



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

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

BERNARDINA PENARRIETA MORALES

**SUSCETIBILIDADE *IN VITRO* DE *Cryptococcus*
neoformans E *Cryptococcus gattii* FRENTE A DROGAS
ANTIFÚNGICAS PELA CITOMETRIA DE FLUXO**

Rio de Janeiro

2009

Suscetibilidade *in vitro* de *Cryptococcus neoformans* e
Cryptococcus gattii frente a drogas antifúngicas pela citometria de
fluxo

BERNARDINA PENARRIETA MORALES

Dissertação apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em
Doenças Infecciosas do Instituto de
Pesquisa Clínica Evandro Chagas para
obtenção do grau de Mestre em
Pesquisa Clínica em Doenças
Infecciosas.
Orientadoras: Márcia dos Santos
Lazéra e Luciana Trilles

Rio de Janeiro

2009



Suscetibilidade *in vitro* de *Cryptococcus neoformans* e
Cryptococcus gattii frente a drogas antifúngicas pela citometria de
fluxo

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para grau de Mestre em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas.

Orientadoras: Márcia dos Santos Lazéra
e Luciana Trilles

Aprovada em: / / 2009.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Sergio Eduardo Longo Fracalanza I MPPG/UFRJ.
Doutor em Ciências (Microbiologia) Pela Universidade Federal de Rio de Janeiro.
(Revisor e Presidente).

Dr. Paulo Murillo Neufeld – Instituto de Farmácia/UFRJ. Doutor em Vigilância Sanitária
(FIOCRUZ) (Membro)

Dr. Ricardo Pereira Igreja UFRJ.
Doutor em Medicina (Doenças Infecciosas e Parasitárias) pela Universidade Federal do Rio de Janeiro. (Membro)

Dra. Cynthia Horn IPEC / FIOCRUZ.
Doutora em Ciências pela Fundação Oswaldo Cruz. (Suplente)

Dedicatória.

Ao Grande *EU SOU* por essa vitória alcançada.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC – FIOCRUZ) que contribuiu para minha formação.

À minha família pelo apoio, carinho e compreensão nos momentos de ausência, muito obrigada. (Ao primogênito CHARLES BRUNO, à caçulinha BRUNA VITÓRIA e meu marido CESAR AUGUSTO).

À Dra. Márcia Lazéra e Luciana Trilles muito obrigada pela orientação e compreensão.

Ao Dr. Bodo Wanke obrigada pelo incentivo constante e colaboração.

Ao Chefe do Serviço de Integração de Laboratórios e Doutorando Ivan Neves Junior pelo treinamento na citometria de fluxo e por tornar reais os testes realizados no citômetro de fluxo.

Ao Dr. Fracalanza por aceitar revisar meus relatórios para seminários 2 e 3 do curso de pós-graduação, muito obrigada também por aceitar ser o revisor e presidente da banca.

Agradeço a Liline Martins por me enviar o material bibliográfico de testes de sensibilidade *in vitro*.

À Marília Martins Nishikawa, muito obrigada pela atenção, carinho e compreensão que ao longo de vários anos contribuiu para o meu crescimento, e por me ajudar a dar os primeiros passos na preparação de drogas antifúngicas e testes de sensibilidade *in vitro*.

À Msc (doutoranda). Raquel Vasconcellos Carvalhaes de Oliveira pela orientação na análise estatística.

Aos meus colegas de turma do mestrado no IPEC, que durante o curso compartilham angústias, tristezas e alegrias, obrigada pelo companheirismo em especial às minhas amigas Luanda, Andressa e Cibele, Jamira, Juliana, Regina e Ana Ruas pelo carinho.

À Mônica Elias, pela colaboração nos trabalhos de bancada na fase final do trabalho, muito obrigada.

A Leonardo Barreto, obrigada pela ajuda na leitura no citômetro de fluxo.

A Dra. Glória Boneccini, Andreia e Márcio do laboratório de imunologia, pela paciência e permitir o uso do Citômetro de fluxo.

A Charles Bruno Penarrieta Trujillo, meu filho, pela paciência e ajuda na montagem das tabelas no Excel.

A todos que, de uma forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.

Morales, Bernardina Penarrieta. **Suscetibilidade *in vitro* de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* frente a drogas antifúngicas pela citometria de fluxo.** Rio de Janeiro, 2009. 49 f. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças infecciosas] – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

RESUMO

Cryptococcus neoformans (*C. n*) e *Cryptococcus gattii* (*C. g*) são agentes da criptococose. A carência de publicações sobre teste de suscetibilidade de *C. n* e principalmente de *C. g* é evidente. A maioria de isolados clínicos de *C. g* mostra-se suscetível *in vitro* a fluconazol e itraconazol; no entanto o surgimento de resistência a drogas antifúngicas incentivou os testes de suscetibilidade *in vitro*. Como consequência, *Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI*, anteriormente *National Committee for Clinical Laboratory Standards – NCCLS*, publicaram metodologia padronizada M27-A2 para alcançar reprodutibilidade e permitir a comparação de resultados de suscetibilidade entre laboratórios, porém alguns problemas como o tempo de incubação e o padrão de leitura levaram à busca de técnicas alternativas, tais como a citometria de fluxo. O objetivo deste trabalho é padronizar a técnica de citometria de fluxo para o teste de suscetibilidade *in vitro* de *C. n* e *C. g*, visando a redução do tempo de incubação, a utilização de leitura automatizada e a obtenção de resultados rápidos e reprodutíveis. A concentração inibitória mínima (CIM) de 20 isolados de *C. n* e 21 de *C. g* foi determinada por citometria de fluxo e os resultados comparados com o protocolo padrão proposto pelo CLSI/M27A-2. Após duas horas de incubação com anfotericina B utilizando FUN-1, *C. gattii* resultou em 100% de concordância entre as duas técnicas para diluição de 2µg/mL e 95,2% para 1µg/mL e *C. neoformans* resultou em 100% de concordância para 1 e 2µg/mL. Para azólicos e flucitosina, foram obtidos resultados reprodutíveis com o fluorocromo *Acridine Orange* após 18 horas de incubação, que resultou em 78% de concordância entre as duas técnicas para fluconazol, 85% para itraconazol e 97% para flucitosina. Em ambas as metodologias, *C. gattii* foi menos suscetível do que *C. neoformans* frente ao itraconazol e flucitosina ($p < 0,05$). A citometria de fluxo é uma ferramenta útil, com potencial para testes *in vitro* e determinação da CIM dos antifúngicos estudados, com apreciável redução do tempo mínimo para obtenção de resultados.

Palavras- Chave: 1. Antifungal susceptibility. 2. *Cryptococcus neoformans*. 3. *Cryptococcus gattii*. 4. Flow Cytometry.

Morales Bernardina Penarrieta. **In vitro susceptibility of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* against antifungal drugs by flow cytometry.** Rio de Janeiro, 2009. 49 f
Master [Science dissertation in Clinical research in Infectious Diseases] - Instituto de Pesquisa
Clínica Evandro Chagas.

ABSTRACT

Cryptococcus neoformans (*C.n*) and *Cryptococcus gattii* (*C.g*) are the agents of cryptococcosis. The lack of publications on susceptibility tests of *C.n* and especially *C.g* is evident. Most clinical isolates of *C.g* proved to be susceptible *in vitro* to fluconazole and itraconazole and yet the emergence of resistance to antifungal drugs encouraged susceptibility testing *in vitro*. As a consequence, *Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI (National Committee for Clinical Laboratory Standards – NCCLS)* published standardized methodology to achieve reproducibility and allow comparison of susceptibility results between laboratories (M27-A2 document), however some problems of methodology, like incubation time and standard reading, led to the search for alternative techniques, such as flow cytometry. The objective of this work is to standardize the technique of flow cytometry to test the *in vitro* susceptibility of *C.n* and *C.g* in order to reduce the incubation time, use of automated reading and obtain fast and reproducible results. The minimum inhibitory concentration (MIC) of 20 isolates of *C.n* and 21 of *C.g* was determined by flow cytometry and the results compared with the standard protocol proposed by CLSI/M27A-2. Flow cytometry showed 100% agreement with CLSI/M27A-2 results for 2µg/mL and 95.2% for 1µg/mL dilution when *C.g* isolates were tested, and 100% agreement for 1 and 2µg/ml dilution when *C.n* were tested after two hours of incubation with amphotericin B using FUN-1. Reproducible results were obtained with fluorochrome Acridine Orange for azoles and flucytosine after 18 hours incubation, resulting in 78% agreement for fluconazole, 85% for itraconazole and 97% for flucytosine. *C.g* was less susceptible than *C.n* against itraconazole and flucytosine ($p < 0.05$) in both methodologies. Flow cytometry is a useful tool, with potential for *in vitro* susceptibility tests of the antifungal agents studied, with appreciable reduction in the minimum time for achieving results.

Palavras- Chave: 1. Antifungal susceptibility. 2. *Cryptococcus neoformans*. 3. *Cryptococcus gattii*. 4. Flow Cytometry.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANFOTERICINA B = AMB

ACRIDINE ORANGE = AO

CITOMETRIA DE FLUXO = CF

CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA = CIM

CONCENTRAÇÃO MÍNIMA LETAL = CML

FLUCONAZOL = FLC

ITRACONAZOL = ITC

5-FLUOROCITOSINA = 5-FC

[2-cloro-4-(2,3dihidro-3-metil-(benzo-1,3-thiazol-2-yl)-metilidene)-1phenylquinoliniumiodide]
= FUN-1.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA.1. Suporte para microplaca e espelho inclinado.....	21
FIGURA 2. CIM de seis isolados de <i>Cryptococcus</i> spp., <i>Candida krusei</i> e <i>Candida parapsilopsis</i> frente à AMB.....	22
FIGURA 3. CIM de seis isolados de <i>Cryptococcus</i> spp., <i>Candida krusei</i> e <i>Candida parapsilopsis</i> frente a 5-FC.....	23
FIGURA 4. CIM de seis isolados de <i>Cryptococcus</i> spp., <i>Candida krusei</i> e <i>Candida parapsilopsis</i> frente à FLC.....	24
FIGURA 5. CIM de seis isolados de <i>Cryptococcus</i> spp., <i>Candida krusei</i> e <i>Candida parapsilopsis</i> frente a 5-FC.....	25
FIGURA 6. Ilustração da Concentração Mínima Letal (CML) para a inibição de <i>Cryptococcus</i> spp. Os números dos quadrantes correspondem aos números dos orifícios da microplaca e suas concentrações correspondentes (dentro da caixa de texto).	27
<ul style="list-style-type: none"> • 6a. CML 4 µg/ml de ITC • 6b. CML >8µg/ml de ITC • 6c.CML >64µg/ml de FLC • 6d.CML CML 32 µg/ml de FLC • 6e. CML >64 µg/ml de 5-FC • 6f. CML 16 µg/ml de 5-FC • 6g. CML 0,5 µg/ml de AMB. 	

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Histórico.....	1
1.2 Criptococose.....	3
1.3 Fatores de Virulência.....	3
1.4 Ecologia.....	4
1.5 Epidemiologia.....	5
1.5.1 Criptococose no Brasil.....	6
1.6 Drogas Antifúngicas.....	7
1.7 Tratamento.....	8
1.8 Testes de Suscetibilidade aos Antifúngicos.....	9
1.9 Citometria de Fluxo.....	10
2. JUSTIFICATIVA.....	12
3. OBJETIVO GERAL.....	13
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
5. METODOLOGIA.....	14
5.1. Microrganismos.....	14
5.2. Drogas Antifúngicas.....	14
5.3. Preparo de Microdiluições.....	14
5.4. Preparo do Inóculo.....	16
5.5. Citometria de Fluxo e Teste de Suscetibilidade.....	17
5.6. Interpretação de Resultados.....	18
5.6.1. Microdiluição em caldo M27A-2.....	18
5.6.2. Avaliação da Concentração Mínima Letal (CML).....	24
5.6.3. Citometria de fluxo.....	24
5.6.3.1. Índice de suscetibilidade (IS).....	24
6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	24
7. ARTIGO Submetido.....	27-41
8. CONCLUSÕES.....	42
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA.....	43

1. INTRODUÇÃO

1.1 - Histórico

Cryptococcus foi incluído no grupo de microrganismos reconhecidos como algas devido ao seu crescimento pastoso formado de células redondas ou ovais com reprodução por brotamento, por Kurting em 1833. Em 1861, ZENKER observou em humano possível infecção micótica do sistema nervoso central (SNC). Em 1894, na Itália Sardenha, SANFELICE isolou de suco fermentado de pêssago um fungo leveduriforme e relacionou tais leveduras a tumores carcinogênicos; em 1895, demonstrou a patogenicidade deste fungo em cão, cobaio e galinha, denominando-o *Saccharomyces neoformans*. Em 1894, na Alemanha, BUSSE, patologista, e BUSCHKE, cirurgião, publicaram o isolamento de levedura de lesão de tibia de paciente com criptococose disseminada. Neste mesmo ano, BUSSE cultivou o microrganismo e o identificou como causador da micose, denominando-o *Saccharomyces* sp. Em 1901, VUILLEMIN estabeleceu as diferenças básicas entre os gêneros *Cryptococcus* e *Torulopsis*, re-classificando as amostras identificadas por SANFELICE e BUSSE no gênero *Cryptococcus* e especificando como *Cryptococcus hominis* a levedura de origem humana e *Cryptococcus neoformans* a de origem saprofítica. Em 1905, ocorreu a primeira descrição sugestiva de criptococose do sistema nervoso central; VON HANSEMAN descreveu levedura em cistos gelatinosos em meninge de indivíduo que faleceu com meningoencefalite. Em 1916, STODDART & CULTER descreveram as características clínicas da criptococose, além de rever casos de infecções fúngicas de sistema nervoso central, diferenciando esta infecção de outras no sistema nervoso, além de isolar o agente etiológico usando cultivos e inoculação animal. Como estes autores, não relacionaram seu achado aos achados de Busse e tampouco usaram a classificação de VUILLEMIN, denominaram seu achado como *Torula histolytica*.

Em 1940, existiam 75 casos descritos de criptococose, basicamente de sistema nervoso central. Em 1934, persistia a discordância na taxonomia. LODDER propôs o nome *Torulopsis neoformans* e BENHAM o de *Cryptococcus hominis*. Em 1948, o número de casos era crescente, o que permitiu esclarecer aspectos epidemiológicos, etiológicos e patogênicos da criptococose; havia relatos de infecção em animais, principalmente nos pulmões, e em granulomas nasais de cavalos.

Nessa época, já se acreditava que a criptococose se iniciava com lesão pulmonar regressiva em humanos. Em 1950, SKINNER determinou que a fermentação de açúcares fosse critério para

distinguir o gênero *Torulopsis* de *Cryptococcus*, para cepas fermentadoras e não fermentadoras respectivamente, e estabeleceu a nomenclatura definitiva da forma anamórfica (assexuada). Assim *Cryptococcus neoformans* foi caracterizada pela não assimilação de nitrato e lactose assimilação de galactose, glicose, maltose, sucrose, crescimento em temperatura de 37°C e a capacidade patogênica em camundongos (os dados do histórico relatados até aqui foram obtidos da seguinte revisão bibliográfica: Kwon-Chung & Bennett, 1992; Lazera, 1989; Lazera et al. 2005).

Cryptococcus neoformans, agente da criptococose, é um fungo zoopatógeno cosmopolita, classicamente dividido em duas variedades, *C. neoformans* var. *neoformans* e *C. neoformans* var. *gattii*. A partir de 1950, estabeleceu-se o gênero e espécie de *Cryptococcus neoformans* (Kwon-Chung KJ & Bennett, 1992). *Cryptococcus neoformans* apresenta cinco sorotipos determinados pela estrutura dos componentes capsulares, sorotipo C (Bhattacharjee et al. 1978), sorotipo D, (Bhattacharjee et al. 1979), sorotipo B (Bhattacharjee et al. 1980), sorotipo A (Cherniak et al.,1980) e sorotipo AD (Ikeda et al. 1985).

A estrutura química do polissacarídeo capsular do sorotipo AD é muito semelhante aos dos sorotipos A e D (Ikeda et al. 1985).

O gênero *Cryptococcus* é a forma anamórfica do heterobasidiomiceto *Filobasidiella neoformans* (var. *neoformans*) e *Filobasidiella bacillispora* (var. *gattii*). A reprodução sexuada é somente reproduzida *in vitro* em meios apropriados, em temperatura de 25 a 37°C, sendo controlada por sistema de um locus e dois alelos a e α (MAT a e MAT α) (Kwon-Chung et al. 1975).

Análises moleculares recentes, como estudos de polimorfismo de DNA por AFLP (amplified fragment length polymorphism), demonstram que a variedade *gattii* e a variedade *neoformans* devem ser reconhecidas como espécies distintas (Boekhout et al. 2001). A análise da sequência do espaçador intergênicas (IGS) associado com rDNA revelaram diferenças significativas na composição de nucleotídeos entre e dentro das variedades de *Cryptococcus neoformans* (Diaz et al. 2000). A variedade *gattii* constitui grupo monofilético distinto e divergente da variedade *neoformans*, constituindo espécies distintas: *C. neoformans* (sorotipos A, D e AD) e *Cryptococcus gattii* (sorotipos B e C) (Diaz et al. 2000, Kwon-Chung et al. 2006).

Em virtude desses resultados, utilizaremos a classificação filogenética atual, *C. neoformans* e *C. gattii*.

O teste de CGB (canavanina-glicina-azul de bromotimol) é o teste bioquímico mais confiável usado para diferenciar as espécies *C. gattii* e *C. neoformans*. *C. gattii* é naturalmente resistente a L-canavanina, pois a metaboliza em produtos não tóxicos, e utiliza a glicina como única fonte de carbono e nitrogênio, produzindo amônia, o que faz com que o pH 5.8 se eleve alterando a cor do meio, que originalmente é amarelo esverdeado, para azul cobalto ou azul esverdeado forte. Entretanto, a grande maioria das cepas *C. neoformans* são susceptíveis a L-canavanina e não podem assimilar a glicina como única fonte de carbono e nitrogênio, não crescendo no meio de CGB, portanto não alterando o pH, permanecendo a cor original do meio (Kwon-Chung et al. 1982).

1.2. Criptococose

A criptococose é micose sistêmica adquirida através da inalação de propágulos infectantes, basidiosporos ou leveduras desidratadas de *C. neoformans* ou *C. 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 principalmente em áreas tropicais e subtropicais, ocorre normalmente em hospedeiros aparentemente imunocompetentes, sendo causada principalmente por *C. gattii*. As duas espécies causam meningoencefalite de base acompanhada ou não de lesão pulmonar e fungemia de focos secundários para pele, ossos, rins, supra-renal, entre outros, podendo evoluir para formas graves e até fatais (Lazéra et al. 2005).

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 (Kwon-Chung & Rhodes, 1986). Além do mais, ambas as espécies são caracterizadas por possuir vias bioquímicas de biossíntese do manitol e de produção de proteinases (fosfolipases e ureases), que também são considerados fatores de virulência (Casadeval & Perfect, 1998).

A cápsula representa importante mecanismo de defesa da levedura através da inibição da fagocitose, migração de leucócitos, alteração da secreção de citocinas e bloqueio do sistema complemento do hospedeiro (Kozel, 1995). Mutantes hipocapsulares 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 as cepas selvagens.

Além do mais, a cápsula aumenta consideravelmente de tamanho dependendo dos diferentes sítios da infecção (Chang & Kwon Chung, 1994).

C. neoformans possui o gene CNLAC1 de cópia única que codifica a fenol-oxidase, enzima que catalisa a biossíntese da melanina, sendo observada a redução de virulência quando ocorre a deleção deste gene (Salas et al. 1996). A produção de melanina é observada em alguns fungos patogênicos. O gênero *Cryptococcus* possui um tipo particular de fenoloxidase, denominado lacase, estudo da função e regulação deste importante fator de virulência levou a uma 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 anular a ação dos anticorpos mediadores da fagocitose (Kwon-Chung & Rhodes, 1986; Williamson, 1997).

Quanto aos tipos sexuais do gênero *Cryptococcus* spp., o tipo sexualizado alpha demonstrou ser mais virulento do que o tipo sexualizado *a* (Kwon-Chung et al. 1992); sugerindo que o tipo alpha tem vantagem seletiva na sobrevivência ambiental (Wickes et al. 1996).

1.4. Ecologia

C. neoformans é um sapróbio cosmopolita, encontrado em vários substratos orgânicos. Tem sido estudado principalmente em ambientes urbanos, onde é clássica sua relação com habitat de diferentes espécies de aves gregárias e em cativo. Esses ambientes são ricos em fontes de nitrogênio, como creatinina e uréia, apresentando condições favoráveis ao crescimento abundante deste fungo (Passoni et al. 1998). Nestes habitats, o fungo atinge elevadas concentrações no substrato seco, constituindo microfocos, a partir dos quais propágulos se dispersam no ar e podem ser inalados, causando infecção regressiva ou doença (Kwon-Chung & Bennett, 1992).

Estudos realizados na África (Swinne et al. 1989) e no Brasil (Passoni et al. 1998) evidenciaram elevados índices de contaminação da poeira domiciliar e de amostras do peridomicílio, sugerindo que a exposição do homem ao fungo seja muito mais freqüente do que se pensa e faça parte de seu cotidiano.

Novo habitat natural foi descrito em diferentes regiões brasileiras, relacionado à madeira em decomposição em diferentes árvores tropicais, nativas ou introduzidas no Brasil, como cássia rosa (*Cassia grandis*), cássia amarela (*Senna multijuga*), ficus (*Ficus microcarpa*), jambolão (*Syzygium cumini*), cacauero (*Theobroma cacao*), cabori (*Miroxylum peruiferum*), sibipiruna (*Caesalpinia peltophoroides*) (Lazéra et al. 1993; 1996; 1998; 2000; Restrepo et al. 2000) e material vegetal de árvores do gênero *Eucalyptus* em centros urbanos freqüentado por um grande número de pessoas (Montenegro e Paula, 2000).

Até 1990, o habitat natural de *C. gattii* era desconhecido, quando a espécie foi isolada de restos de *Eucalyptus camaldulensis* no período de floração destas árvores (Ellis & Pfeiffer, 1990) na Austrália, sendo *C. gattii* desde então, associado a eucaliptos. Em estudo realizado em Teresina, esta espécie foi encontrada colonizando oco de oiti (*Moquilea tomentosa*), em praça no centro da cidade, (Lazéra et al. 1998). Este achado apontou pela primeira vez outra possível fonte saprofítica para *C. gattii* e correlaciona-se com achados de *C. neoformans* em ocos de árvores no Rio de Janeiro (Lazéra et al. 1993).

Novos dados de estudo na mesma região reafirmam a hipótese de que esses micro-ambientes representem um tipo de habitat natural, onde ambas as espécies do fungo podem ocorrer em natureza, aspecto novo na ecologia deste fungo (Lazéra et al. 1998; 2000; Montenegro e Paula, 2000, Fortes et al. 2001, Nishikawa et al. 2003). A associação específica de *C. gattii* com eucaliptos não é única, pois há diferentes padrões geográficos de ocorrência do fungo em madeira em decomposição, onde as espécies de *Cryptococcus* podem estar presentes (Lazera et al. 2000, Trilles et al. 2003, Nishikawa et al. 2003).

1.5. Epidemiologia

C. neoformans é predominantemente oportunista, cosmopolita, acompanha a prevalência dos casos de condição de risco, tais como aids, linfomas, leucemias, lúpus eritematoso, gravidez, transplante de órgãos sólidos, câncer, sarcoidose, doenças autoimunes, diabetes e tuberculose. O uso de medicamentos imunossupressores demonstrou ser outro fator agravante (Lazéra et al. 2005).

A análise de dados realizada pelo Ministério da Saúde mostra que dos 215.810 casos de aids notificados no Brasil entre 1980 e 2002, 6% apresentavam criptococose (Pappalardo e Melhem, 2003).

Esta forma da criptococose ocorre em todas as regiões brasileiras, principalmente nas regiões S, SE e CO (Oliveira-Neto et al. 1993; Pinto Júnior, 2003; Igreja et al. 2004; Fernandes et al. 2000; Casalli et al. 2003).

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 (Lazéra et al. 2005).

1.5.1 Criptococose no Brasil

Embora a taxa de mortalidade tenha sido reduzida de 9,7 em 1995 para 6,3 em 2003, a aids continua a ser a principal responsável pelo aumento de infecções oportunistas (Boletim Epidemiológico Aids, 2003). A partir de 1998 a criptococose associada a aids teve uma redução da taxa de incidência. No Brasil, em 2003, verificou-se uma taxa de 5,5 (a cada 100.000 hab.), sendo de 2,3, 7,5 e 8,5 para as regiões Nordeste, Sudeste e Sul, respectivamente (Boletim Epidemiológico AIDS, 2003).

Em estudo prospectivo realizado no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, entre março de 1998 e novembro de 2003, 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 morbi-mortalidade nos pacientes com aids. Neste estudo, *C. neoformans* foi mais freqüente 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 freqüência em adultos jovens e pessoas de meia idade, especialmente do sexo masculino (Gonçalves et al., 1994).

Apesar de ser mencionada a raridade de ocorrência de criptococose em crianças pré-púberes (Kwon-Chung KJ e Bennet JE. 1992), 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; Santos, 2000; Martins, 2003). Corrêa et al., (1999) observou casos de criptococose na infância, no período de janeiro de 1992 a abril de 1998, dentre 78 pacientes com criptococose que foram internados no Hospital Universitário João de

Barros Barreto, em Belém, Pará, dezenove eram crianças menores de 13 anos de idade, sendo que todos os pacientes apresentavam sinais e sintomas de envolvimento do sistema nervoso central. A espécie do agente etiológico foi pesquisada em nove pacientes, sendo identificado *C. gattii* em todas as amostras analisadas. Por este motivo ressaltou-se a necessidade de serem realizados estudos multicêntricos sobre a criptococose nas regiões Norte e Nordeste brasileiros, provavelmente áreas de alta endemicidade de infecções por *C. gattii* (Cavalcanti, 1997). Outro relato interessante foi de Severo et al. (2001), caso clínico de paciente adulto jovem, imunocompetente e infectado por *C. gattii*, na cidade de Porto Alegre.

Nishikawa e colaboradores (2003) descreveram 387 casos de criptococose em duas regiões geográficas do Brasil no período de 1987 a 1998. Tal estudo demonstrou que a criptococose causada por *C. neoformans* sorotipo A associada a aids foi representada na região SE por 98,3% (172 de 175 pacientes) e na região NE por 87,5% (28 de 31 pacientes) no entanto, ocorreram 53% (8 de 15 pacientes) sem aids na região SE e 9,75 (três de 31 pacientes) na região NE dos pacientes nas mesmas condições. A criptococose por sorotipo B foi claramente predominante na região NE com 87,5% (28 de 31pacientes sem aids) e 47% (7 de 15 pacientes sem aids) na região SE. Acredita-se que o surgimento de condições laboratoriais para o diagnóstico em diversas regiões e a diferenciação das espécies de *Cryptococcus* tenha favorecido o aumento da detecção da criptococose por *C. gattii*. Isso leva a concluir que os padrões geográficos da criptococose *gattii* podem estar sendo mais bem reconhecidos (Kidd et al. 2004).

1.6. Drogas Antifúngicas

Anfotericina B membro dos antibióticos poliênicos é o antifúngico mais comumente usado, sendo produzido por espécies de *Streptomyces* encontrados no solo. Ao combinar-se com esteróides da membrana plasmática do fungo aumenta excessivamente a permeabilidade levando-o a morte. O fator limitante para seu uso é a toxicidade para os rins (Tortora et al. 2000).

Os compostos azólicos fazem parte de um grupo de antifúngicos sintéticos e tem ação fungistática (Lipp, 2008). O mecanismo de ação destes consiste na inibição da enzima lanosterol-dimetilase, o que impede que o lanosterol se converta em ergosterol e causa aumento da permeabilidade celular alterando a estrutura e a função da membrana plasmática (Sanglard, 2002). 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 et al. 2000).

A pirimidina fluorada flucitosina ou 5-fluorocitosina possui um átomo de flúor no carbono 5, que é um anti-metabólito da base citosina e uracila que interfere com a síntese de DNA e RNA. Este antifúngico penetra na célula fúngica através de uma permease e, no citoplasma, a enzima citosina desaminase a converte em 5-fluoracil, sendo metabolizado em ácido 5-fluorodesoxiuridílico, e o 5-fluoracil substitui ao uracil na molécula de RNA, o que provoca alteração na síntese protéica. As células dos mamíferos não convertem grandes quantidades de 5-FC em 5-fluorouracil, o que determina a ação seletiva deste composto (Sande e Mandell, 1987). A toxicidade nos rins e na medula óssea é fator limitante para seu uso (Tortora et al. 2000). Os efeitos colaterais podem ser anemia, leucopenia e trombocitopenia, náuseas, vômitos, diarréia e enterocolite grave e hepatomegalia (Sande e Mandell, 1987).

1.7. Tratamento

Antes da introdução dos derivados azólicos, poucas alternativas de escolha eram disponíveis para as fungemias. 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 anfotericina B tornou-se a medicação de grande valor no tratamento da criptococose (Lacaz et al. 2002).

Na década de 1970, a 5-FC demonstrou atividade contra *C. neoformans*, mas o surgimento de resistência a esta droga estimulou a utilização da forma combinada com anfotericina B, que demonstrou melhor eficácia tanto em relação ao tempo de tratamento quanto ao prognóstico. Na década de 1980, surgiram os derivados azólicos fluconazol e itraconazol, os quais demonstraram atividade antifúngica no tecido cerebral. No entanto, tem sido observado que o fluconazol atravessa melhor a barreira hematoencefálica do que o itraconazol (Lazera et al. 2005).

As atuais diretrizes para o tratamento da criptococose estão baseadas em resultados de ensaio randomizado, publicado há uma década. A terapia inicial com 0,7mg/kg por dia foi associada ou não a 5-FC (100mg/dia) durante duas semanas, seguida por uma fase de consolidação de 8 semanas com FLC (400mg/dia) ou ITZ (400mg/dia) (Jarvis e Harrison, 2007).

Para o tratamento de pacientes com primeiro episódio de HIV-associada à meningite criptocócica, foi comparada a atividade de três agentes antifúngicos com doses diárias de: AMB

(0,7 mg / kg / dia); AMB mais 5-FC (100 mg / kg / dia); AMB mais fluconazol (400 mg diariamente) e tripla terapia (AMB+5-FC+FLC). Este estudo permitiu concluir que nas doses diárias mencionadas a atividade fungicida mais rápida ocorreu no tratamento de AMB e 5-FC combinadas, sendo que a adição de 5-FC permitiu observar uma menor proporção de pacientes com recaída e LCR estéril em menos de 2 semanas (Brouwer, et al. 2004). Outros estudos demonstraram que o aumento da dose de AMB para 1mg / kg por dia, associado à dosagem de 5-FC 100 mg / kg / dia, apresentou uma atividade fungicida significativamente maior e 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 um 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 nefrotóxico (Leenders et al. 1997). Outros autores realizaram estudos de combinações entre o azólico FLC e 5-FC com sucesso clínico em 10 semanas no tratamento da meningite criptocócica humana (Larse et al. 1994) e em modelo murino (Nguyen et al. 1997).

1.8.-Teste de Suscetibilidade aos Antifúngicos

The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), anteriormente conhecido como *National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)*, desenvolveu método de referência (Norma M27-A2) 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 a 72 horas para o gênero *Cryptococcus*. Este documento facilita a comparação de resultados entre diferentes laboratórios na determinação da suscetibilidade de leveduras (NCCLS, 2002).

The Antifungal Susceptibility testin 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 do tamanho do inóculo (cem vezes mais em relação a método NCCLS/CLSI) e incremento da concentração final de D-glicose para 2% (dez vezes mais 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 inter-laboratorial 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 da droga em meio sólido; 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).

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 algumas leveduras do 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; Arthinton – Skaggs et al. 2000). Por esse motivo padronizaram-se pontos de corte para leituras em 24 horas e 48 horas (NCCLS, 2002).

1.9-Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo tem sido usada para contagem e verificação de viabilidade celular, detecção da susceptibilidade de leveduras frente a agentes antifúngicos, análise de parâmetros celulares intrínsecos (constituintes celulares que possuem auto-fluorescência) como tamanho relativo da célula, complexidade relativa, enzimas e pigmentos fotossintéticos. Para os parâmetros celulares extrínsecos como DNA, RNA, proteínas, cálcio, pH intracelular, potencial de membrana plasmática e mitocondrial, estado redox da célula e fluidez da membrana é necessário o uso de fluorocromo para fixação e marcação de tais parâmetros (FW – Science, 2004). 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. (Dornelas, 2006). *Acridine Orange* (AO) também é utilizado em testes de suscetibilidade, o qual interage com DNA por intercalação e no RNA por atração eletrostática (Rudensky et al. 2005), sendo utilizado também para determinação do ciclo celular (Darzynkiewicz, 1990).

O fluorocromo [2-cloro-4-(2,3dihydro-3-methyl-(benzo-1,3-thiazol-2-yl)-methylidene)-1phenylquinoliniumiodide] (FUN-1) é um composto cianina assimétrica halogenada, permeável à membrana citoplasmática, pela qual passa passivamente independente da 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 brilhante, que representam estruturas cilíndricas intravacuolares, cuja intensidade aumenta progressivamente em células viáveis (Millard et al. 1997).

Para a análise dos resultados dos parâmetros e da susceptibilidade antifúngica é usado um software específico que permite a visualização de curvas de distribuição, histogramas mono-paramétricos e bi-paramétricos, além de dados com representação tri-dimensional onde o eixo XX representa a intensidade do parâmetro e o eixo YY o número de partículas analisadas (“Dot Plot”) (FW – Science, 2004).

Estudos recentes destacaram que a citometria de fluxo, combinada com o método M27-A2 e uso de fluorocromos é uma alternativa importante na análise da concentração inibitória mínima (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).

2. JUSTIFICATIVA

A carência de publicações sobre testes de suscetibilidade de *C. neoformans* e principalmente *C. gattii* é evidente. A maioria de isolados clínicos de *C. neoformans* mostra-se sensível *in vitro* a fluconazol e itraconazol; entretanto, há relatos de surgimento de isolados resistentes a 5-fluorocitosina. (Chin et al. 1989; Kantarcioglu et al. 2009).

C. gattii apresentou menor susceptibilidade *in vitro* a drogas antifúngicas do que *C. neoformans*, podendo ser um dos fatores relacionados à maior dificuldade de tratamento da criptococose causada por esta espécie (Trilles et al. 2004).

O surgimento de resistência a drogas antifúngicas trouxe uma grande importância aos testes de sensibilidade *in vitro*. Faz-se notória a preocupação com este fato, pois o CLSI-NCCLS e AFST-EUCAST publicaram metodologias padronizadas para alcançar reprodutibilidade e permitir a comparação de resultados de sensibilidade *in vitro* entre laboratórios. No entanto, alguns problemas surgiram envolvendo a metodologia e padrão de leitura pois, esta depende de períodos longos de incubação, no mínimo 24 horas (EUCAST) ou 24/48 horas para *Candida* spp e 72 horas para *Cryptococcus* spp (CLSI). Atualmente têm-se buscado metodologias alternativas como a citometria de fluxo. Esta técnica é baseada na análise de grande número de células fúngicas individuais, mostrando-se freqüentemente confiável com poucas horas de incubação (Vale-Silva & Buchta, 2006).

Diferentes fluorocromos são utilizados nos testes de citometria de fluxo e, no caso das leveduras, a experiência principal é com o gênero *Candida* (Rudensky et al. 2008, Gokahmetoglu, et al. 2003; Ramani et al. 1997; Kirk et al. 1997). Os experimentos utilizando amostragens mais significativas de *Cryptococcus* patogênicos são escassos. Ramani & Chaturvedi (2000) usaram 16 isolados em testes de CF empregando o iodeto de propídio(PI) e Pina Vaz et al. (2005) testaram 3 isolados com o FUN-1 como fluorocromo.

Testes realizados com *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp. demonstraram que a citometria de fluxo associada ao uso de fluorocromos são alternativa para obtenção de resultados na metodologia de microdiluição em caldo padronizado pelo CLSI para estudar a sensibilidade *in vitro*, proporcionando, assim, resultados rápidos e confiáveis (Pina – Vaz et al. 2005).

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar a reprodutibilidade e eficácia da técnica de citometria de fluxo para a determinação da suscetibilidade de *C. neoformans* e *C. gattii* de origem clínica frente a drogas antifúngicas em comparação ao protocolo padronizado de microdiluição em caldo do documento M27-A2 do NCCLS/CLSI.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar a técnica de citometria de fluxo para estudo de suscetibilidade antifúngica de *C. neoformans* e *C. gattii*.
- Determinar o perfil de suscetibilidade *in vitro* de *C. neoformans* e *C. gattii* usando anfotericina B, fluconazol, Itraconazol e 5-fluorocitosina.
- Avaliar a reprodutibilidade da técnica de citometria de fluxo como técnica para estudo de suscetibilidade antifúngica de *C. neoformans* e *C. gattii*.

5. METODOLOGIA

5.1. Microrganismos:

Um total de 45 cepas foram testadas neste trabalho, sendo 20 de *C. neoformans*, 21 de *C. gattii*, duas cepas controle [*C. parapsilopsis* INCQS 40038 (ATCC 22019), *C. krusei* INCQS 40147 (ATCC 6258)] duas cepas padrão [*C. neoformans* INCQS 40044 (ATCC 32045) e *C. gattii* INCQS 40141 (ATCC 56990)]. Todas as cepas de *C. neoformans* e *C. gattii* foram preservadas a -70°C em uma solução de glicerol a 15% (Sigma-Aldrich Inc., St Louis, USA) e estão depositadas na coleção de fungos patogênicos do IPEC/FIOCRUZ. A relação dos isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* utilizados no estudo está descrita nas tabelas 1 e 2. A confirmação do gênero e espécie foi verificada pela presença de fenol-oxidase em Agar Semente Niger (ASN), e através de teste bioquímico automatizado Vitek YBC (bioMérieux, Inc., Durham, USA) e pelo meio CGB (Kwon-Chung et al. 1982).

5.2. Drogas Antifúngicas:

Para a avaliação da suscetibilidade foram usadas drogas obtidas das seguintes procedências: derivados azólicos, fluconazol potência 100% (Sigma-Aldrich Inc., St Louis, USA) itraconazol potência 98% (Sigma-Aldrich Inc., St Louis, USA), derivado poliênico, anfotericina B potência 80% (Sigma-Aldrich Inc., St Louis, USA) e uma pirimidina fluorada 5-fluorocitosina potência 100% (Sigma-Aldrich Inc., St Louis, USA).

Foram preparadas soluções-estoque de anfotericina B e itraconazol em dimetilsulfóxido-DMSO 99,70% (Vetec Química Fina LTDA, Duque de Caxias, Brasil) e de 5-fluorocitosina e fluconazol em água destilada estéril. Estas soluções foram filtradas em membrana 0,22µm (Milipore) e estocadas a -70°C. A anfotericina B foi protegida da luz já que esta droga é fotolábil.

5.3 Preparação das Diluições:

As diluições das drogas foram preparadas em meio RPMI-1640 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), para concentração final, de 2%, o pH ajustado para 7,0 e esterilizado por filtração em membrana 0,22µm. Em seguida foram distribuídos 100µl em cada poço da microplaca, com exceção da primeira e da 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 anfotericina B e itraconazol, de 0,12 a 64µg/ml para 5-fluorocitosina e fluconazol 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 de fundo em U.

Tabela 1. Relação dos isolados de *Cryptococcus gattii* testados

*Nº original	Nº coleção de Fungos patogênicos (CFP)	Espécie
06B	12	<i>C. gattii</i>
24	14	<i>C. gattii</i>
31A	23	<i>C. gattii</i>
33A	25	<i>C. gattii</i>
34A	26	<i>C. gattii</i>
37A	29	<i>C. gattii</i>
38A	30	<i>C. gattii</i>
40A	32	<i>C. gattii</i>
46	37	<i>C. gattii</i>
48B	39	<i>C. gattii</i>
50B	41	<i>C. gattii</i>
51A	42	<i>C. gattii</i>
56A	47	<i>C. gattii</i>
57A	48	<i>C. gattii</i>
60B	51	<i>C. gattii</i>
77A	121	<i>C. gattii</i>
1395	122	<i>C. gattii</i>
LMM17	077	<i>C. gattii</i>
LMM901	079	<i>C. gattii</i>
LMM994	078	<i>C. gattii</i>
INCQS 40141 (ATCC56990)	136	<i>C. gattii</i>

*O número original corresponde à identificação fornecida pelo depositário.

Tabela 2. Relação dos isolados de *Cryptococcus neoformans* testados

*Nº original	Nº coleção de Fungos patogênicos(CFP)	Espécie
7B	13	<i>C. neoformans</i>
10	126	<i>C. neoformans</i>
29A	01	<i>C. neoformans</i>
30B	22	<i>C. neoformans</i>
39A	31	<i>C. neoformans</i>
43B	34	<i>C. neoformans</i>
45B	36	<i>C. neoformans</i>
47B	38	<i>C. neoformans</i>
49A	40	<i>C. neoformans</i>
52B	43	<i>C. neoformans</i>
54	45	<i>C. neoformans</i>
65B	127	<i>C. neoformans</i>
70B	128	<i>C. neoformans</i>
72A	129	<i>C. neoformans</i>
274	130	<i>C. neoformans</i>
527	131	<i>C. neoformans</i>
1045	132	<i>C. neoformans</i>
1392	133	<i>C. neoformans</i>
1937	134	<i>C. neoformans</i>
ATCC32045	135	<i>C. neoformans</i>
INCQS40044		

*Nº O número original corresponde à identificação fornecida pelo depositário.

5.4. Preparação do Inóculo:

As cepas preservadas em solução de glicerol 15% ou em *Skim-milk* -20°C (preservadas para uso e reativação a cada duas semanas) foram reativadas seguindo procedimento operacional padrão do laboratório através de inoculação em placas de Petri contendo meio Agar Semente de Níger (*Guizotia abyssinica*) (ASN). Após incubação a 35 °C por 48 horas, o crescimento foi transferido para tubos contendo Agar Sabouraud inclinado (SC) (Difco™ Laboratories, Mariland, EUA) para a realização de teste de confirmação do gênero através do sistema automático Vitek.

Para confirmação de espécie, foi inoculada uma pequena quantidade da massa fúngica no meio CGB (pH 5,8) com realização de 1ª leitura em de 48 horas e 2ª leitura em 120 horas.

Para preparação do inóculo, foram suspensas de duas a cinco colônias com diâmetro de aproximadamente 1 mm (com crescimento de 48 horas) em 5 mL de solução salina estéril (0,85% NaCl). Esta suspensão foi agitada em vórtex por 15 segundos e a densidade celular ajustada em

escala padrão McFarland 0,5 usando cartão de Wickerhand, para obtenção de suspensões de aproximadamente 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 as drogas previamente preparadas.

5.5. Citometria de Fluxo e Teste de Suscetibilidade:

As CIMs de fluconazol, itraconazol, fluorocitosina e anfotericina B foram determinadas por citometria de fluxo (*Beckman Coulter XL-MCL Flow cytometer. 488nm*). As drogas foram preparadas de acordo com o documento M27-A2 (NCCLS, 2002), reservadas em alíquotas de 300µl em microtubos estéreis a -70°C , por até seis meses, até o teste. Os intervalos das concentrações finais foram de 2 a 0.015µg/mL para anfotericina B, 0.5 a 0.06 µg/mL itraconazol, 32 a 0,25µg/mL para fluorocitosina e de 64 a 1.0µg/mL para fluconazol.

Para padronizar o teste de susceptibilidade no citômetro, foram testadas as cepas *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* e *Cryptococcus 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 usando cartão de Wickerhand, obtendo-se uma solução de aproximadamente 1×10^6 a 5×10^6 ufc/mL, sendo que 300 µL do inóculo são acrescentados aos 300 µL de solução da droga.

Em estudo piloto, foram testados diferentes tempos de incubação, com agitação a 500rpm, anteriormente à leitura por citometria de fluxo: 2h e 4h para anfotericina B e 4h, 8h, 12h e 18h para os azólicos e 5-fluorocitosina. Foi padronizado assim o tempo de incubação de 18 horas para todos os isolados com os antifúngicos azólicos e 5-fluorocitosina e, de 2 horas, para os testes com anfotericina B. Posteriormente, os isolados incubados com os azólicos e a 5-fluorocitosina foram corados com *Acridine Orange* (AO) (Sigma-Aldrich Inc., St Louis, USA) numa concentração final de 11mg/L (Bernard Rudensky, 2005) e, aqueles incubados com a anfotericina B foram corados com 0,5 µM de Fluorocromo 2-cloro-4-(2,3dihidro-3-metil-(benzo-1,3-thiazol-2-yl)-methylidene) 1phenylquinoliniumiodide FUN-1 (Pina-Vaz et al. 2005), ambos por aproximadamente 30 minutos em quarto escuro. Tanto para os testes utilizando FUN-1 quanto *Acridine Orange* foi preparado controle de células vivas e células mortas por formaldeído

(concentração final de 1%), e controle de células vivas sem fluorocromo. Aproximadamente 10.000 células individuais foram analisadas no citômetro de fluxo para os azólicos e fluorocitosina e, 30.000 células para anfotericina B. A programação do citômetro foi realizada em dispersão frontal (forward scatter) ganho 2.0 com ganho total de 3.82, 304 Volts; a dispersão lateral (side scatter) 20.0 com ganho total de 54.50, 575 volts; a emissão de fluorescência de (FL2) 575nm 959volts, ganho 1.0 e emissão de fluorescência (FL4) 675 nm 1138 Volts e ganho 1.0; com excitação de 488 nm.

5.6. Interpretação dos Resultados:

5.6.1. Microdiluição em caldo M27A-2

O teste *in vitro* foi analisado por leitura visual realizada com auxílio de suporte para microplaca e espelho inclinado (figura 1), após 72 horas de incubação a 35°C, sendo o crescimento fúngico 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 controle de crescimento (CC), isto é, 0% de inibição, 3 para 25% de inibição, 2 para 50% de inibição (CIM2), 1 para 75% de inibição e, 0 para ausência de crescimento fúngico (CIM0). Assim, a concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração do antifúngico capaz de inibir 50% (CIM2) do crescimento, para os azólicos e a fluorocitosina, sendo que para a anfotericina B foi considerado 100% de inibição de crescimento (CIM0). Em cada microplaca foram analisadas as cepas padrão, além de controle de esterilidade do meio RPMI 1640 e controle do crescimento do isolado, sem exposição ao antifúngico, como determinado pelo método M27-A2 (figuras 1a, 1b, 1c, 1d.).



FIGURA.1. Suporte para microplaca e espelho inclinado.

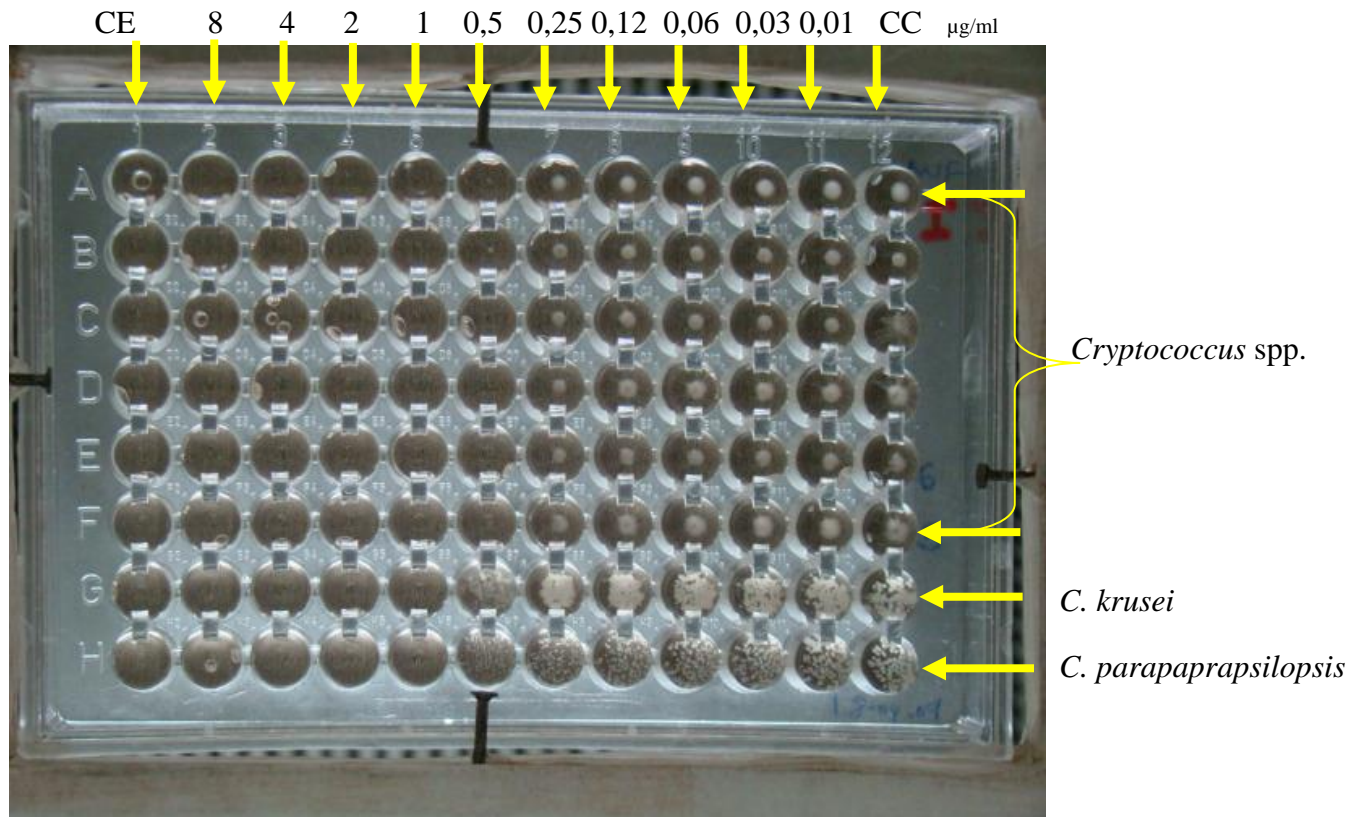


FIGURA 2. CIM de seis isolados de *Cryptococcus*, *Candida krusei* e *Candida parapsilopsis* frente à AMB.

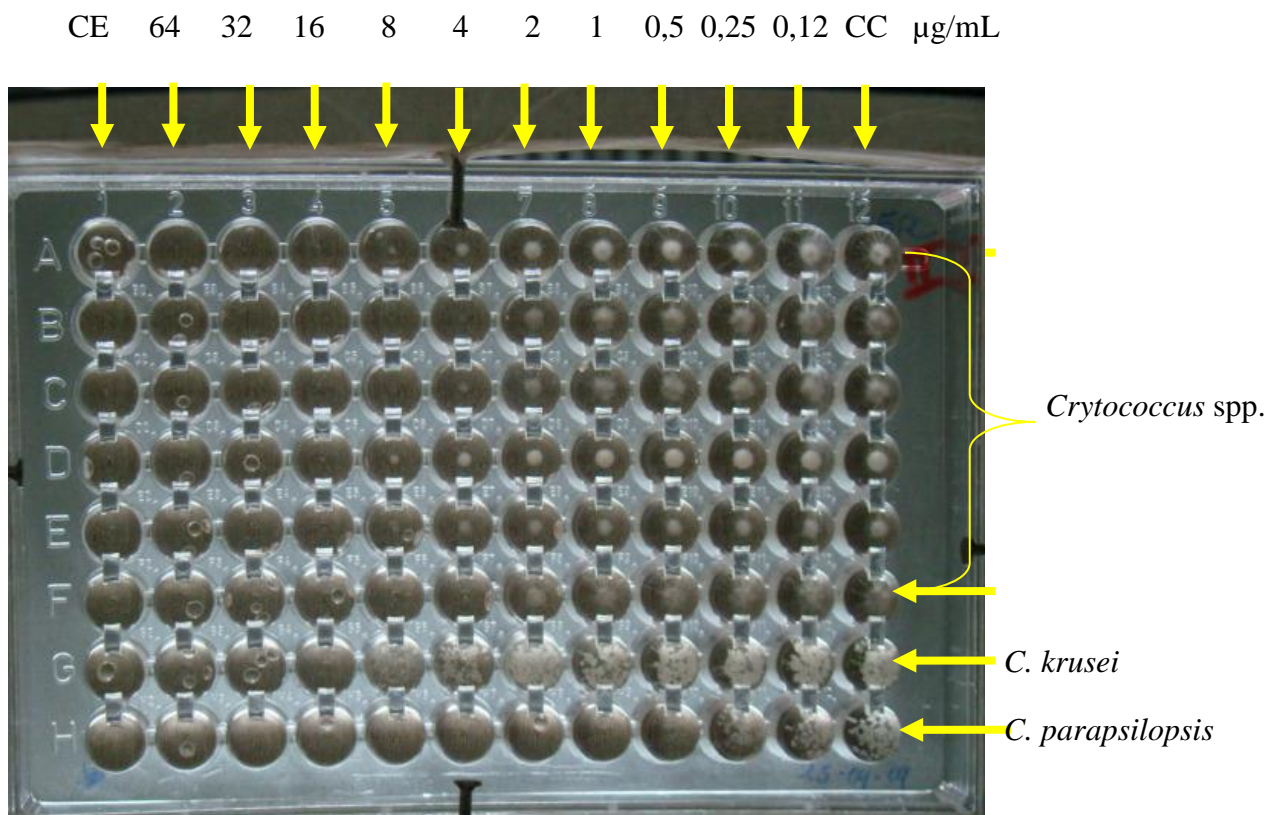


FIGURA 3. CIM de seis isolados de *Cryptococcus* spp., *Candida krusei* e *Candida parapsilopsis* frente a 5-FC.

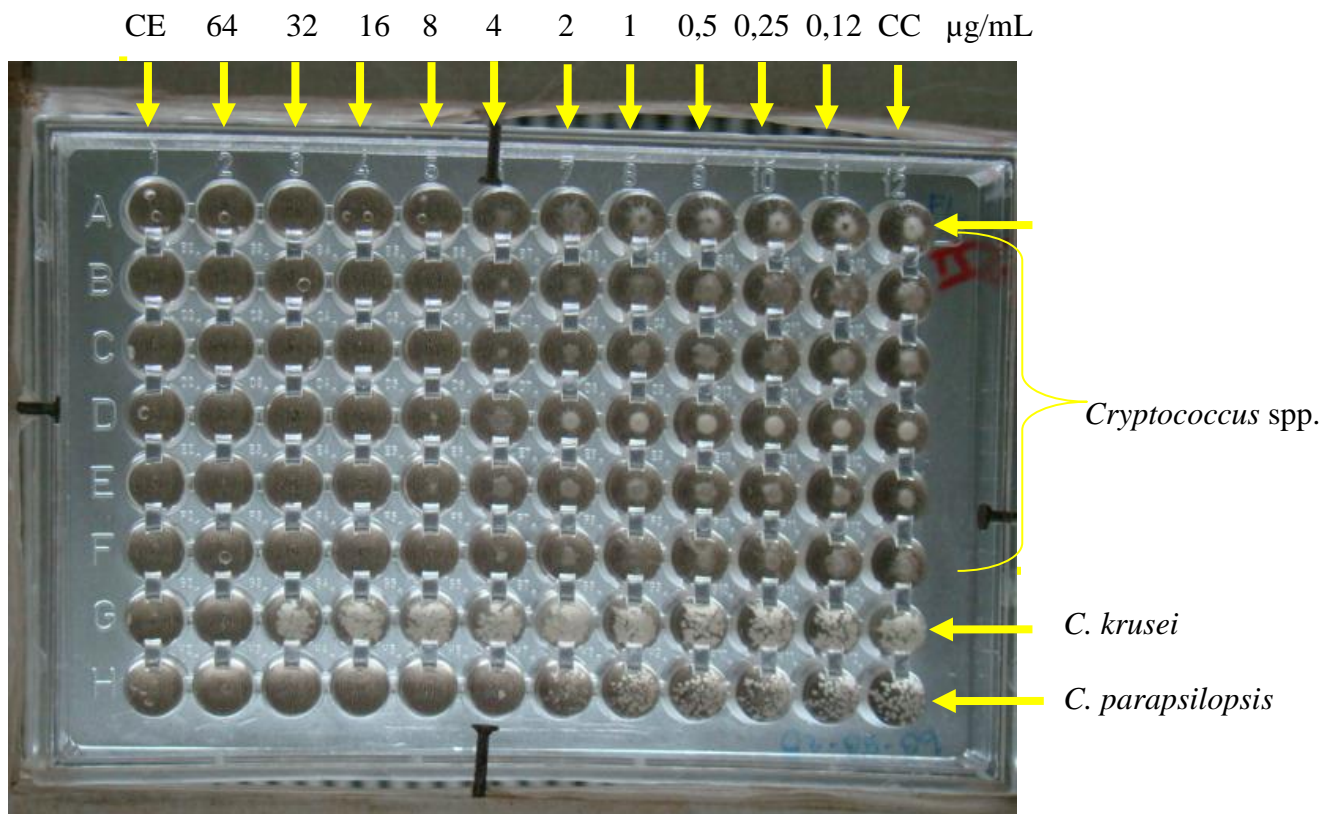


FIGURA 4. CIM de seis isolados de *Cryptococcus* spp., *Candida krusei* e *Candida parapsilopsis* frente à FLC.

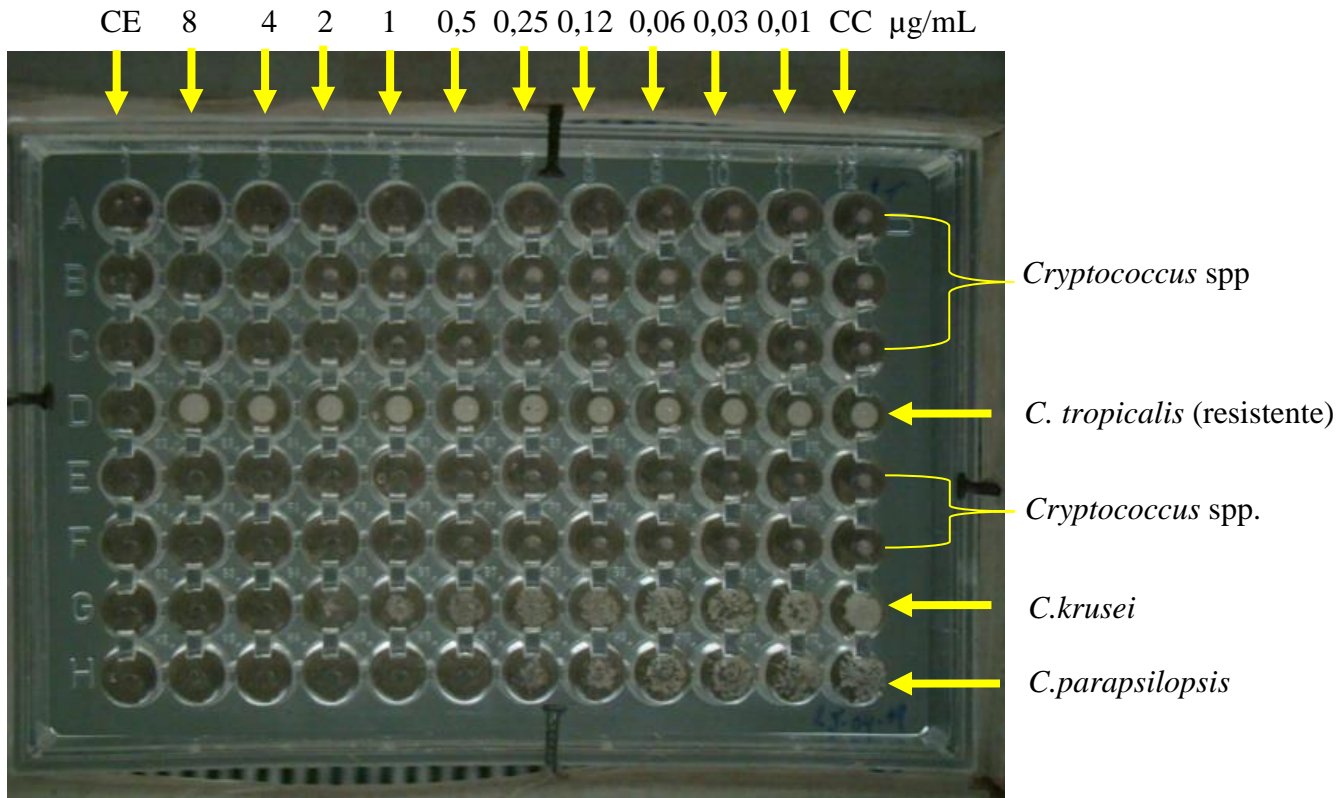


FIGURA 5. CIM de cinco isolados de *Cryptococcus* spp., *Candida krusei*, *Candida parapsilopsis* e *Candida tropicalis* frente à ITC.

5.6.2. Avaliação da Concentração Mínima Letal (CML)

Para analisar a ação fungicida das drogas, uma alíquota de 10 µl de cada poço visualmente transparente (sem observação de crescimento) foi inoculado em placas com meio agar Sabouraud. A leitura foi realizada após incubação a 35°C por 72h, sendo o crescimento de até 5 colônias interpretado como 99% de morte das células, o que caracteriza a CML (figura 3).

5.6.3 Citometria de fluxo.

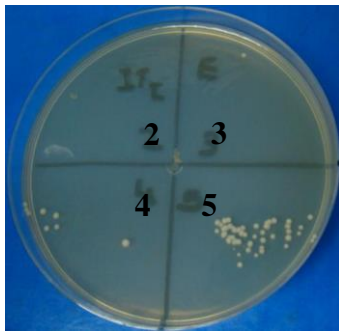
A análise de resultados da suscetibilidade da anfotericina B por citometria de fluxo foi realizada em gráfico “dot plot”, em (FL2) fluorescência verde amarelo a 575 nm e (FL4) fluorescência vermelha 675nm. Porém, a análise realizada com o fluorocromo AO foi realizada somente em FL4 log fluorescência vermelho 675nm.

5.6.3.1. Índice de suscetibilidade (IS).

A CIM foi determinada calculando-se o IS. Para isso, a média de fluorescência do valor obtido de cada isolado tratado com as diferentes concentrações da droga foi dividido pela média de fluorescência do controle – vivo de cada isolado (Reis et al. 2004). Os resultados obtidos foram submetidos a cálculo utilizando-se o software Excel 2003. O isolado foi considerado suscetível para AMB quando o IS foi $\geq 0,8$ para *C. gattii* e $\geq 0,65$ para *C. neoformans*, porém as células incubadas com azólicos e 5-FC foram considerados suscetíveis quando o IS foi $> 1,2$.

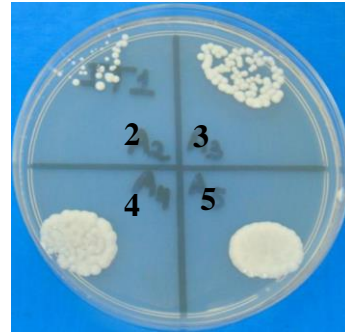
6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.

A análise de dados foi realizada pelo software Excel 2003 e pelo software *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) versão 16.0. Foram aplicados testes não-paramétricos de Mann-Whitney para a verificação de diferenças das CIMs segundo as espécies *C. neoformans* e *C. gatti*. O teste foi realizado separadamente para cada um dos métodos utilizados (citometria de fluxo e CLSI/M27A-2). Para comparar os diferentes métodos, utilizou-se o teste de Wilcoxon para dados pareados. Esse método considera o pareamento dos resultados para cada uma das 41 amostras. P-valores $< 0,05$ nos testes estatísticos indicou diferenças estatisticamente significantes.

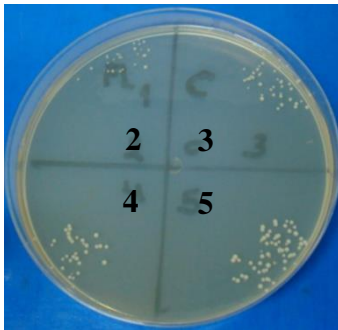


6a. CML 4 µg/mL de ITC

2= 8 µg/ml
3= 4 µg/ml
4= 2 µg/ml
5= 1 µg/ml



6b. CML >8µg/ml de ITC

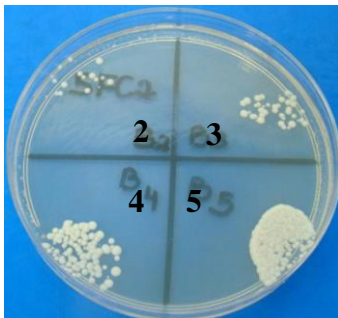


6c. CML >64µg/mL de FLC

2= 64 µg/ml
3= 32 µg/ml
4= 16 µg/ml
5= 8 µg/ml

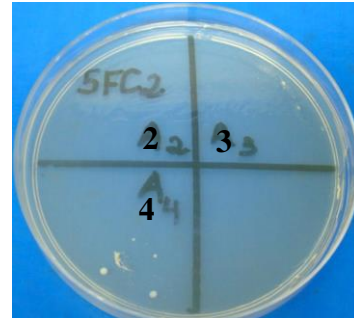


6d. CML 32 µg/ml de FLC

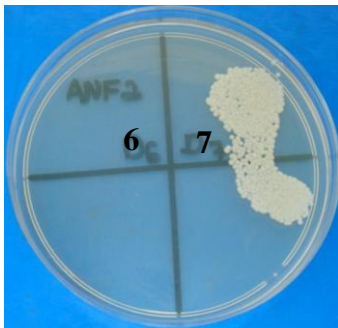


6e. CML >64 µg/ml de 5-FC

2= 64 µg/ml
3= 32 µg/ml
4= 16 µg/ml
5= 8 µg/ml



6f. CML 16 µg/ml de 5-FC



6g. CML 0,5 µg/ml de AMB.

6= 0,5 µg/ml
7= 0,25 µg/ml

Figura 6. Ilustração da Concentração Mínima Letal (CML) para a inibição de *Cryptococcus* spp. Os números dos quadrantes correspondem aos números dos orifícios da microplaca e suas concentrações correspondentes (dentro da caixa de texto).

. ARTIGO Submetido

Re: Antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by flow cytometry(JCM01827-09Version1)

Dear Dr. Lazéra:

You have successfully submitted your manuscript via the Rapid Review system. The control number of your manuscript is JCM01827-09 Version 1. Take note of this number, and refer to it in any correspondence with the Journals Department or with the editor. You may log onto the Rapid Review system at any time to see the current status of your manuscript and the name of the editor handling it. The URL is <http://www.rapidreview.com/ASM2/author.html>, and your user name is MLazera. To find contact information for the editor handling your manuscript, go to the following URL: http://www.asm.org//components/com_php/files/editors.php

Thank you for submitting your manuscript for consideration.

Charles Brown

Production Editor

Journal of Clinical Microbiology (JCM)

Running Title: Antifungal susceptibility of *Cryptococcus* spp. by FC.

*Antifungal susceptibility of Cryptococcus neoformans and
Cryptococcus gattii by flow cytometry*

Bernardina Penarrieta Morales¹, Luciana Trilles¹ Ivan Neves Junior², Marília Martins Nishikawa⁴, Raquel de Vasconcelos C. de Oliveira³, Wallace Raimundo A dos Santos⁵, Solange PS Evangelista Costa⁵, Bodo Wanke¹, Márcia dos Santos Lazéra¹

¹Laboratório de Micologia, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC)-Fiocruz, Av. Brasil 4365, 21045-900 Rio de Janeiro, RJ, Brasil

²Serviço de Integração de Atividades Laboratoriais, IPEC-Fiocruz

³Laboratório de Epidemiologia Clínica, IPEC-Fiocruz

⁴Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS)-Fiocruz, RJ, Brasil

⁵Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém, PA, Brasil

Key Words: 1. Antifungal Susceptibility. 2. *Cryptococcus neoformans* 3. *Cryptococcus gattii* 4. Flow Cytometry

The susceptibility of clinical *Cryptococcus* isolates was assayed to reduce incubation time, use automated readings and obtain quick, reproducible results for *in vitro* susceptibility tests. The minimum inhibitory concentration (MIC) of 20 isolates of *Cryptococcus neoformans* and 21 of *Cryptococcus gattii* were determined by flow cytometry and the results compared with the broth microdilution method (CLSI/M27A-2 document). After a 2-hours incubation with amphotericin B using FUN-1, *C. gattii* resulted in 100% agreement for 2µg/mL dilution and 95.2% for 1µg/mL dilution and *C. neoformans* resulted in 100% agreement for 1 and 2µg/mL when both methodologies were compared. For azolics and flucytosine, reproducible results were obtained with fluorochrome *Acridine Orange* after 18 hours of incubation, which resulted in 78% agreement for fluconazole, 85% for itraconazol and 97% for flucytosine. *C. gattii* was less susceptible than *C. neoformans* against itraconazol and flucytosine using microdilution and against fluconazole and flucytosine using flow cytometry ($p < 0.05$). When the differences between the methods were determined, independent of species, it was found a difference between the MIC values for itraconazol ($p = 0.006$) and amphotericin B ($p = 0.003$). There were no significant differences between the MIC values for fluconazole and flucytosine ($p > 0.05$). Flow cytometry may be a useful tool and have not only a good potential for *in vitro* tests and in determining the MIC of the antifungals tested but also an appreciable reduction of the minimum time required to obtain results.

Cryptococcosis is a systemic mycosis acquired through the inhalation of viable propagules, basidiospores or dehydrated yeasts of *Cryptococcus neoformans* or *Cryptococcus gattii* (11). *C. neoformans* (serotypes A, D and AD) is cosmopolitan, found in environments related to pigeon and various other bird species habitats, has also been isolated from the heartwood of several tree species (9,12,16), causes predominantly opportunistic infection among immunocompromised individuals, such as the aids-patients (28). *C. gattii* (serotypes B and C) occurs mainly in tropical and subtropical regions, found in natural habitats related to decomposing wood in hollows of many species of trees (13,2), causes mainly a primary lung infection in HIV-negative patients manifested as non-specific respiratory symptoms with different radiologic presentations depending on host's immune status (8,1), remaining usually underdiagnosed. It may disseminate from the lung to other organs, mainly to the central nervous system (25). Meningoencephalitis caused by both species (*C. neoformans* and *C. gattii*) is the main clinical manifestation of cryptococcosis, which still presents high morbidity and lethality rates.

Amphotericin B (AMB) has been considered the gold standard for treating cryptococcal meningitis in HIV-patients, while the treatment initiated with fluconazole (FLC) or itraconazol (ITC) is less effective (24). However, FLC is considered the treatment of choice in moderate and localized infections, such as pulmonary cryptococcosis (8). The recommended initial therapy for meningitis is AMB (0.7mg or 1mg/kg daily) with or without flucytosine (5FC) (100mg/kg daily) for 2 weeks, followed by an 8-week consolidation phase with either FLC or ITC (7). Nonetheless, the appearance of resistant strains, mainly to FLC (6,15), and the toxicity of the antifungal drugs available for clinical use has led to the search for new drugs as well as to the need for standardizing the methods to determine *in vitro* antifungal susceptibility (17).

The Clinical and Laboratory Standards Institute (17) has developed a reference method (document M27-A2) using broth dilution tests to determine *in vitro* yeast susceptibility to antifungal agents. The incubation time for the genus *Candida* is 24 to 48 hours, and for the genus *Cryptococcus* is 72 hours (17). The reading can be visual or through spectrophotometry. This reference method is considered of difficult execution, installation and interpretation. For this reason, new techniques to evaluate antifungal susceptibility have been developed, such as the E-test (AB Biodisc, Sweden), based on the diffusion of the drug on a solid medium and the Agar disk diffusion method (27).

Recent studies have highlighted that flow cytometry (FC) with fluorochromes can be an automated alternative method to the microdilution method guidelines (M27-A2), with rapid and reliable results to determine Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of antifungal drugs for *Candida* spp. and *Cryptococcus* spp. *in vitro* tests (27).

Acridine Orange is a nucleic acid selective metachromatic stain useful for cell cycle determination (23). It interacts with DNA and RNA by intercalation or electrostatic attraction respectively (4). Fluorochrome 2-chloro-4-(2,3-dihydro-3-methyl-(benzo-1,3-thiazol-2-yl)-methylidene) 1-phenylquinoliniumiodide (FUN-1) is a halogenated cyanine, cytoplasm membrane-permeant, a fluorochrome that is converted by metabolically active fungi from a diffuse cytosolic pool (greenyellow fluorescence) to red cytoplasmic intravacuolar structures. Metabolically disturbed cells show an increase in the intensity of green-yellow fluorescence (14).

Considering the importance of monitoring the appearance of resistant strains of *C. neoformans* and *C. gattii*, it is necessary to improve the available methods for antifungal susceptibility tests. In order to obtain reproducible results in a shorter time, we modified the protocol proposed by CLSI/M27A-2, including flow cytometry that uses automated readings to compare the results with the original protocol of document M27-A2.

MATERIALS AND METHODS

Microrganisms. Twenty clinical isolates of *C. neoformans* and 21 of *C. gattii*, including standard strains of *C. neoformans* INCQS 40044 (ATCC 32045) and *C. gattii* INCQS 40141 (ATCC 56990), were characterized by Vitek YBC (bioMérieux, Inc., Durham, USA) and growth on CGB medium (10). Each strain was inoculated on Niger Seed Agar (NSA) plates prior to testing to confirm its purity and viability. Two 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 kept in 15% glycerol (Sigma-Aldrich Inc., St Louis, USA) at -70°C and are deposited in the Pathogenic Fungal Collection of IPEC/FIOCRUZ.

Microdilution and Determination of MICs.

The tests were performed according to the Protocol M27A-2, using the following drugs in their reference powdered form: the azolics FLC (Sigma-Aldrich Inc., St Louis, USA) and ITC (Sigma-

Aldrich Inc., St Louis, USA), the polyene derived AMB (Sigma-Aldrich Inc., St Louis, USA) and 5FC (Sigma-Aldrich Inc., St Louis, USA). The stock-solutions of the drugs, the inoculum and the microdilutions in series were prepared using RPMI-1640 medium with L-Glutamin without bicarbonate (Gibco™, New York, EUA) plus 2% dextrose (Difco™ Laboratories, Mariland, EUA), buffered with MOPS – Acid buffer [3-morpholino] propanosulfonic P. A. (Vetec Química Fina Ltda., Duque de Caxias, Brazil) and adjusted to pH 7.0. Visual reading was done after 72 hours of incubation at 35°C, and the MICs of FLC, ITC and 5FC were defined as the lowest concentrations that produced 50% reduction in growth (MIC₂). The MIC of AMB (fungicide) was defined as the lowest concentration that produced 100% inhibition of growth, in which a score of 0 (MIC₀) (optically clear) was observed.

Evaluation of Minimal Lethal Concentration (MLC).

To analyze the fungicide action of the drugs, 10µl from each well that showed complete inhibition (100% inhibition or an optically clear well) of a microtiter plate were inoculated onto Sabouraud Agar (Difco™ Laboratories, Mariland, EUA). The reading was done after 72h of incubation at 35°C and the MLC was determined by the minimal concentration at which there was growth of up to 1% of cells (26).

Flow Cytometry (FC).

The MICs of FLC, ITC, 5FC and AMB were determined by flow cytometry (Beckman Coulter XL-MCL Flow cytometer - 488nm). The drugs were prepared according to microdilution method guidelines M27-A2 (17), reserved in sterile micro-tubes at -70°C for up to six months, until to be tested. The final concentration intervals varied from 2 to 0.015µg/ml for AMB, 0.5 to 0.06 µg/ml ITC, 32 to 0.25µg/ml for 5FC and from 64 to 1.0µg/ml for FLC.

The isolates were cultured on Petri dishes containing Sabouraud dextrose Agar (Difco™ Laboratories, Mariland, EUA) for 48 hours at 35°C. Two to five colonies of an approximate 1 mm of diameter were suspended in 5 ml of RPMI 1640 supplemented with 2% dextrose. The suspension was adjusted to 0.5 McFarland, obtaining a solution of 0.5×10^6 to 2.5×10^6 cfu /ml. Suspensions containing 0.5×10^6 to 2.5×10^6 cfu /ml were incubated with shaking at 35°C with each antifungal agent (300 µl of the inoculum added to the 300 µl of the drug solution).

In order to determine appropriate incubation times to be used in our experiment we performed a pilot study, testing the incubation times of 2h and 4h for AMB and 4h, 8h, 12h and 18h for the azolics and the 5FC. An incubation time of 18 hours was determined to incubate all the isolates

with the azolics and 5FC and 2 hours for incubation with AMB. Later, the cells incubated with the azolics and 5FC were stained with Acridine Orange (Sigma-Aldrich Inc., St Louis, USA) in a final concentration of 11mg/L (23). The cells incubated with AMB were stained with 0.5 μ M of Fluorochromes [2-cloro-4-(2,3dihydro-3-methyl-(benzo-1.3-thiazol-2-yl)-methylidene) 1phenylquinoliniumiodide (FUN-1) in the dark at room temperature for 30 min (18). For the tests using FUN-1 as well as those using Acridine Orange, suspensions of untreated (drug free) and treated cells with formaldehyde (final concentration of 1% for 2 h) were stained under the same conditions and used as controls.

Susceptibility Index (SI).

To obtain the susceptibility index, the median fluorescence value of each drug-containing sample was divided by the median fluorescence value of the drug-free control for each isolate (22). Approximately 10.000 individual cells were analyzed in the Flow Cytometry at FL4 (red fluorescence 675nm) with Acridine Orange for the azolics and 5FC, and for amphotericin B, approximately 30.000 individual cells were analyzed at FL4 and at FL2 (yellow-green fluorescence, 575 nm) with FUN-1.

An isolate was considered susceptible to AMB when SI was ≥ 0.8 for *C. gattii* and SI ≥ 0.65 for *C. neoformans*, but the cells incubated with the azolics and 5FC were considered susceptible when SI was > 1.2 at FL4 log.

Statistics.

Data analysis was done by Excel 2003 software and by the Statistical Package for Social Sciences (SPSS) software version 16.0. Non-parametric tests of Mann-Whitney were applied to verify the MIC differences according to the *C. neoformans* and *C. gatti* species. The test was performed separately for each of the methods used (flow cytometry and CLSI/M27A-2). To compare the different methods, the Wilcoxon test for paired data was used. This method considers the pairing of the results for each of the 41 samples. P-values < 0.05 indicated statistically significant differences.

RESULTS AND DISCUSSION

The results obtained by protocol NCCLS/CLSI (M27 – A 2) and by the protocol with flow cytometry are described in tables 1 and 2. Damage in the cell membranes, caused by increasing concentrations of ITC, FLC, 5FC and AMB was observed in the susceptibility tests with these two protocols. In flow cytometry, membrane damage determines the entry of the Acridine Orange and FUN-1 in the cells, thus making it possible to determine inhibitory concentration using this methodology.

In vitro antifungal susceptibility for yeasts has been evaluated by numerous flow cytometry methods, mainly *Candida* species (19,20,21,23), with satisfactory results, reduced incubation time and automated reading. However, there are few studies analyzing susceptibility for *Cryptococcus* species by flow cytometry with different fluorochromes, such as propidium iodide (PI) (21) e FUN-1(18).

In our study, the flow cytometry readings performed at 2-hour incubation time with FUN-1 fluorochrome protocol was sufficient to determine the MIC of AMB (fig 2), as previously observed (18). Other authors reported that 4 hours of incubation with this drug, using PI as fluorochrome, are necessary (21). In the present study, Acridine Orange was used for azolics and 5FC, in accordance with the study by Rudensky et al. (2005), which stated that fluorochrome Acridine Orange is the most indicated to determine the MIC for the azolics, in spite of having only been tested for *Candida* spp. Furthermore, our pilot study demonstrated that the results using FUN-1 with azolics and 5FC were unsatisfactory for *C. neoformans* and *C. gattii* (data not shown).

When *C. neoformans* and *C. gattii* were stained with FUN-1, the living control cells emitted a red color at FL4 at the top-right quadrant of the dot-plot graph, while the dead-control cells emitted a green-yellow fluorescent in FL2, as observed in figure 1.

The 5-hour Acridine Orange incubation time is considered sufficient for the *Candida* genus (23). Such result was confirmed in our study through the *C. krusei* ATCC6258 and *C. parapsilopsis* ATCC 22019 standard-strains (data not shown). However, for *Cryptococcus* spp., satisfactory results within 8 hours of incubation were obtained only in part of the isolates tested. Moreover, extending incubation time to an 18-hour period homogenous results for all isolates were obtained. By using this fluorochrome, a fluorescent increase was verified in the dead control

cells in relation to the living control cells (figure 2). We consider that it is possible to estimate the MIC for azolics and flucytosine within 8-hour incubation, or periods less than 18 hours, but the reproducibility for all of the isolates tested are not guaranteed, making future studies with a greater number of isolates necessary. We verify that, different from the *C. neoformans* and *C. gattii* strains, *Candida krusei* and *Candida parapsilopsis* strains responded very well to the *in vitro* test, with FUN-1 as well as Acridine Orange, which is in agreement with the reports by Pina-Vaz et al. (2005) and Rudensky, (2005).

Increasing fluorescence with Acridine Orange was observed in progressive drug concentrations of FLC and ITC. Nonetheless, for cells exposed to ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$ of 5FC, a regular decay of fluorescence was observed, which may be related to the action of binding on the DNA and RNA molecules by 5FC. However, it was possible to determine the MIC for 5FC, once the MICs obtained were less than or equal to $2\mu\text{g/ml}$.

By using the broth microdilution method, *C. gattii* was less susceptible than *C. neoformans* for ITC ($p=0.043$) and 5FC ($p=0.001$). The same was observed in flow cytometry for FLC ($p=0.021$) and 5FC ($p=0.024$) (table 1). When comparing the results between the two methods, independent of species, there was only a difference between the MIC values for ITC ($p=0.006$) and AMB ($p=0.003$). The lower susceptibility of *C. gattii* for antifungal drugs is in accordance with previous reports (3, 26).

To determine the percentage of agreement in comparing the MICs obtained by the two methods, two more or two less dilutions were considered as harmonious results (5, 21). For FLC, the agreement was 78% (32/41), 85% for ITC (35/41) and 97% for 5FC (40/41). The agreement for AMB was 100% (41/41). To analyze the agreement between the two methodologies testing AMB (table 2), it was necessary to determine the different SIs for each species: the best SI for *C. gattii* was 0.80, with 100% agreement for $2\mu\text{g/ml}$ and 95.2% for $1\mu\text{g/ml}$ dilution, which suggests that flow cytometry was more sensitive to detect fungal growth than CLSI method, since growth was not observed in the CLSI method with $1\mu\text{g/ml}$ dilution.

The results of this study suggest that flow cytometry has potential for *in vitro* tests in determining the MIC of AMB using FUN-1 fluorochrome and Acridine Orange for FLC, ITC and 5FC for *C. neoformans* and *C. gattii*. It may be also a useful tool for clinical research and laboratory. Once standardized, this methodology demonstrated reproducibility and reliability in 2

hours for AMB and 18 hours incubation for the other antifungal drugs, reducing the minimum time necessary to obtain results, being that protocol CLSI M27A-2 foresees a time of 72 hours for *C. neoformans* and *C. gattii*.

Acknowledgements.

We express our gratitude to CNPq (478990/06-5), FAPERJ (E-26/110.486/2007) and CAPES for financial support.

Table 1. Comparison of MIC by method M27 A-2 and flow cytometry with Acridine Orange fluorochrome for azolics and flucytosine, and FUN-1 for amphotericin B.

Species (N isolates)	MIC parameter	MIC ($\mu\text{g/mL}$)							
		FLUCONAZOL		ITRACONAZOL		FLUCYTOSINE		ANPHOTERICIN B	
		M27-A2	FCM	M27-A2	FCM	M27-A2	FCM	M27-A2	FCM
<i>C. gattii</i> (21)	GM	1.17	2.20	0.13	0.06	0.99	0.67	0.67	0.27
	Range	0.12-8	1.0-16	0.03-0.50	0.06-0.25	0.50-2.0	0.25-2.0	0.5-1.0	0.25-1.0
	MIC ₉₀	4.0	4.0	0.5	0.12	2.0	2.0	1.0	0.5
	^a MLC range	16.0- >64	-	2.0- >8.0	-	8.0 - > 64	-	0.5-2.0	-
<i>C. neoformans</i> (20)	GM	0.63	1.46	0.06	0.07	0.30	0.50	0.59	0.42
	Range	0.12-4.0	1.0-16	0.01-1.0	0.06-0.50	0.12-2.0	0.50-0.50	0.25-1.0	0.25-2.0
	MIV ₉₀	2,0	4,0	0,12	0,12	0,5	0,5	1,0	1,0
	^a MLC range	4.0- >64	-	1.0- >8.0	-	2.0- >64	-	0.5-1.0	-
Total (41)	GM	0.86	1.80	0.09	0.07	0.56	0.58	0.60	0.33
	Range	0.12-8.0	1.0-16	0.01-0.5	0.06-0.5	0.12-2.0	0.25-2.0	0.25-1.0	0.25-2.0
	MIC ₉₀	4.0	4.0	0.5	0.25	2.0	2.0	1.0	1.0
	^a MLC range	4.0- >64	-	1.0- >8.0	-	2.0- >64	-	0.25-2.0	-

GM, geometric mean. M27-A2, Broth Microdilution Method. FCM, Flow cytometry; Minimum Inhibitory Concentration (MIC); ^a Minimum Lethal Concentration (MLC).

TABLE 2 Comparison of inhibition of *Cryptococcus* spp. by amphotericin B using protocol M27-A2 and FUN-1 with 2Hrs of incubation in flow cytometry protocol.

AMPHOTERICIN-B ug/ml	Number of inhibited isolates /Total			
	Flow Cytometry		M27-A2	
	<i>C. gattii</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>C. gattii</i>	<i>C. neoformans</i>
2.0	21/21	20/20	21/21	20/20
1.0	21/21	19/20	21/21	20/20
0.5	6/21	12/20	15/21	13/20
0.25	20/21	12/20	21/21	1/20

M27-A2 Broth Microdilution Method

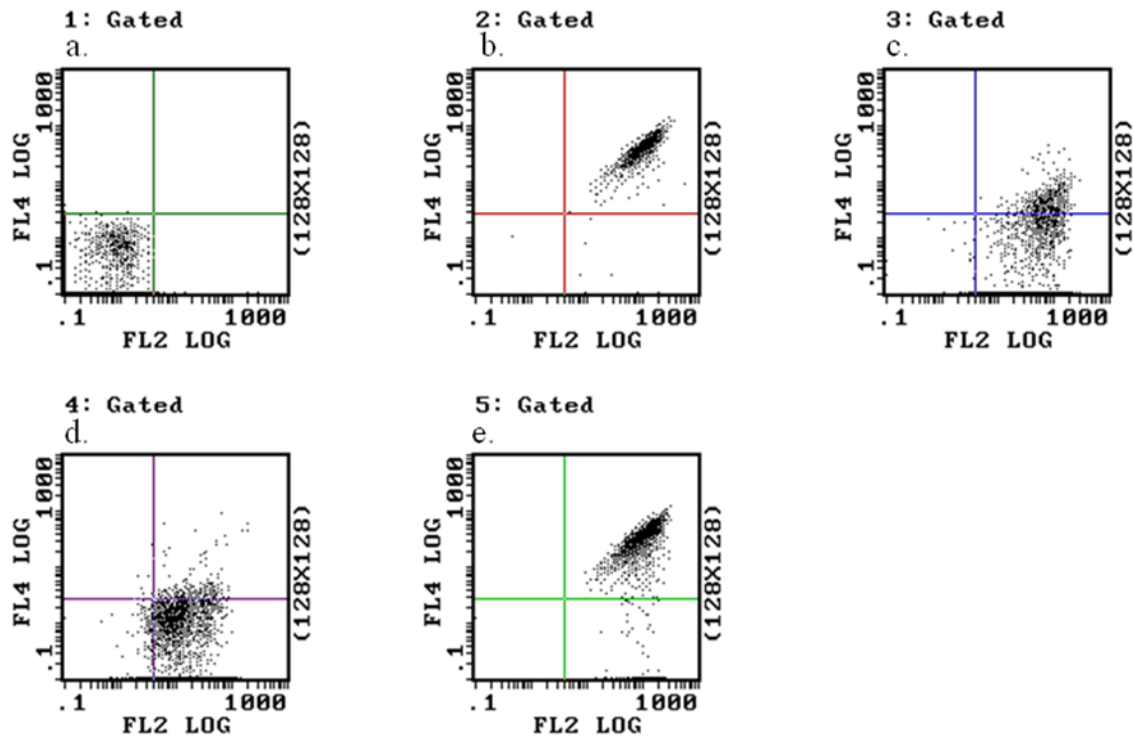


Figure. 1

Dop-plot Graphics determined by flow cytometry, *Cryptococcus neoformans* stained with FUN-1 (a) viable autofluorescence, (b) viable (c) treated with 1% formol, (d) treated with 2 µg/ml amphotericinB, (e) treated with 0,01 µg/ml amphotericinB.

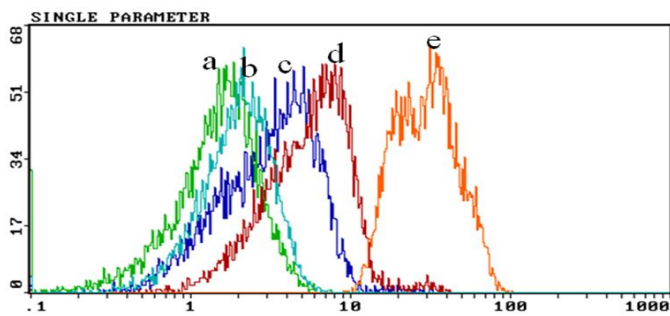


Figure.2 Histogram determined by flow cytometry, analysis in FL4log of *Cryptococcus neoformans*, colored with com Acridine orange and treated with fluconazol: (a) viable control, (b) 1 μ g/ml, (c) 8 μ g/ml, (d) 64 μ g/ml, (e) dead control, treated with 1% formol.

References.

1. **Baddley, J. W., J. R. Perfect, R. A. Oster, R. A. Larsen, G. A. Pankey, H. Henderson, D. W. Haas, C. A. Kauffman, R. Patel, A. K. Zaas, and P. G. Pappas.** 2008. Pulmonary cryptococcosis in patients without HIV infection: factors associated with disseminated disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **27**:937-43.
2. **Callejas, A., N. Ordonez, M. C. Rodriguez, and E. Castaneda.** 1998. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, serotype C, from the environment in Colombia. *Med Mycol* **36**:341-4.
3. **Chen, Y. C., S. C. Chang, C. C. Shih, C. C. Hung, K. T. Luhbd, Y. S. Pan, and W. C. Hsieh.** 2000. Clinical features and in vitro susceptibilities of two varieties of *Cryptococcus neoformans* in Taiwan. *Diagn Microbiol Infect Dis* **36**:175-83.
4. **Darzynkiewicz, Z.** 1990. Differential staining of DNA and RNA in intact cells and isolated cell nuclei with acridine orange. *Methods Cell Biol* **33**:285-98.
5. **Dias, A. L., F. E. Matsumoto, M. S. Melhem, E. G. da Silva, M. E. Auler, A. M. de Siqueira, and C. 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. *J Med Microbiol* **55**:1693-9.
6. **Friese, G., T. Discher, R. Fussle, A. Schmalreck, and J. Lohmeyer.** 2001. Development of azole resistance during fluconazole maintenance therapy for AIDS-associated cryptococcal disease. *Aids* **15**:2344-5.
7. **Jarvis, J. N., and T. S. Harrison.** 2007. HIV-associated cryptococcal meningitis. *Aids* **21**:2119-29.
8. **Jarvis, J. N., and T. S. Harrison.** 2008. Pulmonary cryptococcosis. *Semin Respir Crit Care Med* **29**:141-50.
9. **Kwon-Chung, K. J., and J. E. Bennett.** 1984. Epidemiologic differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Am J Epidemiol* **120**:123-30.
10. **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). *J Clin Microbiol* **15**:535-7.
11. **Kwon-Chung, K. J., and A. Varma.** 2006. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? *FEMS Yeast Res* **6**:574-87.
12. **Lazera, M. S., F. D. Pires, L. Camillo-Coura, M. M. Nishikawa, C. C. Bezerra, L. Trilles, and B. Wanke.** 1996. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in decaying wood forming hollows in living trees. *J Med Vet Mycol* **34**:127-31.
13. **Lazera, M. S., M. A. Salmito Cavalcanti, A. T. Londero, L. Trilles, M. M. Nishikawa, and B. Wanke.** 2000. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. *Med Mycol* **38**:379-83.
14. **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. *Appl Environ Microbiol* **63**:2897-905.
15. **Pappalardo, M. C., and M. S. Melhem.** 2003. Cryptococcosis: a review of the Brazilian experience for the disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **45**:299-305.
16. **Passoni, L. F., B. Wanke, M. M. Nishikawa, and M. S. Lazera.** 1998. *Cryptococcus neoformans* isolated from human dwellings in Rio de Janeiro, Brazil: an analysis of the

- domestic environment of AIDS patients with and without cryptococcosis. *Med Mycol* **36**:305-11.
17. **NCCLS Norma M27-A2.** Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade à Terapia Antifúngica das leveduras; Norma Aprovada – Segunda Edição. Norma M27-A2 do NCCLS (ISBN 1-56238-469-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, **2002**.
www.sbac.org.br/pt/pdfs/biblioteca/clsi_OPAS1M27-A2.pdf
 18. **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. *J Clin Microbiol* **43**:4674-9.
 19. **Pina-Vaz, C., A. G. Rodrigues, F. Sansonetty, J. Martinez-De-Oliveira, A. F. Fonseca, and P. A. Mardh.** 2000. Antifungal activity of local anesthetics against *Candida species*. *Infect Dis Obstet Gynecol* **8**:124-37.
 20. **Pina-Vaz, C., F. Sansonetty, A. G. Rodrigues, S. Costa-de-Oliveira, J. Martinez-de-Oliveira, and A. F. Fonseca.** 2001. Susceptibility to fluconazole of *Candida* clinical isolates determined by FUN-1 staining with flow cytometry and epifluorescence microscopy. *J Med Microbiol* **50**:375-82.
 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. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:2752-8.
 22. **Reis, R. S., I. Neves, Jr., S. L. Lourenco, L. S. Fonseca, and M. C. Lourenco.** 2004. Comparison of flow cytometric and Alamar Blue tests with the proportional method for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to rifampin and isoniazid. *J Clin Microbiol* **42**:2247-8.
 23. **Rudensky, B., E. Broidie, A. M. Yinnon, T. Weitzman, E. Paz, N. Keller, and D. Raveh.** 2005. Rapid flow-cytometric susceptibility testing of *Candida species*. *J Antimicrob Chemother* **55**:106-9.
 24. **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, J. F. Fisher, and et al.** 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. *N Engl J Med* **326**:83-9.
 25. **Santos, W. R., W. Meyer, B. Wanke, S. P. Costa, L. Trilles, J. L. Nascimento, R. Medeiros, B. P. Moraes, C. Bezerra Cde, R. C. Macedo, S. O. Ferreira, G. G. Barbosa, M. A. Perez, M. M. Nishikawa, and S. Lazera Mdos.** 2008. Primary endemic *Cryptococcosis gattii* by molecular type VGII in the state of Para, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **103**:813-8.
 26. **Trilles, L., B. Fernandez-Torres, S. Lazera Mdos, B. Wanke, and J. Guarro.** 2004. In vitro antifungal susceptibility of *Cryptococcus gattii*. *J Clin Microbiol* **42**:4815-7.
 27. **Vale-Silva, L. A., and V. Buchta.** 2006. Antifungal susceptibility testing by flow cytometry: is it the future? *Mycoses* **49**:261-73.
 28. **Yoshida, K., H. Shoji, and Y. Niki.** 2008. [Cryptococcosis]. *Nippon Rinsho* **66**:2350-5.

8. CONCLUSÕES.

Neste trabalho foi possível avaliar a reprodutibilidade e eficácia da técnica de citometria de fluxo, que demonstrou ser uma ferramenta útil tanto para pesquisa como para uso em laboratório clínico. Os resultados deste estudo sugerem que a citometria de fluxo tem potencial para testes *in vitro* de suscetibilidade antifúngica, utilizando os fluorocromos FUN-1 e *Acridine Orange*, para determinar a suscetibilidade de *C. neoformans* e *C. gattii* de origem clínica frente a anfotericina B, fluconazol, itraconazol e 5-fluorocitosina.

- A técnica de citometria de fluxo demonstrou reprodutibilidade e confiabilidade em 2 horas de incubação para anfotericina B e 18 horas para fluconazol, itraconazol e 5-fluorocitosina, reduzindo o tempo mínimo necessário para obtenção da concentração inibitória mínima, já que a metodologia padrão (documento M27-A2 NCCLS/CLSI) prevê o tempo de 72 horas para determinação da CIM de *C. neoformans* e *C. gattii*.
- O perfil de suscetibilidade *in vitro* de *C. neoformans* e *C. gattii* usando anfotericina B, fluconazol, itraconazol e 5-fluorocitosina demonstrou que *C. gattii* é menos suscetível do que *C. neoformans*.
- Em estudo piloto foi avaliada a reprodutibilidade da técnica de citometria de fluxo e verificamos, por inúmeras repetições, que uma vez escolhido o fluorocromo e determinado o tempo de incubação e a velocidade de agitação, a citometria de fluxo é uma técnica confiável para estudo de suscetibilidade antifúngica de *C. neoformans* e *C. gattii*.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arthington-Skaggs BA, Warnock DW, Morrison CJ. 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. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000 Aug;44(8):2081-5.
2. Bicanic T, Wood R, Meintjes G, Rebe K, Brouwer A, Loyse A, et al. High-dose amphotericin B with flucytosine for the treatment of cryptococcal meningitis in HIV-infected patients: a randomized trial. *Clin Infect Dis*. 2008 Jul 1;47(1):123-30.
3. Bhattacharjee AK, Kwon-Chung KJ, Glaudemans CP. On the structure of the capsular polysaccharide from *Cryptococcus neoformans* serotype C. *Immunochemistry*. 1978 Sep;15(9):673-9.
4. Bhattacharjee AK, Kwon-Chung KJ, Glaudemans CP. The structure of the capsular polysaccharide from *Cryptococcus neoformans* serotype D. *Carbohydr Res*. 1979 Aug;73:183-92.
5. Bhattacharjee AK, Kwon-Chung KJ, Glaudemans CP. Structural studies on the major, capsular polysaccharide from *Cryptococcus bacillisporus* serotype B. *Carbohydr Res*. 1980 Jun;82(1):103-11.
6. Boletim Epidemiológico aids. Brasília, DF: Ministério da Saúde, ano 17, n.1 jan./dez. 2003. 56p
7. Boekhout T, Theelen B, Diaz M, Fell JW, Hop WC, Abeln EC, et al. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology* (Reading, England). 2001 Apr;147(Pt 4):891-907.
8. Brouwer AE, Rajanuwong A, Chierakul W, Griffin GE, Larsen RA, White NJ, et al. Combination antifungal therapies for HIV-associated cryptococcal meningitis: a randomised trial. *Lancet*. 2004 May 29;363(9423):1764-7.
9. Casali AK, Goulart L, Rosa e Silva LK, Ribeiro AM, Amaral AA, Alves SH, et al. Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. *FEMS Yeast Res*. 2003 Jun;3(4):405-15.
10. Casadevall A & Perfect JR. Introduction to the pathogen. *In: A Casadevall & Perfect JR. Cryptococcus neoformans*. (ed.). Washington DC: ASM Press; 1998. p. 1- 28.

11. Cavalcanti MAS, Criptococose e seu agente no Meio Norte, estados do Piauí e Maranhão, Brasil. Rio de Janeiro. Tese [Doutorado em Biologia parasitária] - Fundação Oswaldo Cruz e Universidade Federal do Piauí (Teresina), 1995.
12. Corrêa M^aPS, Oliveira ECO, Duarte RRBS, Pardal PPO, Oliveira FM, Luiz Carlos Severo LC. Cryptococcosis in children in the State of Pará, Brazil Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 32(5):505-508, set-out, 1999).
13. Chang YC, Kwon-Chung KJ. Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. Mol Cell Biol. 1994 Jul;14(7):4912-9.
14. Cherniak R, Reiss E, Slodki ME, Plattner RD, Blumer SO. Structure and antigenic activity of the capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans* serotype A. Mol Immunol. 1980 Aug;17(8):1025-32.
15. Chin CS, Cheong YM, Wong YH. 5-Fluorocytosine resistance in clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. Med J Malaysia. 1989 Sep;44(3):194-8.
16. Darzynkiewicz Z. Differential staining of DNA and RNA in intact cells and isolated cell nuclei with *acridine orange*. Methods Cell Biol. 1990;33:285-98.
17. Diaz MR, Boekhout T, Theelen B, Fell JW. Molecular sequence analyses of the intergenic spacer (IGS) associated with rDNA of the two varieties of the pathogenic yeast, *Cryptococcus neoformans*. Syst Appl Microbiol. 2000 Dec;23(4):535-45.
18. Dornelas RM, Análise Comparativa por Diferentes Metodologias do Perfil de Susceptibilidade aos Antifúngicos de Leveduras Isoladas de Espécimes Clínicos. Rio de Janeiro, Dissertação [Mestrado em Microbiologia] – Instituto de microbiologia Programa Pós-Graduação IMPPG / UFRJ; 2006.
19. Ellis DH, Pfeiffer TJ. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. J Clin Microbiol. 1990 Jul;28(7):1642-4.
20. Fernandes OFL, Costa TR, Costa MR, Soares AJ, Pereira AJSC, Silva MRR. *Cryptococcus neoformans* isolados de pacientes com AIDS Rev Soc Bras Méd Trop. 2000; 33(1); 75-78.
21. Fortes ST, Lazera MS, Nishikawa MM, Macedo RC, Wanke B. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from a native jungle tree in the Brazilian Amazon rainforest. Mycoses. 2001; 44(5):137-40.
22. FW – Science. 2004. LW 13B - Citometria de Fluxo. O Fascinante Mundo da Ciência. Disponível em: www.uminho.pt/fw-science/Uploads/LW_13B.pdf.

23. Gokahmetoglu S, Nedret Koc A, Papiroglu T. Antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* by flow cytometry. *Mycoses*. 2003 Sep;46(8):307-11.
24. Igreja RP, Lazera Mdos S, Wanke B, Galhardo MC, Kidd SE, Meyer W. Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients of the Brazilian city, Rio de Janeiro. *Med Mycol*. 2004 Jun;42(3):229-38.
25. Ikeda R, Nishikawa A, Shinoda T, Fukazawa Y. Chemical characterization of capsular polysaccharide from *Cryptococcus neoformans* serotype A-D. *Microbiol Immunol*. 1985;29(10):981-91.
26. Jarvis JN, Harrison TS. HIV-associated cryptococcal meningitis. *AIDS*. 2007 Oct 18;21(16):2119-29.
27. Kantarcioglu AS, Boekhout T, Yucel A, Altas K. Susceptibility testing of *Cryptococcus diffluens* against amphotericin B, flucytosine, fluconazole, itraconazole, voriconazole and posaconazole. *Med Mycol*. 2009 Mar;47(2):169-76.
28. Kidd SE, Hagen F, Tscharke RL, Huynh M, Bartlett KH, Fyfe M, et al. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Dec 7;101(49):17258-63.
29. Kirk SM, Callister SM, Lim LC, Schell RF. Rapid susceptibility testing of *Candida albicans* by flow cytometry. *J Clin Microbiol*. 1997 Feb;35(2):358-63.
30. Kozel TR. Virulence factors of *Cryptococcus neoformans*. *Trends Microbiol*. 1995 Aug;3(8):295-9.
31. Kwon-Chung, J. J. – A new genus, *Filobasidiella*, the perfect state of *Cryptococcus neoformans*. *Mycology*, Lancaster. 1975;67: 1197-1200.
32. Kwon-Chung Kyung j., Itzhack Polacheck and John e. Bennett. 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 Mar;15(3):535-537.
33. Kwon-Chung KJ, Bennet JE. Cryptococcosis. In: Kwon- Chung KJ, Bennet JE (eds) *Medical mycology*. Philadelphia, Lea & Febiger, chap 16, p. 397-446, 1992.
34. Kwon-Chung KJ & Rhodes JC. Encapsulation and melanin formation as indicator of virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infect immune*. 1986;51: 218-223.
35. Kwon-Chung KJ, Edman JC, Wickes BL. Genetic association of mating types and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*. 1992 Feb;60(2):602-5.

36. Kwon-Chung KJ, Varma A. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? FEMS Yeast Res. 2006 Jun;6(4):574-87.
37. Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Melo NT. Criptococose In: Micologia Médica 8ªed. São Paulo: Sarvier Editora de Livros Médicos Ltda; 2002. p 316-317.
38. Larsen RA, Bozzette SA, Jones BE, Haghghat D, Leal MA, Forthal D, et al. Fluconazole combined with flucytosine for treatment of cryptococcal meningitis in patients with AIDS. Clin Infect Dis. 1994 Oct;19(4):741-5.
39. Lazera MS. Fontes saprofíticas de *Cryptococcus neoformans* na cidade do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. Dissertação [Mestrado em Doenças Infecciosas e Parasitárias] - Faculdade de Medicina da UFRJ; 1989.
40. Lazera MS, Salmito Cavalcanti MA, Londero AT, Trilles L, Nishikawa MM, Wanke B. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. Med Mycol. 2000 Oct;38(5):379-83.
41. Lazera MS, Cavalcanti MAS, Trilles L, Nishikawa MM, Wanke B. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in a pottery tree hollow - evidence for a natural habitat related to decaying wood. J Med Vet Mycol. 1998;36:119-122.
42. Lazera MS, Gutierrez Galhardo MC; Cavalcanti MAS; Wanke B. Criptococose. In: Coura, José Rodrigues (Ed.). Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias. 1.ed. Rio de Janeiro; 2005. v. II, p. 1223-1235.
43. Lazera MS, Pires FD, Camillo-Coura L, Nishikawa MM, Bezerra CC, Trilles L, et al. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in decaying wood forming hollows in living trees. J Med Vet Mycol. 1996 Mar-Apr;34(2):127-31.
44. Lazera MS, Wanke B, Nishikawa MM. Isolation of both varieties of *Cryptococcus neoformans* from saprophytic sources in the city of Rio de Janeiro, Brazil. J Med Vet Mycol. 1993;31: 449-454.
45. Leenders AC, Reiss P, Portegies P, Clezy K, Hop WC, Hoy J, et al. Liposomal amphotericin B (AmBisome) compared with amphotericin B both followed by oral fluconazole in the treatment of AIDS-associated cryptococcal meningitis. AIDS. 1997 Oct;11(12):1463-71.
46. Lipp HP. Antifungal agents-clinical pharmacokinetics and drug interactions. Mycoses. 2008;51 Suppl 1:7-18.
47. Martins LMS, Epidemiologia da criptococose em crianças e adultos jovens e diversidade de *Cryptococcus neoformans* no Meio Norte do Brasil. Rio de Janeiro Dissertação [Mestrado em Biologia Parasitária] - Instituto Oswaldo Cruz FIOCRUZ;

- 2003.
48. Millard PJ, Roth BL, Thi HP, Yue ST, Haugland RP. Development of the FUN-1 family of fluorescent probes for vacuole labeling and viability testing of yeasts. *Appl Environ Microbiol.* 1997 Jul;63(7):2897-905.
 49. Moreira TdA, Ferreira MS, Ribas RM e Aécio Sebastião Borges AS. Cryptococcosis: clinical epidemiological laboratorial study and fungi varieties in 96 patients *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39(3):255-258, mai-jun, 2006.
 50. NCCLS. *Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade à Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada – Segunda edição.* Norma M27-A2 do NCCLS (ISBN 1- 56238-469-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2002. www.sbac.org.br/pt/pdfs/biblioteca/clsi_OPAS1M27-A2.pdf
 51. Nguyen MH, Najvar LK, Yu CY, Graybill JR. Combination therapy with fluconazole and flucytosine in the murine model of cryptococcal meningitis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997 May;41(5):1120-3.
 52. Nishikawa MM, Lazera MS, Barbosa GG, Trilles L, Balassiano BR, Macedo RC, et al. Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Brazil: analysis of host and regional patterns. *J Clin Microbiol.* 2003 Jan;41(1):73-7.
 53. Oliveira-Netto IC, Machado CC, Wagner MB, Severo LC. Meio século de criptococose no Brasil: revisão de 308 casos (1941-1992). *Ambito Hospitalar Infectologia.* 1993;7: 5-16.
 54. Pappalardo MC, Melhem MS. Cryptococcosis: a review of the Brazilian experience for the disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2003 Nov-Dec;45(6):299-305
 55. Passoni, L. F., B. Wanke, M. M. Nishikawa, and M. S. Lazera. *Cryptococcus neoformans* isolated from human dwellings in Rio de Janeiro, Brazil: an analysis of the domestic environment of AIDS patients with and without cryptococcosis. *Med Mycol.* 1998;36:305-11.
 56. 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 Sep;43(9):4674-9.
 57. Pinto Júnior VL, Criptococose associada a AIDS. Análise da casuística do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas-FIOCRUZ entre 1987 e 2002. Rio de Janeiro,

Dissertação [Mestrado] - Instituto Oswaldo Cruz FIOCRUZ, 2003.

58. Ramani R, Ramani A, Wong SJ. Rapid flow cytometric susceptibility testing of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol*. 1997 Sep;35(9):2320-4.
59. 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 Oct;44(10):2752-8.
60. Reis, R. S., I. Neves, Jr., S. L. Lourenco, L. S. Fonseca, and M. C. Lourenco. Comparison of flow cytometric and Alamar Blue tests with the proportional method for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to rifampin and isoniazid. *J Clin Microbiol*. 2004;42:2247-8.
61. Restrepo A, Baumgardner DJ, Bagagli E, Cooper CR, Jr., McGinnis MR, Lazera MS, et al. Clues to the presence of pathogenic fungi in certain environments. *Med Mycol*. 2000;38 Suppl 1:67-77.
62. Revankar SG, Kirkpatrick WR, McAtee RK, Fothergill AW, Redding SW, Rinaldi MG, et al. Interpretation of trailing endpoints in antifungal susceptibility testing by the National Committee for Clinical Laboratory Standards method. *J Clin Microbiol*. 1998 Jan;36(1):153-6.
63. Rozenbaum R, Gonçalves AJR. Clinical epidemiological study of 171 cases of cryptococcosis. *Clinical Infectious Diseases* 18: 369-380, 1994.
64. Rudensky B, Broidie E, Yinnon AM, Weitzman T, Paz E, Keller N, et al. Rapid flow-cytometric susceptibility testing of *Candida* species. *J Antimicrob Chemother*. 2005 Jan;55(1):106-9.
65. Rudensky B, Broide E, Berko N, Wiener-Well Y, Yinnon AM, Raveh D. Direct fluconazole susceptibility testing of positive *Candida* blood cultures by flow cytometry. *Mycoses*. 2008 May;51(3):200-4.
66. Salas SD, Bennett JE, Kwon-Chung KJ, Perfect JR, Williamson PR. Effect of the laccase gene CNLAC1, on virulence of *Cryptococcus neoformans*. *J Exp Med*. 1996 Aug 1;184(2):377-86.
67. Sanglard D. Clinical relevance of mechanisms of antifungal drug resistance in yeasts. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2002 Nov;20(9):462-9; quiz 70, 79.
68. Santos LO. Criptococose no estado do Amazonas: estudo de 75 casos diagnosticados na Fundação de Medicina Tropical/FMT/IMTM (1988-1998). Rio de Janeiro. Dissertação [Mestrado] - Instituto Oswaldo Cruz FIOCRUZ, 2000.
69. Sande, M.A.; Mandell, G.L. Drogas antimicrobianas – Drogas antimicóticas e

antivirais. In: Goodman, L.; Gilman, A.G. As bases farmacológicas da terapêutica. Rio de Janeiro: Guanabara; 1987. Cap.54. p.799-807.

70. Swinne D, Deppner M, Laroche R, Floch JJ, Kadende P. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from houses of AIDS-associated cryptococcosis patients in Bujumbura (Burundi). AIDS. 1989 Jun;3(6):389-90.
71. Tortora Gerard J, Berdell R Funke, Chistrine L Case. Drogas Antimicrobianas. Microbiologia -6ª ed- Porto Alegre: Artmed; 2000. 531-552.
72. Trilles L, Lazera M, Wanke B, Theelen B, Boekhout T. Genetic characterization of environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex from Brazil. Med Mycol. 2003 Oct;41(5):383-90.
73. Trilles L., B. Fernandez-Torres, S. Lazera Mdos, B. Wanke, and J. Guarro. In vitro antifungal susceptibility of *Cryptococcus gattii*. J Clin Microbiol. 2004;42:4815-7.
74. Vale-Silva LA, Buchta V. Antifungal susceptibility testing by flow cytometry: is it the future? Mycoses. 2006 Jul;49(4):261-73.
75. Wickes BL, Mayorga ME, Edman U, Edman JC. Dimorphism and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*: association with the alpha-mating type. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Jul 9;93(14):7327-31.
76. Williamson PR. Laccase and melanin in the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. Front Biosci. 1997;2:e99-107.
77. Zhu X, Williamson PR. Role of laccase in the biology and virulence of *Cryptococcus neoformans*. FEMS Yeast Res. 2004 Oct;5(1):1-10.