii* Caused the Cryptococcosis Outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada).” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (49): 17258.
- Kozel, T R. 1995. “Virulence Factors of *Cryptococcus Neoformans*.” *Trends in Microbiology* 3 (8) (August): 295–299.
- Kwon-Chung, K J, J C Edman, and B L Wickes. 1992. “Genetic Association of Mating Types and Virulence in *Cryptococcus neoformans*.” *Infection and Immunity* 60 (2) (February): 602–605.
- Kwon-Chung, K J, I Polacheck, and J E Bennett. 1982. “Improved Diagnostic Medium for Separation of *Cryptococcus neoformans* Var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* Var. *gattii* (serotypes B and C).” *Journal of Clinical Microbiology* 15 (3) (March): 535–537.
- Kwon-Chung, K J, and J C Rhodes. 1986. “Encapsulation and Melanin Formation as Indicators of Virulence in *Cryptococcus neoformans*.” *Infection and Immunity* 51 (1) (January): 218–223.
- LABORATÓRIOS PFIZER LTDA. “Bula Aprovada Pela Anvisa Em 11/Jan/2013. Página 13. Embalado Por: Pfizer PGM Amboise – França Registrado.”. Av. Presidente Tancredo de Almeida Neves, 1555. CEP 07112-070 – Guarulhos – SP NPJ nº 46.070.868/0001-69 Fale Pfizer 0800-7701575. www.pfizer.com.br.
- Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Melo NT. 2002. *Criptococose In: Micologia Médica*. 8ªed. ed. São Paulo: Sarvier.

- Lamb, D C, A Corran, B C Baldwin, J Kwon-Chung, and S L Kelly. 1995. "Resistant P45051A1 Activity in Azole Antifungal Tolerant *Cryptococcus neoformans* from AIDS Patients." *FEBS Letters* 368 (2) (July 17): 326–330.
- Langfelder, Kim, Martin Streibel, Bernhard Jahn, Gerhard Haase, and Axel A Brakhage. 2003. "Biosynthesis of Fungal Melanins and Their Importance for Human Pathogenic Fungi." *Fungal Genetics and Biology: FG & B* 38 (2) (March): 143–158.
- Lazera MS, Gutierrez Galhardo MC, Cavalcanti MAS, and Wanke B. 2005. Criptococose. In: Coura, José Rodrigues (Ed.). *Dinâmica Das Doenças Infecciosas E Parasitárias*. 1. ed. Vol. II, p. 1223–1235.
- Leenders, A C, P Reiss, P Portegies, K Clezy, W C Hop, J Hoy, J C Borleffs, et al. 1997. "Liposomal Amphotericin B (AmBisome) Compared with Amphotericin B Both Followed by Oral Fluconazole in the Treatment of AIDS-Associated Cryptococcal Meningitis." *AIDS (London, England)* 11 (12) (October): 1463–1471.
- Lipp, Hans-Peter. 2008. "Antifungal Agents--Clinical Pharmacokinetics and Drug Interactions." *Mycoses* 51 Suppl 1: 7–18. doi:10.1111/j.1439-0507.2008.01523.x.
- Liu, Tong-Bao, Yina Wang, Gregory M Baker, Hany Fahmy, Linghuo Jiang, and Chaoyang Xue. 2013. "The Glucose Sensor-like Protein Hxs1 Is a High-Affinity Glucose Transporter and Required for Virulence in *Cryptococcus neoformans*." *PloS One* 8 (5): e64239. doi:10.1371/journal.pone.0064239.
- Loyse, Angela, Tihana Bicanic, and Joseph N Jarvis. 2013. "Combination Antifungal Therapy for Cryptococcal Meningitis." *The New England Journal of Medicine* 368 (26) (June 27): 2522. doi:10.1056/NEJMc1305981#SA1.
- Malcom D. Richardson, David W. Warnock. 1997. *Fungal Infection Diagnosis and Management*,. second. Nexstar Pharmaceuticals. Second Edition. Osney Mead, OxfordOX2 0 EL 25 john Street, LondonWC1 2BL: Blackkwell Science.
- Martins LMS,. 2003. "Epidemiologia Da Criptococose Em Crianças E Adultos Jovens E Diversidade de *Cryptococcus Neoformans* No Meio Norte Do Brasil." Dissertação [Mestrado em Biologia Parasitária], RJ: Instituto Oswaldo Cruz FIOCRUZ;

- Mavrogiorgos, Nikolaos, Oscar Zaragoza, Arturo Casadevall, and Joshua D Nosanchuk. 2006. "Efficacy of Voriconazole in Experimental *Cryptococcus neoformans* Infection." *Mycopathologia* 162 (2) (August): 111–114. doi:10.1007/s11046-006-0039-4.
- Mednick, Aron J, Joshua D Nosanchuk, and Arturo Casadevall. 2005. "Melanization of *Cryptococcus neoformans* Affects Lung Inflammatory Responses during Cryptococcal Infection." *Infection and Immunity* 73 (4) (April): 2012–2019. doi:10.1128/IAI.73.4.2012-2019.2005.
- Meyer, W, K Marszewska, M Amirmostofian, R P Igreja, C Hardtke, K Methling, M A Viviani, et al. 1999. "Molecular Typing of Global Isolates of *Cryptococcus neoformans* Var. *neoformans* by Polymerase Chain Reaction Fingerprinting and Randomly Amplified Polymorphic DNA—a Pilot Study to Standardize Techniques on Which to Base a Detailed Epidemiological Survey." *Electrophoresis* 20 (8) (June): 1790–1799. doi:10.1002/(SICI)1522-2683(19990101)20:8<1790::AID-ELPS1790>3.0.CO;2-2.
- Meyer, W., A. Castañeda, S. Jackson, M. Huynh, E. Castañeda, and others. 2003. "Molecular Typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* Isolates." *Emerging Infectious Diseases* 9 (2): 189.
- Meyer, W., A. Castañeda, S. Jackson, M. Huynh, E. Castañeda, and others. 2003. "Molecular Typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* Isolates." *Emerging Infectious Diseases* 9 (2): 189.
- Millard, P J, B L Roth, H P Thi, S T Yue, and R P Haugland. 1997a. "Development of the FUN-1 Family of Fluorescent Probes for Vacuole Labeling and Viability Testing of Yeasts." *Applied and Environmental Microbiology* 63 (7) (July): 2897–2905.
- . 1997b. "Development of the FUN-1 Family of Fluorescent Probes for Vacuole Labeling and Viability Testing of Yeasts." *Applied and Environmental Microbiology* 63 (7) (July): 2897–2905.
- Ministério da Saúde Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância Epidemiológica., and Cordenção geral de doenças transmissíveis unidade de vigilância das doenças de transmissão respiratória e imunopreveníveis. 2012. "Epidemiológica Da Criptococose." Brasília, DF. Abril de. http://www.sgc.goias.gov.br/upload/arquivos/2012-05/proposta_ve-criptococose1.pdf.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE., Coordenação e Revisão: Paula Pimenta de Souza, Tânia Cristina Gimenes Ferreira, Vera Lucia Luiza (ENSP/FIOCRUZ). 2010. "Secretaria de Vigilância Em Saúde Departamento de DST, Aids E Hepatites Virais Protocolos de

Assistência Farmacêutica Em DST/HIV/Aids Série A.” Normas e Manuais Técnicos. Brasília – DF. http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/protocolo_assistencia_farmaceutica_aids.pdf.

- Mitchell, T G, and J R Perfect. 1995. “Cryptococcosis in the Era of AIDS--100 Years after the Discovery of *Cryptococcus neoformans*.” *Clinical Microbiology Reviews* 8 (4) (October): 515–548.
- Moraes, E M P, N S Prímola, and Júnia Soares Hamdan. 2003. “Antifungal Susceptibility of Clinical and Environmental Isolates of *Cryptococcus neoformans* to Four Antifungal Drugs Determined by Two Techniques.” *Mycoses* 46 (5-6) (June): 164–168.
- Morales, Bernardina Penarrieta, Ivan Neves Junior, Luciana Trilles, Alvaro Luiz Bertho, Raquel De Vasconcellos Carvalhaes De Oliveira, Marília Martins Nishikawa, Mônica Dos Santos Elias, Bodo Wanke, and Márcia Dos Santos Lazéra. 2013. “Determination of the Minimum Inhibitory Concentration of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* against Fluconazole by Flow Cytometry.” *Medical Mycology: Official Publication of the International Society for Human and Animal Mycology* (July 1). doi:10.3109/13693786.2013.806827.
- Morales BP,. 2009. “*Cryptococcus gattii* Frente a Drogas Antifúngicas Pela Citometria de Fluxo”. Dissertação [Dissertação Curso de Pós- Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas] – IPEC-FIOCRUZ.
- Moran, G P, D J Sullivan, M C Henman, C E McCreary, B J Harrington, D B Shanley, and D C Coleman. 1997. “Antifungal Drug Susceptibilities of Oral Candida Dubliniensis Isolates from Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Infected and Non-HIV-Infected Subjects and Generation of Stable Fluconazole-Resistant Derivatives in Vitro.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41 (3) (March): 617–623.
- Moreira, Tomaz de Aquino, Marcelo Simão Ferreira, Rosineide Marques Ribas, and Aécio Sebastião Borges. 2006. “[Cryptococcosis: clinical epidemiological laboratorial study and fungi varieties in 96 patients].” *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39 (3) (June): 255–258.
- Morschhäuser, Joachim. 2010. “Regulation of Multidrug Resistance in Pathogenic Fungi.” *Fungal Genetics and Biology: FG & B* 47 (2) (February): 94–106. doi:10.1016/j.fgb.2009.08.002.

- Negroni, Ricardo. 2012. "Cryptococcosis." *Clinics in Dermatology* 30 (6) (December): 599–609. doi:10.1016/j.clindermatol.2012.01.005.
- Ngamskulrungrroj, Popchai, Yun Chang, Bryan Hansen, Cliff Bugge, Elizabeth Fischer, and Kyung J. Kwon-Chung. 2012. "Characterization of the Chromosome 4 Genes That Affect Fluconazole-Induced Disomy Formation in *Cryptococcus neoformans*." Edited by Yong-Sun Bahn. *PLoS ONE* 7 (3) (March 7): e33022. doi:10.1371/journal.pone.0033022.
- Nguyen, M H, and C Y Yu. 1999. "Influence of Incubation Time, Inoculum Size, and Glucose Concentrations on Spectrophotometric Endpoint Determinations for Amphotericin B, Fluconazole, and Itraconazole." *Journal of Clinical Microbiology* 37 (1) (January): 141–145.
- Nonaka Cassiano Francisco Weege, George João Ferreira do Nascimento,. 2008. "*Candida dubliniensis*– Levedura Emergente Associada À Candidose Oral." *Revista de Odontologia Da UNESP*. 37 (2): 125–132.
- Nosanchuk, Joshua D, and Arturo Casadevall. 2003. "Budding of Melanized *Cryptococcus neoformans* in the Presence or Absence of L-Dopa." *Microbiology (Reading, England)* 149 (Pt 7) (July): 1945–1951.
- Odds, F C. 2003. "Synergy, Antagonism, and What the Chequerboard Puts between Them." *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52 (1) (July): 1. doi:10.1093/jac/dkg301.
- Okabayashi, Ken, Rui Kano, Shinichi Watanabe, and Atsuhiko Hasegawa. 2005. "Expression of Capsule-Associated Genes of *Cryptococcus neoformans*." *Mycopathologia* 160 (1) (August): 1–7. doi:10.1007/s11046-005-0139-6.
- Oliveira-Netto IC, Machado CC, Wagner MB, and Severo LC. 1993. "Meio Século de Criptococose No Brasil: Revisão de 308 Casos (1941-1992)." *Ambito Hospitalar Infectologia* 7: 5–16.
- Orfao, A, A Ruiz-Arguelles, F Lacombe, K Ault, G Basso, and M Danova. 1995. "Flow Cytometry: Its Applications in Hematology." *Haematologica* 80 (1) (February): 69–81.
- Osazuwa, Oghomwen Favour, Osilume Dirisu, and Evbaguehita Okuonghae. 2012. "Cryptococcal Antigenemia in Anti-Retroviral Naïve AIDS Patients: Prevalence and Its Association with CD4 Cell Count." *Acta Medica Iranica* 50 (5): 344–347.

- Park, Benjamin J, Kathleen A Wannemuehler, Barbara J Marston, Nelesh Govender, Peter G Pappas, and Tom M Chiller. 2009. "Estimation of the Current Global Burden of Cryptococcal Meningitis among Persons Living with HIV/AIDS." *AIDS (London, England)* 23 (4) (February 20): 525–530. doi:10.1097/QAD.0b013e328322ffac.
- Pedroso, Reginaldo dos Santos, Karen Regina Carim da Costa, Joseane Cristina Ferreira, and Regina Celia Candido. 2007. "[Evaluation of melanin production by *Cryptococcus* species in four different culture media]." *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 40 (5) (October): 566–568.
- Perfect, John R, William E Dismukes, Francoise Dromer, David L Goldman, John R Graybill, Richard J Hamill, Thomas S Harrison, et al. 2010. "Clinical Practice Guidelines for the Management of Cryptococcal Disease: 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America." *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 50 (3) (February 1): 291–322. doi:10.1086/649858.
- Peterson, J. F., M. A. Pfaller, D. J. Diekema, M. G. Rinaldi, K. M. Riebe, and N. A. Ledeboer. 2011. "Multicenter Comparison of the Vitek 2 Antifungal Susceptibility Test with the CLSI Broth Microdilution Reference Method for Testing Caspofungin, Micafungin, and Posaconazole against *Candida* Spp." *Journal of Clinical Microbiology* 49 (5): 1765–1771.
- Pfaller, M A, D J Diekema, G W Procop, and M G Rinaldi. 2007. "Multicenter Comparison of the VITEK 2 Antifungal Susceptibility Test with the CLSI Broth Microdilution Reference Method for Testing Amphotericin B, Flucytosine, and Voriconazole against *Candida* Spp." *Journal of Clinical Microbiology* 45 (11) (November): 3522–3528. doi:10.1128/JCM.00403-07.
- Pina-Vaz, C., S. Costa-de-Oliveira, A. G Rodrigues, and A. Espinel-Ingroff. 2005. "Comparison of Two Probes for Testing Susceptibilities of Pathogenic Yeasts to Voriconazole, Itraconazole, and Caspofungin by Flow Cytometry." *Journal of Clinical Microbiology* 43 (9): 4674.
- Pina-Vaz, Cidália, Sofia Costa-de-Oliveira, Acácio G Rodrigues, and Ana Espinel-Ingroff. 2005. "Comparison of Two Probes for Testing Susceptibilities of Pathogenic Yeasts to Voriconazole, Itraconazole, and Caspofungin by Flow Cytometry." *Journal of Clinical Microbiology* 43 (9) (September): 4674–4679. doi:10.1128/JCM.43.9.4674-4679.2005.
- Pina-Vaz, Cidália, and Acácio Gonçalves Rodrigues. 2010a. "Evaluation of Antifungal Susceptibility Using Flow Cytometry." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 638: 281–289. doi:10.1007/978-1-60761-611-5_21.

- . 2010b. “Evaluation of Antifungal Susceptibility Using Flow Cytometry.” *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 638: 281–289. doi:10.1007/978-1-60761-611-5_21.
- Pinto Júnior VL. “Criptococose Associada a Aids. Análise Da Casuística Do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas-FIOCRUZ Entre 1987 E 2002.” Dissertação [Mestrado], Rio de Janeiro,: Instituto Oswaldo Cruz FIOCRUZ, 2003.
- Posteraro, Brunella, Maurizio Sanguinetti, Dominique Sanglard, Marilena La Sorda, Stefania Boccia, Lucio Romano, Giulia Morace, and Giovanni Fadda. 2003. “Identification and Characterization of a *Cryptococcus neoformans* ATP Binding Cassette (ABC) Transporter-Encoding Gene, CnAFR1, Involved in the Resistance to Fluconazole.” *Molecular Microbiology* 47 (2) (January): 357–371.
- Prudêncio, C, F Sansonetty, M J Sousa, M Côrte-Real, and C Leão. 2000. “Rapid Detection of Efflux Pumps and Their Relation with Drug Resistance in Yeast Cells.” *Cytometry* 39 (1) (January 1): 26–35.
- Ramani, R, and V Chaturvedi. 2000a. “Flow Cytometry Antifungal Susceptibility Testing of Pathogenic Yeasts Other than *Candida albicans* and Comparison with the NCCLS Broth Microdilution Test.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44 (10) (October): 2752–2758.
- Ramani, R., and V. Chaturvedi. 2000b. “Flow Cytometry Antifungal Susceptibility Testing of Pathogenic Yeasts Other than *Candida albicans* and Comparison with the NCCLS Broth Microdilution Test.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44 (10): 2752.
- Ramani, R., M. Gangwar, and V. Chaturvedi. 2003. “Flow Cytometry Antifungal Susceptibility Testing of *Aspergillus fumigatus* and Comparison of Mode of Action of Voriconazole Vis-a-Vis Amphotericin B and Itraconazole.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47 (11): 3627.
- Ramani, R., A. Ramani, and S. J Wong. 1997. “Rapid Flow Cytometric Susceptibility Testing of *Candida albicans*.” *Journal of Clinical Microbiology* 35 (9): 2320.
- Revankar, S G, W R Kirkpatrick, R K McAtee, A W Fothergill, S W Redding, M G Rinaldi, and T F Patterson. 1998. “Interpretation of Trailing Endpoints in Antifungal Susceptibility Testing by the National Committee for Clinical Laboratory Standards Method.” *Journal of Clinical Microbiology* 36 (1) (January): 153–156.

- Ribeiro, Mariceli Araujo, and Popchai Ngamskulrungrroj. 2008. "Molecular Characterization of Environmental *Cryptococcus Neoformans* Isolated in Vitoria, ES, Brazil." *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 50 (6) (December): 315–320.
- Rivera, J, M Feldmesser, M Cammer, and A Casadevall. 1998. "Organ-Dependent Variation of Capsule Thickness in *Cryptococcus neoformans* during Experimental Murine Infection." *Infection and Immunity* 66 (10) (October): 5027–5030.
- Rodero, Laura, Emilia Mellado, A Carolina Rodriguez, Angela Salve, Liliana Guelfand, Pedro Cahn, Manuel Cuenca-Estrella, Graciela Davel, and Juan L Rodriguez-Tudela. 2003. "G484S Amino Acid Substitution in Lanosterol 14-Alpha Demethylase (ERG11) Is Related to Fluconazole Resistance in a Recurrent *Cryptococcus neoformans* Clinical Isolate." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47 (11) (November): 3653–3656.
- Rodríguez-Tudela, J L, F Martín-Díez, M Cuenca-Estrella, L Rodero, Y Carpintero, and B Gorgojo. 2000. "Influence of Shaking on Antifungal Susceptibility Testing of *Cryptococcus neoformans*: A Comparison of the NCCLS Standard M27A Medium, Buffered Yeast Nitrogen Base, and RPMI-2% Glucose." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44 (2) (February): 400–404.
- Rozenbaum, R, and A J Gonçalves. 1994. "Clinical Epidemiological Study of 171 Cases of Cryptococcosis." *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 18 (3) (March): 369–380.
- Rudensky, Bernard, Ellen Broidie, Amos M Yinnon, Tanya Weitzman, Esther Paz, Nathan Keller, and David Raveh. 2005. "Rapid Flow-Cytometric Susceptibility Testing of *Candida* Species." *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 55 (1) (January): 106–109. doi:10.1093/jac/dkh492.
- Ruíz-Cendoya, Mery, M Mar Rodriguez, Marçal Mariné, F Javier Pastor, and Josep Guarro. 2008. "In Vitro Interactions of Itraconazole and Micafungin against Clinically Important Filamentous Fungi." *International Journal of Antimicrobial Agents* 32 (5) (November): 418–420. doi:10.1016/j.ijantimicag.2008.05.015.
- Saag, M S, R J Graybill, R A Larsen, P G Pappas, J R Perfect, W G Powderly, J D Sobel, and W E Dismukes. 2000. "Practice Guidelines for the Management of Cryptococcal Disease. Infectious Diseases Society of America." *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 30 (4) (April): 710–718. doi:10.1086/313757.

- Saag, M S, W G Powderly, G A Cloud, P Robinson, M H Grieco, P K Sharkey, S E Thompson, A M Sugar, C U Tuazon, and J F Fisher. 1992. "Comparison of Amphotericin B with Fluconazole in the Treatment of Acute AIDS-Associated Cryptococcal Meningitis. The NIAID Mycoses Study Group and the AIDS Clinical Trials Group." *The New England Journal of Medicine* 326 (2) (January 9): 83–89. doi:10.1056/NEJM199201093260202.
- Salas, S. D., J. E. Bennett, K. J. Kwon-Chung, J. R. Perfect, and P. R. Williamson. 1996. "Effect of the Laccase Gene CNLAC1, on Virulence of *Cryptococcus neoformans*." *The Journal of Experimental Medicine* 184 (2): 377.
- Sande, M.A.; Mandell, G.L. Drogas antimicrobianas, Valerie J. 1987. Drogas Antimicóticas E Antivirais. In: *Goodman, L.; Gilman, A.G. As Bases Farmacológicas Da Terapêutica*. Guanabara.
- Sanglard, Dominique. 2002. "Clinical Relevance of Mechanisms of Antifungal Drug Resistance in Yeasts." *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica* 20 (9) (November): 462–469; quiz 470, 479.
- Santos, Wallace Raimundo A dos, Wieland Meyer, Bodo Wanke, Solange P S Evangelista Costa, Luciana Trilles, Jose Luiz M do Nascimento, Rita Medeiros, et al. 2008. "Primary Endemic *Cryptococcosis gattii* by Molecular Type VGII in the State of Pará, Brazil." *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 103 (8) (December): 813–818.
- Santos LO. 2000. "Criptococose No Estado Do Amazonas: Estudo de 75 Casos Diagnosticados Na Fundação de Medicina Tropical/FMT/IMTM (1988-1998)." RJ: Rio de Janeiro. Dissertação [Mestrado] - Instituto Oswaldo Cruz FIOCRUZ.
- Schwarz, P., F. Dromer, O. Lortholary, and E. Dannaoui. 2006. "Efficacy of Amphotericin B in Combination with Flucytosine against Flucytosine-Susceptible or Flucytosine-Resistant Isolates of *Cryptococcus neoformans* during Disseminated Murine Cryptococcosis." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50 (1): 113–120.
- Schwarz, Patrick, Françoise Dromer, Olivier Lortholary, and Eric Dannaoui. 2006. "Efficacy of Amphotericin B in Combination with Flucytosine against Flucytosine-Susceptible or Flucytosine-Resistant Isolates of *Cryptococcus neoformans* during Disseminated Murine Cryptococcosis." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50 (1) (January): 113–120. doi:10.1128/AAC.50.1.113-120.2006.
- Secretaria de Vigilância em Saúde Ministério da Saúde. 2012. "Resposta + 2012. A Experiência Do Departamento de DST, Aids E Hepatites Virais." http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/periodicos/resposta_2012.pdf.

- Severo, L C, I Berta-E-Zardo, and A T Londero. 2001. "Cutaneous Cryptococcosis due to *Cryptococcus neoformans* Var. Gattii." *Revista Iberoamericana de Micología* 18 (4) (December): 200–201.
- Silva, Eriques Gonçalves, Claudete Rodrigues Paula, Amanda Latercia Tranches Dias, Marilene Rodrigues Chang, Luciana da Silva Ruiz, Valderez Gambale, Renato Araujo Prates, and Martha Simões Ribeiro. 2011. "Combination Efficacy of Voriconazole and Amphotericin B in the Experimental Disease in Immunodeficient Mice Caused by Fluconazole-Resistant *Cryptococcus neoformans*." *Mycopathologia* 171 (4) (April): 261–266. doi:10.1007/s11046-010-9375-5.
- Singh, Nina, Françoise Dromer, John R Perfect, and Olivier Lortholary. 2008. "Cryptococcosis in Solid Organ Transplant Recipients: Current State of the Science." *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 47 (10) (November 15): 1321–1327. doi:10.1086/592690.
- Sionov, Edward, Yun C Chang, H Martin Garraffo, Michael A Dolan, Mahmoud A Ghannoum, and Kyung J Kwon-Chung. 2012. "Identification of a *Cryptococcus neoformans* Cytochrome P450 Lanosterol 14 α -Demethylase (Erg11) Residue Critical for Differential Susceptibility between Fluconazole/voriconazole and Itraconazole/posaconazole." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56 (3) (March): 1162–1169. doi:10.1128/AAC.05502-11.
- Sionov, Edward, Yun C Chang, H Martin Garraffo, and Kyung J Kwon-Chung. 2009. "Heteroresistance to Fluconazole in *Cryptococcus neoformans* Is Intrinsic and Associated with Virulence." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53 (7) (July): 2804–2815. doi:10.1128/AAC.00295-09.
- Sionov, Edward, Hyeseung Lee, Yun C. Chang, and Kyung J. Kwon-Chung. 2010. "*Cryptococcus neoformans* Overcomes Stress of Azole Drugs by Formation of Disomy in Specific Multiple Chromosomes." Edited by Scott G. Filler. *PLoS Pathogens* 6 (4) (April 1): e1000848. doi:10.1371/journal.ppat.1000848.
- Sullivan, Derek J, Gary P Moran, Emmanuelle Pinjon, Asmaa Al-Mosaid, Cheryl Stokes, Claire Vaughan, and David C Coleman. 2004. "Comparison of the Epidemiology, Drug Resistance Mechanisms, and Virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*." *FEMS Yeast Research* 4 (4-5) (January): 369–376.
- Te Dorsthorst, D T A, P E Verweij, J Meletiadis, M Bergervoet, N C Punt, J F G M Meis, and J W Mouton. 2002a. "In Vitro Interaction of Flucytosine Combined with Amphotericin B or Fluconazole against Thirty-Five Yeast Isolates Determined by

- Both the Fractional Inhibitory Concentration Index and the Response Surface Approach.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46 (9) (September): 2982–2989.
- Te Dorsthorst, D. T. A., P. E. Verweij, J. Meletiadis, M. Bergervoet, N. C. Punt, J. Meis, and J. W. Mouton. 2002b. “In Vitro Interaction of Flucytosine Combined with Amphotericin B or Fluconazole against Thirty-Five Yeast Isolates Determined by Both the Fractional Inhibitory Concentration Index and the Response Surface Approach.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46 (9): 2982–2989.
- Tiphine, M, V Letscher-Bru, and R Herbrecht. 1999. “Amphotericin B and Its New Formulations: Pharmacologic Characteristics, Clinical Efficacy, and Tolerability.” *Transplant Infectious Disease: An Official Journal of the Transplantation Society* 1 (4) (December): 273–283.
- Tortora Gerard J, Berdell R Funke, Chistrine L Case. 2000. *Drogas Antimicrobianas.in Microbiologia*. 6a ed-. Porto Alegre: Artmed.
- Trilles, L., M. S Lazéra, B. Wanke, R. V Oliveira, G. G Barbosa, M. M Nishikawa, B. P Morales, and W. Meyer. 2008. “Regional Pattern of the Molecular Types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus Gattii* in Brazil.” *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 103 (5): 455–462.
- Trilles, L., W. Meyer, B. Wanke, J. Guarro, and M. Lazéra. 2011. “Correlation of Antifungal Susceptibility and Molecular Type within the *Cryptococcus neoformans/C. gattii* Species Complex.” *Medical Mycology* (0): 1–5.
- Trilles, Luciana, Belkys Fernández-Torres, Márcia dos Santos Lazéra, Bodo Wanke, and Josep Guarro. 2004. “In Vitro Antifungal Susceptibility of *Cryptococcus gattii*.” *Journal of Clinical Microbiology* 42 (10) (October): 4815–4817. doi:10.1128/JCM.42.10.4815-4817.2004.
- Trilles, Luciana, Márcia dos Santos Lazéra, Bodo Wanke, Raquel Vasconcelos Oliveira, Gláucia Gonçalves Barbosa, Marília Martins Nishikawa, Bernardina Penarrieta Morales, and Wieland Meyer. 2008. “Regional Pattern of the Molecular Types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil.” *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 103 (5) (August): 455–462.
- Trilles, Luciana, Wieland Meyer, Bodo Wanke, Josep Guarro, and Marcia Lazéra. 2011. “Correlation of Antifungal Susceptibility and Molecular Type within the *Cryptococcus neoformans/C. gattii* Species Complex.” *Medical Mycology: Official Publication of the International Society for Human and Animal Mycology* (August

- 23). doi:10.3109/13693786.2011.602126.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21859388>.
- . 2012. “Correlation of Antifungal Susceptibility and Molecular Type within the *Cryptococcus neoformans/C. gattii* Species Complex.” *Medical Mycology: Official Publication of the International Society for Human and Animal Mycology* 50 (3) (April): 328–332. doi:10.3109/13693786.2011.602126.
- Vale-Silva, Luís André, and Vladimír Buchta. 2006. “Antifungal Susceptibility Testing by Flow Cytometry: Is It the Future?” *Mycoses* 49 (4) (July): 261–273. doi:10.1111/j.1439-0507.2006.01243.x.
- Van Duin, D., A. Casadevall, and J. D. Nosanchuk. 2002. “Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* Reduces Their Susceptibilities to Amphotericin B and Caspofungin.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46 (11) (November 1): 3394–3400. doi:10.1128/AAC.46.11.3394-3400.2002.
- Van Duin, David, Arturo Casadevall, and Joshua D Nosanchuk. 2002. “Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma Capsulatum* Reduces Their Susceptibilities to Amphotericin B and Caspofungin.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46 (11) (November): 3394–3400.
- Vanden Bossche, H, F Dromer, I Improvisi, M Lozano-Chiu, J H Rex, and D Sanglard. 1998. “Antifungal Drug Resistance in Pathogenic Fungi.” *Medical Mycology: Official Publication of the International Society for Human and Animal Mycology* 36 Suppl 1: 119–128.
- Varma, A, and K J Kwon-Chung. 2010a. “Heteroresistance of *Cryptococcus gattii* to Fluconazole.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54 (6) (June): 2303–2311. doi:10.1128/AAC.00153-10.
- . 2010b. “Heteroresistance of *Cryptococcus gattii* to Fluconazole.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54 (6) (June): 2303–2311. doi:10.1128/AAC.00153-10.
- Wang, Qian, and Zhi-Feng Cui. 2011. “[Pleiotropic drug resistance ABC transporters in fungi].” *Yi chuan = Hereditas / Zhongguo yi chuan xue hui bian ji* 33 (10) (October): 1048–1056.
- Wickes BL, Mayorga ME, Edman U, and Edman JC. 1996. “Dimorphism and Haploid Fruiting in *Cryptococcus neoformans*: Association with the Alpha-Mating Type.” *Proc Natl Acad Sci U S A.* (14) (July 9): 7327–31.

- Williamson, P R. 1997a. "Laccase and Melanin in the Pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*." *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* 2: e99–107.
- . 1997b. "Laccase and Melanin in the Pathogenesis of *Cryptococcus Neoformans*." *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* 2: e99–107.
- Wingard, J R, P Kubilis, L Lee, G Yee, M White, L Walshe, R Bowden, E Anaissie, J Hiemenz, and J Lister. 1999. "Clinical Significance of Nephrotoxicity in Patients Treated with Amphotericin B for Suspected or Proven Aspergillosis." *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 29 (6) (December): 1402–1407. doi:10.1086/313498.
- Xie, Steve, Rahul Sao, Alex Braun, and Edward J Bottone. 2012. "Difference in *Cryptococcus neoformans* Cellular and Capsule Size in Sequential Pulmonary and Meningeal Infection: A Postmortem Study." *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 73 (1) (May): 49–52. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2012.01.008.
- Yamazumi, T, M A Pfaller, S A Messer, A K Houston, L Boyken, R J Hollis, I Furuta, and R N Jones. 2003a. "Characterization of Heteroresistance to Fluconazole among Clinical Isolates of *Cryptococcus neoformans*." *Journal of Clinical Microbiology* 41 (1) (January): 267–272.
- . 2003b. "Characterization of Heteroresistance to Fluconazole among Clinical Isolates of *Cryptococcus Neoformans*." *Journal of Clinical Microbiology* 41 (1) (January): 267–272.
- Zaragoza, Oscar, Marcio L Rodrigues, Magdia De Jesus, Susana Frases, Ekaterina Dadachova, and Arturo Casadevall. 2009. "The Capsule of the Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans*." *Advances in Applied Microbiology* 68: 133–216. doi:10.1016/S0065-2164(09)01204-0.
- Zhu, Xudong, and Peter R Williamson. 2004. "Role of Laccase in the Biology and Virulence of *Cryptococcus neoformans*." *FEMS Yeast Research* 5 (1) (October): 1–10. doi:10.1016/j.femsyr.2004.04.004.