

DAYANE CRISTINA DA SILVA SANTOS

**Caracterização fenotípica e genotípica de isolados clínicos e ambientais de *Cryptococcus gattii* do estado de São Paulo**

São Paulo

2012

DAYANE CRISTINA DA SILVA SANTOS

**Caracterização fenotípica e genotípica de isolados clínicos e ambientais de *Cryptococcus gattii* do estado de São Paulo**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção de Título de Mestre em Ciências.

**Área de Concentração:**

**Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública**

**Orientador:**

Profa. Dra. Marcia de Souza Carvalho Melhem

São Paulo

2012

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Silva, Dayane Cristina da

Caracterização fenotípica e genotípica de isolados clínicos e ambientais de *Cryptococcus gattii* do Estado de São Paulo / Dayane Cristina da Silva – São Paulo, 2012.

Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientador: Marcia de Souza Carvalho Melhem

1. *Cryptococcus gattii*
2. Tipagem molecular
3. Antifúngicos
4. Microbiologia ambiental

SES/CCD/CD-263/12

**Este trabalho foi desenvolvido no Núcleo de Micologia  
do Instituto Adolfo Lutz e teve o apoio financeiro da Fundação de Amparo à  
Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo 2010/04508).**

Com todo meu amor dedico este trabalho à Deus e a minha família!  
Em especial minha avó Dulcinéia  
Não existem palavras para agradecer pelo apoio e incentivos dados nos momentos  
alegres ou difíceis!  
Sem vocês não seria possível!

## **Agradecimentos**

À **prof. Dra. Marcia de Souza Carvalho Melhem**, meus sinceros agradecimentos pela orientação e contribuição para evolução do meu conhecimento científico. Muito obrigada por confiar em meu trabalho e pelas grandes oportunidades de crescimento profissional e pessoal.

A todos os amigos do **Núcleo de Micologia do Instituto Adolfo Lutz**, agradeço por fazerem parte desta fase tão importante. Me sinto muito feliz por pertencer a essa equipe desde o aprimoramento profissional. Agradecimento especial às pesquisadoras Walderez, Sandra, Marilena e Dulcelena, obrigada por todo apoio. Às biólogas Fumiko, Leonor e Miriam, e todo apoio do querido Andrés e Lindete. E também aos queridos pós-graduandos Lucas, Fabiana, Sônia, Lidiane, Juliana, Hussein, Mitra, Fábio, Dani Moris, e aos aprimorandos Tânia, Aline, Daise, Tiago, Marina e Cirlene. Muito obrigada pelo convívio e por participarem das conquistas e vitórias.

Em especial à minha mãe Shirlei, a minha irmãzinha Mylena, ao Edson, e a todos os meus tios, tias e primos. Obrigada por todo incentivo e apoio.

Ao meu querido esposo Denilson, pela força e principalmente compreensão às minhas ausências, seu amor e seu apoio foi fundamental!

Aos meus queridos amigos de toda vida Rê, Lú (querida prima), Paula, Silvinha, Day e Helton e ao “paredão”: Mi Colombo, Mi Marques, Sô, Rô, Fá, Nessa, Daya e Paulinha o tempo e a distância não apagaram nossa amizade!

## RESUMO

*Cryptococcus gattii* engloba quatro tipos moleculares que podem causar criptococose em indivíduos, aparentemente, saudáveis após inalação de partículas infectantes dispersas no meio ambiente. Resistência clínica a antifúngicos durante o tratamento, ou profilaxia, para a doença tem sido relatada. O manejo adequado desta infecção depende de vários fatores, incluindo o perfil de suscetibilidade antifúngica do agente etiológico. Porém, há poucos relatos disponíveis na literatura sobre a ação *in vitro* de fluconazol (FLU) e anfotericina B (AMB), fármacos de primeira escolha para casos de criptococose sobre isolados clínicos de *C. gattii*. Em relação à cepas ambientais, a mesma lacuna é observada, sendo que o monitoramento desses organismos é a base para se estabelecer pontos de corte epidemiológicos para definição de resistência a antifúngicos. A determinação da suscetibilidade é realizada por métodos de referência em provas de microdiluição. No entanto, esses métodos não tem bom desempenho para detectar resistência à AMB, e por isso, a metodologia de curvas de morte foi proposta para avaliar melhor a atividade *in vitro* desse fármaco. O objetivo deste estudo foi determinar a susceptibilidade a AMB e FLU de 55 amostras de *C. gattii*, sendo 90,9% clínicas e 9,1% ambientais, isoladas no Estado de São Paulo. Foi utilizada a técnica de PCR-RFLP para identificação dos tipos moleculares e o método de referência europeu (AFST-EUCAST) para determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Estudos de curvas de morte foram realizados com 1 mg de AMB por L de meio de cultura (RPMI 1640). A maioria dos tipos moleculares, tanto clínicos quanto ambientais, foi VGII (94% e 60%, respectivamente), sendo os demais VGI. As CIMs de FLU variaram de 1 a 64 mg/L e os valores de CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub>, e a concentração necessária para inibir 50% e 90% dos isolados, foram respectivamente de 8 e 16mg/L. Observou-se CIM elevadas ( $\geq 8$ mg/L) para 74% dos isolados VGII e para 50% dos VGI. Para AMB os valores de CIM foram homogêneos e baixos, entre 0,12 e 0,5 mg/L (CIM<sub>50</sub>=CIM<sub>90</sub> 0,5mg/L). A metodologia de curvas de morte, demonstrou distintos efeitos fungicidas sobre os isolados, sendo que a maioria (71%) foi inativada nas primeiras 6h de exposição à AMB, chegando a 86% após 12h; porém

3.6% após 48h de exposição ao fármaco. Verificou-se, ainda, um efeito denominado recrescimento em 20/55 cepas; 38.1% dos isolados após 48h de exposição a AMB. Todos os isolados VGI foram inativados no período inicial de 6h. Em comparação com o teste de microdiluição, a curva de morte demonstrou maior poder discriminatório de cepas resistentes à AMB, sugerindo que a taxa de morte segundo essa metodologia é cepa-dependente e, possivelmente, tipo molecular-dependente. O encontro de células viáveis, mesmo após longos períodos ( $\geq 48$ h) de exposição à AMB, pode estar relacionado à ocorrência de cepas tolerantes ao fármaco, como já citado em literatura. Ressalta-se, neste estudo, a alta frequência de CIMs elevadas de FLU para isolados de *C. gattii*. A relevância médica destes resultados *in vitro* poderão ser determinados em futuros estudos de correlação clínica.

## ABSTRACT

*Cryptococcus gattii* is a yeast complex encompassing four molecular subtypes that causes life-threatening disease in apparently healthy humans, after inhalation of infectious particles released into the environment. Clinical antifungal resistance during therapy or prophylaxis has been reported and so an adequate management of this emerging infection can be based on the antifungal susceptibility profile of *C. gattii* clinical isolates. There are few reports available in the literature concerning *C. gattii* in vitro antifungal susceptibility to fluconazole (FLU) and amphotericin B (AMB), the first choice drugs used in cryptococcosis cases. Furthermore, additional data on environmental strains is needed since information about these isolates represents useful tool for the establishment of epidemiological antifungal breakpoints. It is recognized that the reference micro dilution methods are not suitable for detect resistance to AMB, and time-kill methodologies have been proposed to obtain a clearer understanding of the killing patterns of AMB. The objective of this study was to determine the susceptibility and molecular types of 55 isolates of *C. gattii*, including 90.9% clinical and 9.1% environmental isolates) obtained in the State of São Paulo, Brazil. We used the PCR-RFLP to determine the molecular types, and the european reference methodology (AFST-EUCAST) to determine FLU and AMB minimal inhibition concentration (MIC). In addition, we perform time-kill curves using 1 mg of AMB per liter of RPMI 1640. Most clinical and environmental molecular types was VGII (94% and 60%, respectively), followed by VGI. The MICs of FLU ranged from 1 to 64 mg/L, with MIC<sub>0</sub> and MIC<sub>90</sub>, 8 and 16mg/L, MICs encompassing 50% and 90% of the isolates tested, respectively. We observed high MIC (> 8 mg/L) for 74% VGII and 50% VGI. For AMB the MICs were homogeneous and low, ranged between 0.12 and 0.5 mg/L (MIC<sub>50</sub>=MIC<sub>90</sub>, 0.5 mg/L). Time-kill curves study showed distinct fungicidal effects indicating that the majority (71%) of 54 isolates was killed until the first 6 hours of exposition reaching 86% after 12h-exposition. It was found that 3.6% at 48h-exposition time to AMB. The re-growth effect was observed for 20/55 strains; 38.1% of isolates after 48h exposition time to the drug. All isolates VGI died in the

initial period of 6 h. The time-kill curves in comparison to the microdilution method showed higher power of discriminate resistant strains to AMB, suggesting that the death rate is strain-dependent and possibly molecular type-dependent. The finding of viable cells after long periods ( $\geq 48$  hours) of exposure to AMB may be related to the occurrence of drug-tolerant strains, as previously reported in the literature. Of note, in this study, we observed high frequency of high FLU-MICs for isolates of *C. gattii*. The medical relevance of these *in vitro* results may be ascertaining in future clinical studies.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism - Polimorfismo de tamanho de fragmentos amplificados
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
AMB	Anfotericina B
ATCC	American type culture collection
°C	Graus Celsius
CC	Controle de Crescimento
CE	Controle de Esterilidade
CIM	Concentração Inibitória Mínima
Cfr 13I	Enzima de restrição obtida pelo gene de <i>Citrobacter freundii</i> RFL 13
CGB	Meio de cultura de cavanina-glicina-azul de bromotimol
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
<i>C. gattii</i>	<i>Cryptococcus gattii</i>
<i>C. neoformans</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
DO	Densidade ótica
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetra-acético
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FLU	Fluconazol
Hhal	Enzima de restrição obtida pelo gene de <i>Haemophilus haemolyticus</i> (ATCC 10014)
HIV	Human Immunodeficiency Vírus - Vírus da imunodeficiência humana
L	litro
mg	miligramas
MOPS	Ácido 3-morfolinopropano-1-sulfônico
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards

PCR	Polymerase Chain Reaction - Reação em cadeia da polimerase
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphisms - Análise de fragmentos de DNA gerados por enzimas de restrição
RNA	Ácido ribonucléico
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute (meio quimicamente definido composto por aminoácidos e vitaminas)
Sau96I	Enzima de restrição obtida pelo gene de <i>Staphylococcus aureus</i> PS96 (ATCC 49831)
SJ01	<i>Primer</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
sp.	espécie
spp.	espécies
TBE	Tampão Tris-Borato-EDTA
TKC	time kill curves- tempo de morte
UFC	unidade formadora de colônia
URA5	Gene da enzima ortidina monofosfato pirofosforilase

## LISTA DE FIGURAS, TABELAS, QUADROS E APÊNDICES

Figura 1 - Ciclo de Infecção para Criptococose	18
Figura 2 - Correlação taxonômica, molecular, epidemiológica e clínica entre as espécies do complexo <i>C. neoformans/C. gattii</i>	22
Figura 3 - Isolamento global de <i>C. gattii</i> de fontes clínica humana, veterinária, e ambiental	23
Figura 4 – Mapa do Brasil apresentando duas macro regiões (Nordeste e Sudeste) e distribuição dos tipos moleculares e número de isolados	24
Figura 5 – Fluxograma de identificação de <i>C. gattii</i>	35
Figura 6 – Gel de agarose representativo contendo os tipos moleculares clínicos e ambientais de <i>C. gattii</i> . Linhas 1 e 2: fragmentos característicos de <i>Cryptococcus</i> spp. (PCR e primers <i>URA5 SJ01</i> ). Linhas 3-8: fragmentos obtidos por RFLP (enzimas <i>Cfr13I</i> e <i>HhaI</i> ). Linha M: marcador de peso molecular de 100 bp	39
Figura 7 - Exemplo de placa de microtitulação contendo concentrações (mg/L) de fluconazol para determinação de CIM. C+: controle-positivo, C-: controle-negativo	42
Figura 8 - Placas de Petri em testes de curvas de morte, ilustrando a diminuição do número de colônias de <i>C. gattii</i> (ufc/mL) segundo tempo de exposição a 1 mg/L de anfotericina B. T0, tempo zero; T6, 6 h; T12, 12 h; T24, 24 h; T48, 48h; T72, 72h de exposição	43
Figura 9 - Distribuição dos tipos moleculares de <i>C. gattii</i> de 55 amostras clínicas e ambientais	44
Figura 10 - Gel de agarose contendo os tipos moleculares dos isolados clínicos e ambientais de <i>C. gattii</i> por técnica de PCR-RFLP	45
Figura 11 - Curvas de morte de 50 isolados clínicos de <i>C. gattii</i> testados com 1mg L <sup>-1</sup> de anfotericina B	48
Figura 12 - Curvas de morte de 5 isolados ambientais de <i>C. gattii</i> testados com 1mg L <sup>-1</sup> de anfotericina B	49
Tabela 1 – Susceptibilidade, em valores de concentração inibitória mínima (CIM) a fluconazol e anfotericina B de 55 isolados de <i>C. gattii</i> , segundo origem e tipos moleculares	46

Tabela 2 - Efeito fungicida de anfotericina B (1mg/L) sobre 55 isolados de <i>C. gattii</i> por metodologia de curvas de morte	47
Tabela 3 – Tipos moleculares de <i>C. gattii</i> que tiveram efeito fungicida a anfotericina B segundo concentração inibitória mínima	50
Tabela 4 – Concentração inibitória mínima de isolados do tipo molecular VGII que tiveram recrescimento em curvas de morte	50
Quadro 1- Tipos moleculares de <i>C. gattii</i> no Brasil	25
Quadro 2 – Isolados ambientais de <i>C. gattii</i>	36
Quadro 3 – Isolados de <i>C. gattii</i> sem efeito fungicida a anfotericina B em testes de curvas de morte segundo CIM	48
Apêndice 1 – Dados dos 50 isolados clínicos de <i>C. gattii</i>	73
Apêndice 2 - Tipos moleculares e susceptibilidade a antifúngicos de 55 isolados clínicos e ambientais de <i>C. gattii</i>	75

## **ÍNDICE**

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>17</b>
1.1 Caracterização dos agentes etiológicos da criptococose	19
1.1.2 Caracterização molecular	21
1.2 Ecologia	26
1.3 Tratamento da Criptococose	27
1.4 Resistência dos agentes da criptococose aos antifúngicos	29
1.5 Testes de Sensibilidade a Antifúngicos	30
1.5.1 Teste de microdiluição	30
1.5.2 Curvas de morte	31
<b>2.OBJETIVOS</b>	<b>33</b>
2.1 Geral	33
2.2 específicos	33
<b>3. MATERIAIS e MÉTODOS</b>	<b>34</b>
3.1 Isolados clínicos e ambientais de <i>C. gattii</i>	34
3.1.2 Identificação de gênero e espécie dos isolados ambientais	34
3.1.3 Isolados clínicos	36
3.1.4 Cepas padrão	37
3.2 Análise molecular	37
3.2.1 Fase pré-analítica	37
3.2.1.1 Obtenção de protoplastos	37
3.2.1.2 Lise celular	38
3.2.2 Fase analítica	38
3.2.2.1 Técnicas de PCR e PCR-RFLP	38
3.3 Determinação da susceptibilidade	40
3.3.1 Microdiluição	40
3.3.2 Curvas de morte	42
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>44</b>
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>51</b>

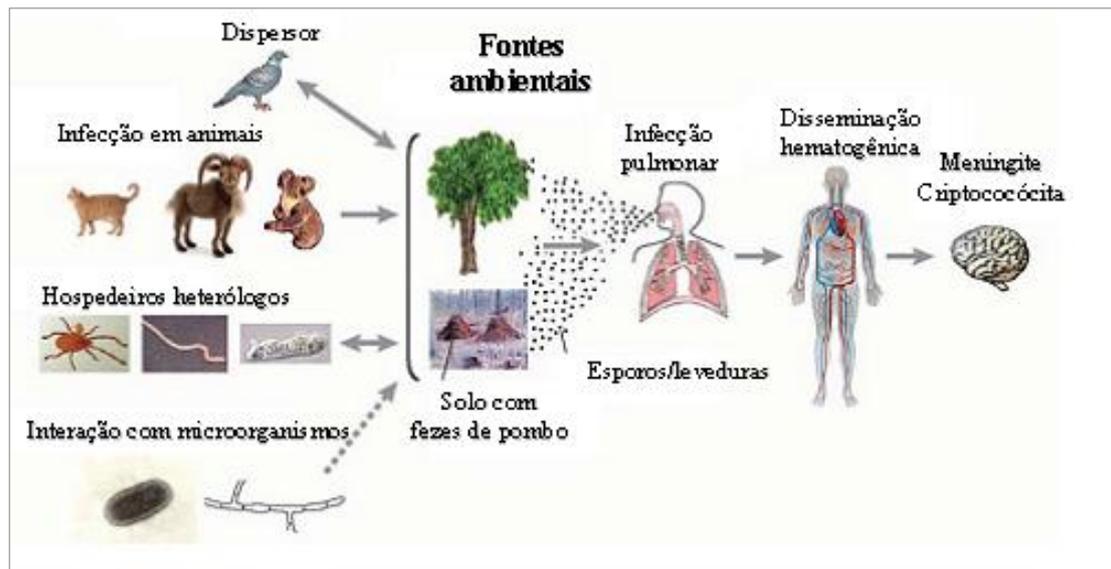
<b>6. CONCLUSÕES</b>	<b>57</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>58</b>
<b>8. APÊNDICES E ANEXOS</b>	<b>72</b>

## 1.Introdução

A ocorrência das infecções fúngicas invasivas está aumentando em todo mundo, principalmente, em indivíduos imunocomprometidos. Ainda pouco se sabe sobre a epidemiologia global dessas infecções, mas muitos patógenos são considerados emergentes e reemergentes causando doença em indivíduos que tenham, ou não, defeito imune identificável (Casadevall e Perfect, 1998).

A criptococose é uma importante micose sistêmica, que pode ser de caráter oportunista a depender da espécie, causada por leveduras capsuladas, pertencentes ao filo Basidiomiceto. Dentro do gênero *Cryptococcus* existem, aproximadamente, 37 espécies descritas, porém, *C. neoformans* e *C. gattii* destacam-se como agentes etiológicos mais comuns da criptococose humana e animal, sendo mais raros os casos diagnosticados por outras espécies, como *C. laurentii* e *C. albidus*. Infecções por *C. gattii* em pacientes e animais podem ser graves e, frequentemente, fatais se não tratadas (Meyer e Trilles, 2010; Byrnes et al., 2011; Harris et al., 2011).

A criptococose é iniciada por meio da inalação de propágulos do fungo, dispersos no ambiente, leveduras desidratadas ou basidiósporos depositados nos alvéolos pulmonares e, do pulmão, se dissemina por via hematogênica para tecido cutâneo, órgãos internos e ou sistema nervoso central, onde se observa a forma clínica mais comum da micose, a meningoencefalite (Mitchell e Perfect, 1995; Lin e Heitman, 2006) (Figura 1).



**Figura 1.** Ciclo de infecção para criptococose adaptado de Lin e Heitman, 2006.

De forma semelhante a *C. neoformans*, *C. gattii* causa, principalmente, doenças pulmonares e meníngeas, e, distintamente de *C. neoformans*, tende a produzir mais criptococoma (nódulos tumorais) do que doença difusa (Pappas et al., 2001; Sorrel 2001; Perfect, et al., 2002).

Infecções pela espécie *C. neoformans* ocorrem em todo o mundo, sendo uma importante causa de morbidade e mortalidade em imunodeprimidos especialmente pacientes com AIDS. A criptococose antes da era AIDS era considerada uma doença esporádica, relacionada geralmente como uma deficiência na imunidade celular, ocorrendo em um pequeno percentual da população (Kwon-Chung e Bennett, 1992).

A partir dos anos 80 com o advento da pandemia da AIDS e utilização de fármacos imunossupressores, houve aumento na incidência da criptococose, sendo esta, atualmente, uma infecção fúngica de prevalência associada à AIDS. No Brasil ocorre em taxas variadas, de 6% a 48% dos indivíduos com AIDS (Pappalardo e Melhem, 2003).

Infecção por *C. gattii* tem sido associada com hospedeiros imunocompetentes mas, também, em imunocomprometidos (Kwong-Chung e Bennett, 1992; Mitchell et al., 1995; Speed et al., 1995; Lazera et al., 2000; Chen et al., 2000; Chen et al., 2010). Recentes evidências, da África sub-Saariana e de outros lugares, indicaram que, de 2,2% a 12,3% dos casos de criptococose em indivíduos infectados pelo HIV,

foram devido a *C. gattii*, mostrando que infecções por *C. gattii* em hospedeiros imunocomprometidos não são incomuns (Chatudervi et al., 2005; Morgan et al., 2006; Lindenberg et al., 2008; Harris et al., 2011). Steele e colaboradores 2010, relatam em Botswana (África) a maior proporção (30%) de infecção por *C. gattii* em uma população infectada pelo HIV, até o momento.

*C. gattii* foi considerado restrito a regiões tropicais e subtropicais até a ocorrência de surtos em regiões de clima temperado, no sudoeste do Canadá (ilha de Vancouver), e noroeste dos Estados Unidos, o que sugere a habilidade desta espécie em se adaptar a novos ambientes (Kidd et al., 2004; Byrnes et al., 2011; Trilles et al., 2011). Recentes estudos epidemiológicos globais sugerem que a espécie *C. gattii* é um patógeno fúngico emergente com possibilidade de expansão de áreas geográficas e nichos ambientais (Byrnes et al., 2011).

### 1.1. Caracterização dos agentes etiológicos da criptococose

O agente etiológico da criptococose era classificado, anteriormente, em apenas uma espécie, contendo duas variedades, mas hoje, sustenta-se a ideia de duas espécies: *C. neoformans* e *C. gattii* pelas diferenças filogenéticas e características fenotípicas e metabólicas (Diaz et al., 2000; Boekhout et al., 2001; Kwon-Chung et al., 2002; Kwon-Chung e Varma, 2006).

Dois tipos sexuais distintos desses agentes são conhecidos: *mating-type*  $\alpha$  e  $\alpha$  que, quando cruzados reproduzem a fase perfeita sexuada ou teleomórfica desta levedura. O fungo foi classificado como basidiomiceto pertencente ao gênero *Filobasidiella*. Sendo assim, denominado *Filobasidiella neoformans* e *Filobasidiella bacillispora* respectivamente para *C. neoformans*, e *C. gattii* (Kwong-Chung 1976).

A reprodução sexuada ocorre por conjugação e é conhecida apenas *in vitro*, entretanto ambos *mating-types* podem coexistir em um mesmo nicho, o que possibilitaria cruzamentos naturais (Lazera et al., 2000). O *mating-type*  $\alpha$  é prevalente em amostras clínicas e ambientais (Springer e Chatudervi, 2010), e é mais virulento para animais de laboratório (Kwong-Chung, et al., 1992).

As células de *C. neoformans* e *C. gattii* são estruturas globosas ou ovóides que medem de 3 a 8  $\mu\text{m}$ , envolvidas por uma cápsula mucopolissacáridea composta

principalmente por glucuronoxilomanana que permite a classificação de cinco sorotipos: A, B, C, D e AD. O grau de encapsulamento depende do tipo molecular e de fatores ambientais, sendo observadas cápsulas pequenas, ambientais, e espessas na maioria das cepas clínicas. Podem apresentar em cepas raras pseudohifas curtas e a reprodução se dá por brotamento único, ou múltiplo, com colo estreito (Kwon-Chung e Bennett, 1992; Mitchel e Perfect, 1995).

Cepas de *Cryptococcus* crescem em temperaturas que variam de 25 °C a 40 °C com temperatura ótima de 30 °C. As colônias, em geral, são lisas, mucóides, de coloração branca a creme sendo observadas após 48h à 72h de incubação. A mucosidade da colônia está relacionada à espessura da cápsula (Kwon-Chung e Bennett, 1992).

Compostos como cicloheximida são inibidores de *Cryptococcus* spp. Quanto ao metabolismo, uma das características do gênero é a produção de urease. Esses fungos não fermentam carboidratos, nem assimilam lactose, melibiose e nitrato de potássio, mas assimilam glicose, maltose, sacarose, galactose, inositol, xilose, trealose, dulcitol, manitol e peptona (Larone, 1995). A partir de compostos difenólicos, em especial: ácido caféico, que se decompõe ou outro como, ácido clorogênico, L-dopa, dopamina, norepinefrina, epinefrina produzem melanina, que se difunde formando colônias marrons, dentro de cinco dias de incubação, em meios com tais substratos (Kwon-Chung e Bennett, 1992).

Leveduras pertencentes a este gênero são produtoras de urease e, na microscopia da amostra biológica com tinta da China, é possível a observação do contorno da cápsula, pois este reagente não penetra na mesma (Kwon-Chung e Bennett, 1992).

Fenotipicamente distinguem-se com base no sorotipo capsular, pois *C. gattii* possui os sorotipos B e C, enquanto *C. neoformans* possui os sorotipos A, D e AD. Vários estudos foram desenvolvidos para elaborar meios seletivos para distinguir diferenças bioquímicas entre as espécies causadoras da criptococose. Kwong-Chung e colaboradores (1982) descreveram ágar à base de L-canavanina, glicina e azul de bromotimol (CGB), verificando que todas as amostras de *C. gattii* crescem no meio CGB e assimilam a glicina, modificando o pH e mudando a cor do meio de cultura para azul-cobalto. A determinação exata da espécie e tipo molecular é

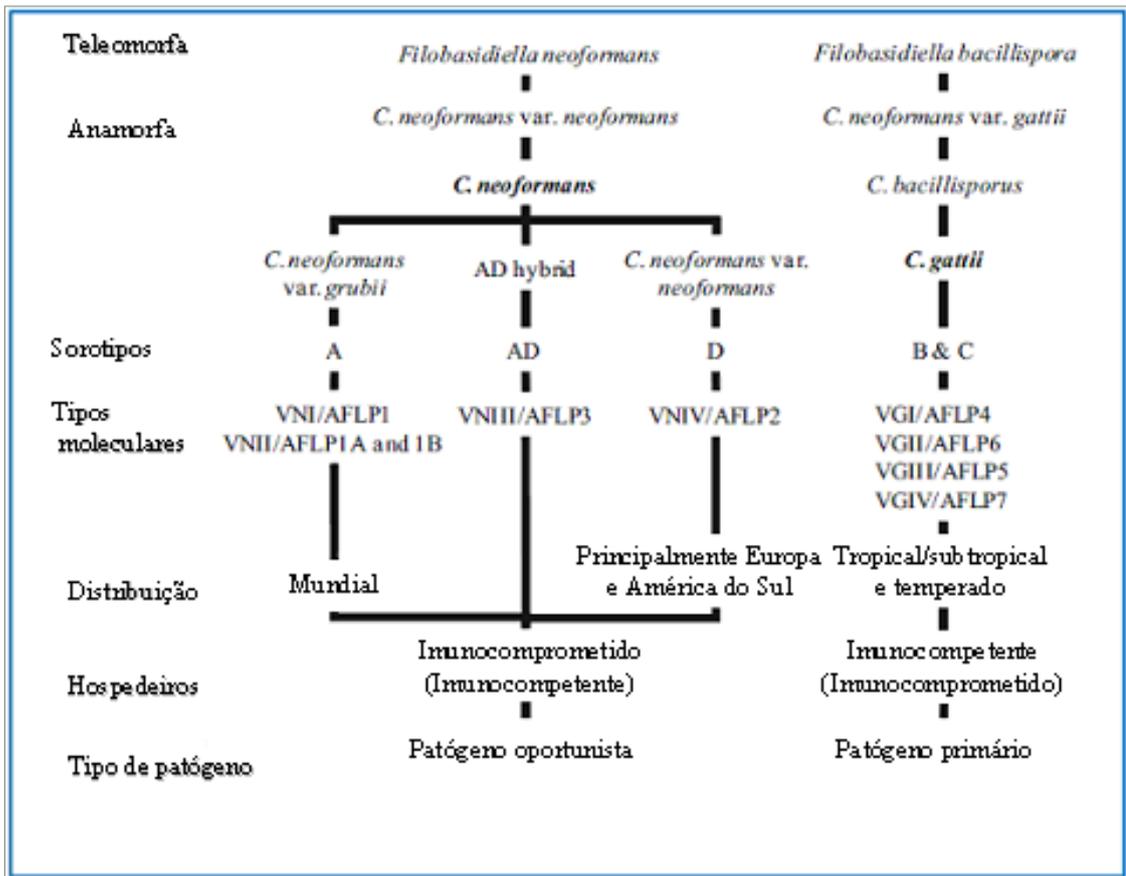
importante porque pode caracterizar diferenças na virulência ou na suscetibilidade aos agentes terapêuticos.

### 1.1.2. Caracterização molecular dos agentes etológicos da criptococose

As técnicas de biologia molecular têm contribuído em fornecer informações sobre aspectos epidemiológicos, distinção entre cepas, dados importantes para determinar recidivas ou novas infecções. Desta forma um grande número de técnicas vem sendo desenvolvidas, como análises de fragmentos de DNA (ácido desoxirribonucleico) gerados por enzimas de restrição (RFLP), análise eletroforética do cariotipo celular em campo pulsátil (PFGE), cariotipagem, análise por DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD), sequenciamento de DNA, reação em cadeia da polimerase (PCR) fringerprinting, polimorfismo de tamanho de fragmentos amplificados (AFLP). Estas técnicas têm revelado grande heterogeneidade genética entre as espécies de *Cryptococcus* (Boekhout et al.,1997; Diaz et al., 2000; Boekhout et al., 2001; Meyer et al., 1999; 2003).

A técnica de RFLP é comumente empregada para a diferenciação entre cepas de uma mesma espécie, propiciando a determinação do tipo molecular das cepas de *Cryptococcus* spp. Esta técnica visa identificar diferenças na sequência de DNA e pode ser realizada associada à PCR. Assim, um determinado fragmento gênico é amplificado com *primers* específicos e, posteriormente, é submetido à ação de enzimas de restrição que cortam este gene em sítios determinados, produzindo fragmentos de DNA com sequências específicas (Pasa, 2011).

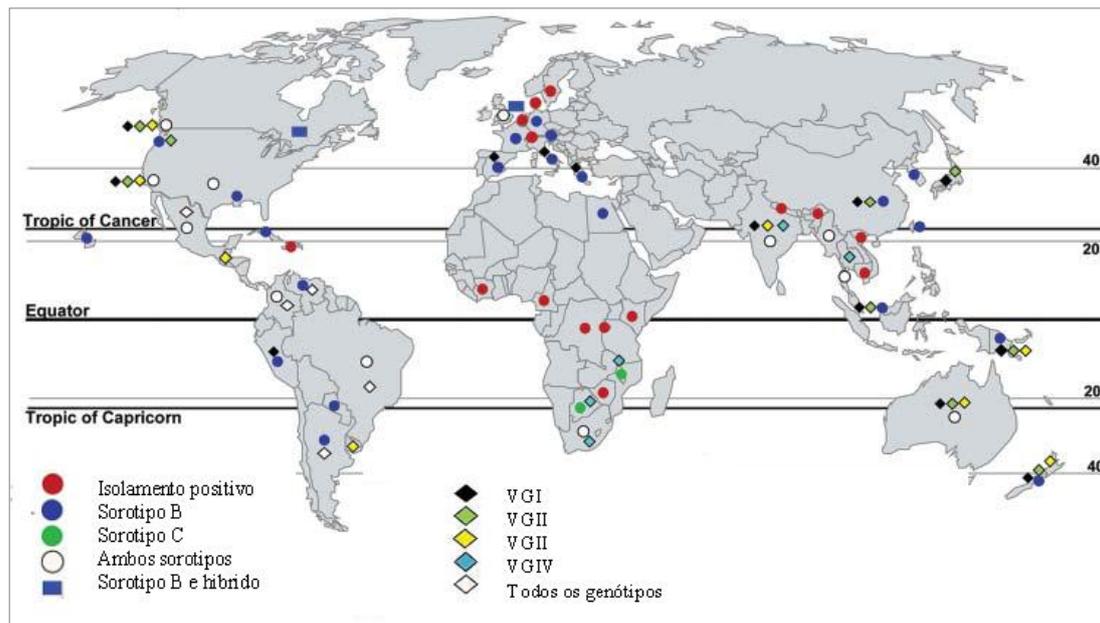
Em 1999, Meyer e colaboradores identificaram oito tipos moleculares pela técnica de PCR-*fingerprinting*. *C. neoformans* pode ser classificado como *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A e tipos moleculares VNI e VNII), *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipos D e tipos moleculares VNIV) e a forma híbrida diplóide sorotipo AD (genótipo VNIII). Para *C. gattii*, são reconhecidos os sorotipos B e C e os tipos moleculares VGI, VGII, VGIII e VGIV (Meyer et al., 1999; 2009) (Figura 2).



**Figura 2.** Correlação taxonômica, molecular, epidemiológica e clínica entre as espécies do complexo *C. neoformans/C. gattii* adaptado de Meyer e Trilles, 2010.

Os tipos moleculares de *Cryptococcus* diferem em suas características epidemiológicas e ecológicas, apresentações clínicas e resposta terapêutica (Sorrell, 2001).

A frequência e diversidade dos tipos moleculares de *C. neoformans* e *C. gattii* varia de acordo com a área geográfica. A distribuição mundial pode ser observada na figura 3.

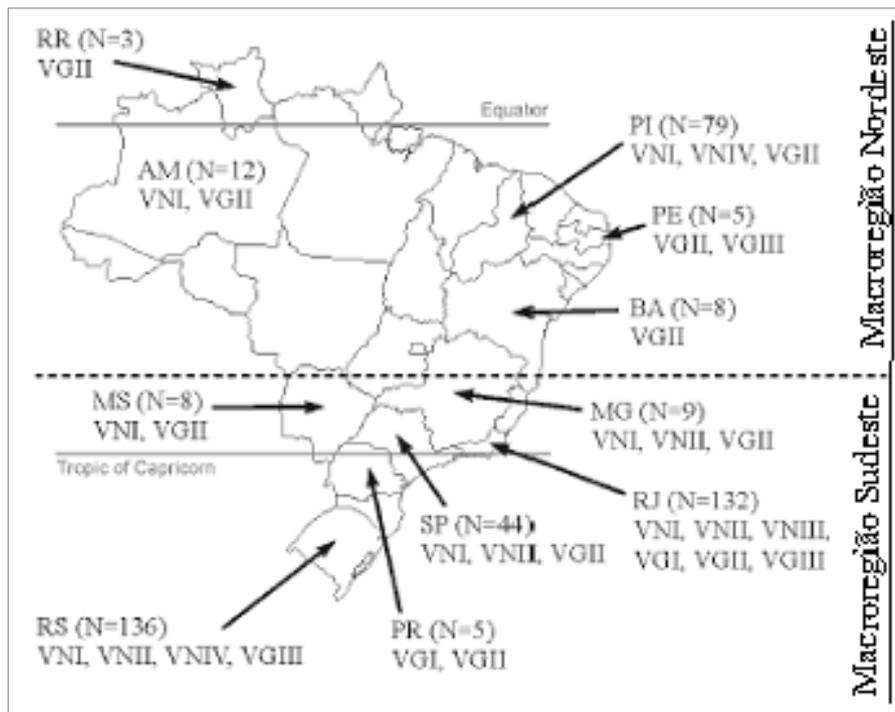


**Figura 3.** Isolamento global de *C. gattii* de fontes clínica humana, veterinária, e ambiental adaptado de Springer e Chaturvedi, 2010.

A prevalência global de infecções pelos quatro tipos moleculares de *C. gattii* é mais baixa, totalizando 20%, quando comparado com *C. neoformans* 80%. *C. gattii* tem alta prevalência no continente americano e no hemisfério sul. Isolamento ambiental e clínico de *C. gattii* é raro na Europa incluindo Rússia e partes da Ásia, especialmente China, Tailândia e Japão (Meyer e Trilles, 2010).

A maioria das infecções por *C. gattii* são causadas pelo tipo molecular VGI e VGII (Meyer e Trilles, 2010). O surto na América do Norte por *C. gattii*, no final dos anos 90 deveu-se em grande parte, a três clones genéticos do subtipo molecular VGII, designados: VGIIa (mais comum), VGIIb e VGIIc, sendo o último descrito apenas nos Estados Unidos (Harris et al., 2011).

No Brasil há poucos estudos sobre a distribuição dos tipos moleculares de *C. neoformans* e *C. gattii* e a excelente revisão de Trilles e colaboradores traz um mapa ilustrando os dados publicados (Figura 4).



**Figura 4.** Mapa do Brasil apresentando duas macro regiões (Nordeste e Sudeste) e a distribuição dos tipos moleculares e número de isolados segundo Trilles et al., 2008.

A prevalência dos genótipos do Brasil foram VNI (64%), seguido por VGII (21%), VNII (5%), VGIII (4%), VGI e VNIV (3% cada) e VNIII (<1%). Criptococose primária, causada pelo tipo molecular VGII (sorotipo B) prevalece em imunocompetentes em casos da região Norte e Nordeste do país, revelando um padrão endêmico regional para este tipo molecular.

A presença de *C. gattii* (VGII) no estado do Pará, Norte do Brasil foi relatada, assim como outros tipos moleculares, sendo 54 isolados de fluído cerebrospinal e dois de culturas de sangue. Nesse estudo, os autores diagnosticaram 43 casos entre 2003-2007, e identificaram *C. neoformans* VNI (28/56, 50%), *C. gattii* VGII (25/56, 44,64%) e *C. gattii* VGI (3/56, 5,26%) (Santos et al., 2008).

O Quadro 1 sintetiza as publicações com caracterização genotípica no período de 2006 a 2012 de isolados clínicos e ambientais de *C. gattii* no Brasil.

**Quadro 1.** Estudos realizados para tipagem molecular de *C. gattii* no Brasil

Local	Tipo de amostra	Tipo molecular	Referências
<b>Brasil</b>			
	clínica e ambiental	VGI, VGII e VGIII	Trilles et al., 2008
	clínica e ambiental	VGII e VGIII	Leal et al., 2008
<b>Norte</b>			
Pará	clínica	VGI e VGII	Santos et al., 2008
Pará	ambiental	VGII	Costa et al., 2009
<b>Nordeste</b>			
Bahia	clínica	VGII	Matos et al., 2012
<b>Centro-oeste</b>			
Goiás	ambiental e clínica	VGIII	Souza et al., 2009
<b>Sudeste</b>			
Minas Gerais	clínica	VGII	Mora et al., 2010
Paraná	Clínica e ambiental	VGI	Lugarini et al., 2008
<b>Sul</b>			
Rio Grande do Sul	clínica	VGIII	Faganello et al., 2009
Rio Grande do Sul	ambiental	VGI	Abegg et al., 2006

O interesse no estudo das características fenotípicas de *C. gattii* contribui para o conhecimento específico dos aspectos ecológicos variáveis do fungo, em relação a seu ciclo de desenvolvimento e multiplicação (Ohkusu et al., 2002) bem como seu papel como patógeno em hospedeiros, imunocompetentes. A variabilidade genética entre isolados desta espécie pode estar relacionada com perfis distintos de resistência aos antifúngicos e, por isso, justifica seu estudo.

## 1.2. Ecologia

Durante a fase saprofítica do ciclo biológico, *C. gattii* permanece no ambiente dentro do solo, associado, principalmente, a excrementos de pombos, e material vegetal em decomposição, ou a ocos de árvores vivas. Pássaros, especialmente pombos, podem ter sido responsáveis pela dispersão em todo mundo. O fungo infecta diversos hospedeiros animais, tais como gatos, cabras e coalas; também pode sobreviver em predadores ambientais, tais como insetos, nematóides e amebas, e pode interagir com outros microorganismos, como bactérias e outros fungos (Casadeval et al., 2003; Lin e Heitman, 2006).

A dispersão de *C. gattii* na América do Norte, vindo do recente surto no Canadá, sugere que árvores e madeiras de exportação, bem como, correntes de ar, e ou de água e fontes bióticas tais como pássaros, insetos e outros animais podem atuar como vetores para a propagação do agente etiológico para outras regiões do mundo, longe de sua região original endêmica (Springer e Chatudervi, 2010).

A forma de vida, saprófita e ubíqua, de *Cryptococcus* intriga os pesquisadores a respeito de como, e por que, esse patógeno humano se associa a plantas e de que forma o ambiente influencia no seu ciclo de vida. Acredita-se que o fungo, principalmente *C. gattii*, estabeleça esse tipo de relação para completar seu ciclo biológico pelo processo de *mating*, pois foi observado que componentes como inositol e ácido indol-acético, existentes em plantas do gênero *Arabidopsis* e *Eucalyptus*, estimulem a reprodução sexuada do fungo (Xue et al., 2007).

O primeiro isolamento ambiental de *C. gattii* foi de material associado com árvores de eucaliptos (*Eucalyptus camaldulensis*), sugerindo uma associação entre este vegetal e o fungo e, conseqüentemente, a áreas rurais (Ellis e Pfeiffer, 1990). Estes aspectos, atualmente, não são considerados na ecologia de *C. gattii*.

Springer e Chatudervi, 2010 revisaram o isolamento de *Cryptococcus gattii* em árvores, e encontraram 54 espécies de árvores com a presença do fungo, evidenciando que provavelmente o material vegetal em decomposição seja o seu nicho ecológico primário desde que tem a habilidade de produzir enzimas lacases, importantes para a degradação da lignina, o que permitem sua colonização em matéria orgânica dentro de ocos (Lazera et al., 1998; Fortes et al., 2001; Hagen et al., 2010) portanto, não há relação entre *C. gattii* e uma árvore específica.

Contudo, outras fontes têm sido demonstradas como: fezes de morcegos em sótão de casa antiga (Lazera et al., 1993), em solo (Firacative et al, 2011), em excrementos de aves (Abegg et al., 2006) ou compartilhando o mesmo biotipo (oco de árvore ou solo) com *C. neoformans* (Costa et al., 2009; Lazera et al., 2000; Firacative et al, 2011).

Estudo realizado por Bovers e colaboradores (2006) demonstrou o isolamento de um espécime clínico híbrido BD, sugerindo a ocorrência natural do cruzamento entre *C. neoformans* (sorotipo D) e *C. gattii* (sorotipo B). Assim, muitas evidências sugerem que *C. neoformans* e *C. gattii* possam ocupar o mesmo nicho ecológico relacionado à madeira e decomposição.

### 1.3 Tratamento da Criptococose

A escolha do tratamento da doença depende da imunidade e doença de base do paciente, do sítio de infecção e da toxicidade do antifúngico (Perfect et al., 2010). O tratamento consiste em uma fase de indução por duas semanas, com uma combinação de anfotericina B (AMB) e 5-fluocitosina (que, atualmente não é comercializada no Brasil), seguida por 10 semanas de terapia de consolidação e completada com terapia de manutenção, ou profilática com fluconazol (FLU) nos casos com alto risco de recidiva da infecção (Consenso em Criptococose, 2008; Perfect et al., 2010).

O objetivo da fase de indução é reduzir drasticamente ou levar a resultados negativos a carga fúngica em período mínimo de duas semanas. Na fase de consolidação é necessário manter resultados negativos para pesquisa do agente e alcançar a normalização dos parâmetros clínicos e laboratoriais por, pelo menos, oito semanas. A fase de manutenção (terapia profilática) depende do estado imunológico do paciente e compreende o período mínimo de um ano (Consenso em Criptococose, 2008).

A ação de um antifúngico depende da concentração e do tempo de exposição podendo agir como fungistático, apenas inibindo o crescimento, ou fungicida causando a morte celular.

AMB, descoberta em 1956 por Gold e colaboradores, é produzida a partir do *Streptomyces nodosus* e faz parte do grupo de antibióticos macrolídeos poliênicos. Seu mecanismo de ação consiste na ligação ao ergosterol, presente na membrana dos fungos. Esta interação provoca a formação de poros e canais, aumentando a permeabilidade celular, interferindo nas funções de transporte, causando perturbações metabólicas e consequente morte celular. Este mecanismo de ação explica grande parte da toxicidade do polieno, pois ocorre sua ligação, também, aos esteróis da membrana plasmática humana, como o colesterol (Richardson e Warnock, 1993; Bennett, 2003; Rang et al., 2004). A absorção oral da AMB é mínima (5%) e, por ser pouco absorvida pelo trato gastrointestinal ela deve ser administrada, exclusivamente, por via endovenosa. Esse fármaco é complexado com desoxicolato de sódio, porém, existem preparações lipídicas como solução coloidal e encapsulamento em lipossomas. Estas formulações lipídicas causam menos efeitos indesejáveis, entretanto, o custo é consideravelmente mais alto, e, desta forma, deve ser feita uma avaliação do custo-benefício em cada caso específico (Bennett, 2003; Rang et al., 2004).

Os antifúngicos azólicos imidazólicos, constituem um grupo de agentes fungistáticos sintéticos que inibem a enzima 14- $\alpha$ -demetilase do sistema do citocromo P450 codificada pelo gene *ERG11*. Esta enzima tem participação na síntese do ergosterol. Com a diminuição da formação do ergosterol da membrana ocorre interferência na ação das enzimas ligadas na membrana, há inibição da replicação fúngica. A essa ação fungistática, segue-se a ação fungicida dos azóis, por acúmulo de esteróis precursores do ergosterol, que são tóxicos para a célula fúngica. Os triazólicos mais utilizados na criptococose são FLU e itraconazol (Richardson e Warnock, 1993; Bennett, 2003; Rang et al., 2004; Chen e Sorrel, 2007).

FLU apresenta boa biodisponibilidade oral, além de poder ser administrado por via endovenosa. Difunde-se, rapidamente, pelos tecidos atingindo concentrações séricas e teciduais elevadas (Chen e Sorrel, 2007; Richardson e Warnock, 1993).

#### 1.4 Resistência dos agentes da criptococose aos antifúngicos

A terapia de manutenção, realizada a longo prazo com derivados azólicos pode levar, ao aparecimento de isolados multirresistentes, falha terapêutica e recaída (Graybill et al., 1998; Perfect e Cox, 1999).

Os mecanismos mais comuns de resistência a azólicos têm sido estudados, extensivamente, em *Saccharomyces cerevisiae* e espécies patogênicas de *Candida*, como: *C. albicans* e *C. glabrata*. Estas espécies são filogeneticamente distantes de *C. neoformans*. Mas sabe-se que nelas ocorrem vários mecanismos que podem estar envolvidos com resistência, incluindo: o menor acúmulo intracelular de antifúngicos azólicos, associado com maior expressão gênica de proteínas de efluxo celular, superprodução de enzima alvo dos azóis, implementação de vias metabólicas alternativas e/ou alterações na molécula 14- $\alpha$ -demetilase (Sionov et al., 2009).

Pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares responsáveis pela resistência aos azóis em *Cryptococcus*, exceto para mutação no *ERG11* relatada em cepa isolada de um paciente com AIDS que foi associada a quadro de meningoencefalite criptocócica recidivante (Rodero et al., 2003). Estudos recentes demonstraram que a resistência aos azólicos, nessa espécie de levedura, também pode ser devido à heteroresistência, designada como o aparecimento, dentro de uma cepa sensível, subpopulação resistente, de que pode tolerar concentrações de FLU maiores do que a CIM da cepa. Heteroresistência de *C. neoformans* parece envolver aneuploidias cromossômicas e, portanto, o número de cópias de genes de resistência, incluindo *ERG11*, fica aumentado na vigência desse fenômeno. Este mecanismo pode, portanto, resultar em elevada transcrição do *ERG11* com maior produção da enzima 14- $\alpha$ -demetilase (Sionov et al., 2009; Sionov et al., 2010; Varma e Kwon-Chung, 2010).

Outro mecanismo molecular de resistência ao FLU descrito em *C. neoformans* é o efluxo do antifúngico provocado por bombas de efluxo. Embora numerosos genes do genoma desta espécie tenham sido associados a bombas de efluxo, até a data apenas um dos transportadores ABC, AFR1, tem sido atribuído a efluxo de FLU (Posteraro et al., 2003)

Os mecanismos de resistência para AMB em *C. neoformans* são mal compreendidos, apesar da sua utilização desde os anos 1960. Além disso, a ligação entre mutações genéticas em *Cryptococcus* spp. e CIMs elevadas deste agente ainda não foi determinada. O teste de sensibilidade por metodologia M27-A3 demonstraram que MICs elevados para *C. neoformans* foram preditivos de falha clínica para os azólicos e, em menor grau para o polienos (Perfect e Cox, 1999). CIMs de AMB  $\geq 2$  mg / ml foram associada à falha clínica, foram descritas mutações na enzima alvo, e na via de biossíntese de ergosterol (por exemplo, 5,6-dessaturase), ou um aumento no efluxo da droga a partir da célula fúngica (Joseph-Horne et al., 1996; Kelly et al., 1994). Em isolados polieno resistentes de *Candida* e *Cryptococcus*, o teor do ergosterol foi menor do que em isolados sensíveis (Kelly et al., 1994; Espinel-Ingroff et al., 2012).

Nos últimos anos, diferenças de susceptibilidade *in vitro* entre *C. neoformans* e *C. gattii*, bem como aos tipos moleculares e sorotipos, aos antifúngicos tem sido relatados (Trilles et al., 2011; Espinel-Ingroff et al., 2012), e aparentemente a resposta ao tratamento de infecções causadas por *C. gattii*, necessitam tanto de terapia mais prolongada e/ou intervenção cirúrgica (Byrnes et al., 2011).

Recentes estudos, tem descrito resistência *in vitro* de *C. gattii* aos azólicos, particularmente entre algumas cepas altamente virulentas do tipo molecular VGII responsável pelo surto no noroeste do Pacífico (Hagen et al., 2010; Iqbal et al. 2010). Há dados inconsistentes sobre esta lacuna, mas acredita-se que pode existir diferenças de susceptibilidade a nível de subtipo molecular de *C. gattii* (Cheng et al., 2009).

## 1.5. Testes de Sensibilidade a Antifúngicos

### 1.5.1 Teste de microdiluição

Os métodos para investigação *in vitro* dos fenótipos de resistência são fundamentados em método de referência, desenvolvidos especialmente pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI). Este método tem como base a reação de inibição de crescimento do agente etiológico em meio líquido contendo antifúngicos, denominada microdiluição (CLSI, 2008). O comitê europeu *European Committee for*

*Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) propôs modificações nesse método, no intuito de tornar mais objetiva e reprodutível a leitura do ensaio e diminuir o tempo para emissão de resultados (Cuenca-Estrella et al., 2002; Rodriguez-Tudela et al., 2007). O método produz resultados equivalentes ao do CLSI para o gênero *Candida* (Espinel-Ingroff et al., 2005). Apesar de não ser, ainda referenciada para o gênero *Cryptococcus*, a metodologia do grupo europeu foi empregada para amostras de *C. neoformans* em estudo brasileiro (Dias et al., 2006).

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) é uma ferramenta que tornou-se extremamente útil para decidir o tratamento de pacientes infectados com patógenos fúngicos. Porém o crescimento de leveduras não fermentadoras, como *C. gattii* nos protocolos de teste de sensibilidade a antifúngicos é, em grande parte, comprometida, devido a limitação de oxigênio encontrados nas placas de microdiluição, o meio líquido utilizado e as condições de incubação como temperatura e agitação. Várias modificações das condições padrão têm sido sugeridas para melhorar o crescimento das leveduras nestas condições (Zaragoza et al., 2011).

Ambos os métodos de referência tem acurácia para avaliar fenótipos de resistência ao (FLU) em cepas de *Candida* e *Cryptococcus*, entretanto, é consenso que para (AMB), outras técnicas devem ser empregadas para melhorar o desempenho do método (Park et al., 2006). O método de curvas de morte foi indicado como uma dessas ferramentas que oferece dados mais fidedignos para demonstrar atividade fungicida da AMB. Esta metodologia já foi empregada para amostras de *Candida* spp. e *C. neoformans* (Klepser et al., 1998; Rodero et al., 2000; Pappalardo et al., 2009; Córdoba et al., 2011).

### 1.5.2 Metodologia de Curvas de morte

A metodologia de curvas de morte expressa a porcentagem de micro organismos mortos em função da ação de uma concentração fixa do antifúngico, em condições pré-estabelecidas. Para isso, é realizada uma contagem do número de células viáveis após intervalos periódicos de exposição ao fármaco. Uma figura tipo dose (tempo)-resposta pode ser construída, na base log 10, para ilustrar as

diferentes contagens segundo o período de incubação. O ponto final da reação (*endpoint*) é definido quando a taxa de morte for  $\geq 99,9\%$  em relação ao número inicial de colônias no tempo zero. Trata-se, portanto, de um teste para avaliar a eficácia fungicida, mas a vantagem sobre o método de concentração fungicida mínima é que ele fornece a informação da dinâmica da ação do antifúngico sobre o agente etiológico (Klepser et al., 1998; Rodero et al., 2000; Pappalardo et al., 2009; Córdoba et al., 2011). Por curvas de morte, podem ser ensaiadas várias concentrações do fármaco, como fizeram Klepser e colaboradores (1997;1998), que estudaram a atividade de FLU e AMB contra isolados de *C. albicans* e *C. neoformans*.

Frente aos dados apresentados nota-se que há poucos dados nacionais sobre a distribuição dos tipos moleculares de *C. gattii*, e raros dados do Estado de São Paulo. Portanto, estudo descritivo que analisa tanto os tipos moleculares quanto perfis de suscetibilidade a antifúngicos trariam grande contribuição para esta lacuna.

## **2.Objetivos**

### **2.1 Geral**

Contribuir para o conhecimento da epidemiologia molecular da criptococose causada por *C. gattii*.

### **2.2 Específicos**

- 1.Avaliar a distribuições dos tipos moleculares de cepas de *C. gattii* isoladas de fontes, clínica e ambiental;
- 2.Determinar a frequência de isolados resistentes a fluconazol e anfotericina B, por testes de sensibilidade por microdiluição;
- 3.Avaliar a ação fungicida de anfotericina B, por metodologia de curvas de morte sobre isolados clínicos e ambientais de *C. gattii*;
- 4.Comparar os resultados dos dois métodos.

### **3 Material e Métodos**

#### **3.1 Isolados clínicos e ambientais de *C. gattii***

Foram analisados 55 isolados de *C. gattii*, sendo 50 de origem clínica (1999-2009) e 5 ambiental (1996 e 2011). Estes estão mantidos em glicerol a 15% sob -20 °C na micoteca do Núcleo de Micologia do Instituto Adolfo Lutz (IAL) de São Paulo.

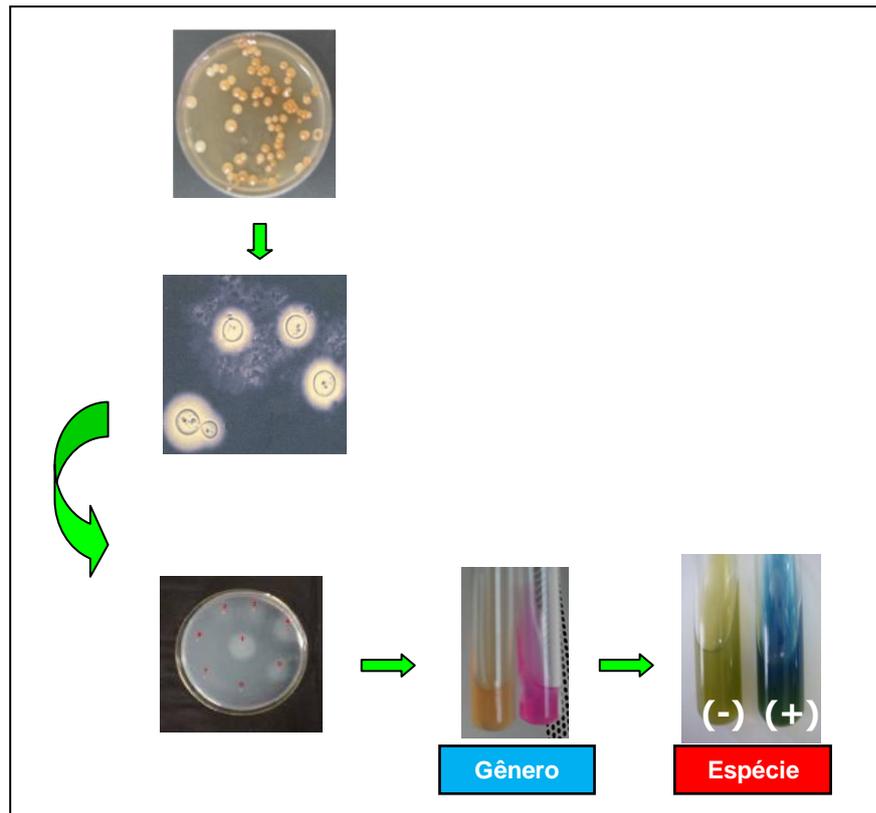
Quatro isolados ambientais foram gentilmente, cedidos pela Profa. Dra. Claudete Rodrigues Paula do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, sendo obtidos, de solo contaminado com fezes de pombo. E a outra amostra foi isolada de fezes pombo na cidade de Araraquara.

O IAL de São Paulo é um laboratório central de saúde pública (LACEN) do governo de Estado de São Paulo que é referência para micoses e mantém, em sua micoteca, isolados clínicos e ambientais de *C. gattii* provenientes de diversas cidades do Estado de São Paulo. Essa condição oferece a oportunidade de estudo de grande número de cepas, representantes das diversas regiões geográficas do Estado.

##### **3.1.2 Identificação de gênero e espécie dos isolados ambientais**

A triagem inicial do gênero *Cryptococcus* spp. foi realizada com a pesquisa da atividade da enzima fenoloxidase em meio de cultura preparado com semente de Níger (*Guizotia abyssinica*). Todas as colônias, de coloração marrom nesses meios, foram repicadas para ágar Sabouraud dextrose (Difco) com cloranfenicol.

A identificação de *Cryptococcus* spp. foi realizada pela análise morfológica com tinta da China, para observação da cápsula. Em seguida, foram realizados testes bioquímicos: a detecção da enzima urease em meio de Christensen, crescimento à 37°C, ausência de fermentação de carboidratos, e perfil de assimilação de fontes de carbono e de nitrogênio. Para identificação da espécie foi realizado o teste do CGB (Canavanina, glicina e azul de bromotimol) como consta na figura 5.



**Figura 5.** Fluxograma de identificação de *C. gattii*.

Das cinco cepas ambientais analisadas neste estudo, 4 (75%) foram provenientes da cidade de São Paulo e 1 (25%) de Araraquara. Quanto ao tipo de amostra, 4 (75%) foram isoladas de solo com fezes de aves e 1 (25%) de fezes de pombo (Quadro 2).

## Quadro 2. Isolados ambientais de *C. gattii*

Número da amostra	Espécie	Tipo de material	Cidade	Ano de Isolamento
ICB-182	<i>C. gattii</i>	Solo com fezes	São Paulo	1996
ICB-183	<i>C. gattii</i>	Solo com fezes	São Paulo	1996
ICB-184	<i>C. gattii</i>	Solo com fezes	São Paulo	1996
ICB-82	<i>C. gattii</i>	Solo com fezes	São Paulo	1996
2G	<i>C. gattii</i>	Fezes de pombo	Araraquara	2011

### 3.1.3 Isolados clínicos

Os isolados clínicos de *C. gattii*, foram provenientes de líquido cefalorraquidiano (98%) e lavado bronco alveolar (2%), de pacientes com criptococose. A maioria dos isolados (76%) foi proveniente de cidades do interior do Estado de São Paulo e o período de isolamento foi de 1994 a 2009 (Apêndice 1). Todos os isolados foram previamente identificados por métodos tradicionais, com base em suas características morfológicas e bioquímicas antes de serem incorporados à micoteca do Núcleo de Micologia do IAL de São Paulo.

Os isolados foram descongelados, plaqueados em ágar cromogênico (Chromagar *Candida*®) para confirmação de pureza e, em ágar níger para confirmação do gênero. Em seguida foi realizada análise morfológica com tinta da China para observação da cápsula, e o teste do CGB para confirmação da espécie. As culturas assim processadas foram submetidas a todos os testes previstos neste estudo.

### **3.1.4 Cepas padrão de *C. gattii***

Para os ensaios moleculares foram utilizadas cepas padrão correspondentes aos quatro tipos moleculares de *C. gattii*: WM 179 (sorotipo B, VGI), WM 178 (sorotipo B, VGII), WM 161 (sorotipo B, VGIII) e WM 779 (sorotipo C, VGIV) gentilmente cedidas pela referência internacional para esta dissertação, Prof. Dr. Wieland Meyer (Universidade de Sydney, Austrália).

## **3.2 Análise Molecular**

### **3.2.1 Fase pré-analítica**

Para a análise molecular, foi aplicada a técnica de PCR, e a de PCR-RFLP. A extração de DNA genômico foi realizada em duas etapas:

#### **3.2.1.1 Obtenção de protoplastos (Branchini et al. 1994, Shin et al., 2001)**

Algumas colônias de leveduras, com crescimento de até 48h, foram removidas para um microtubo tipo Eppendorf contendo 1ml de EDTA 50mM. Cada um dos microtubos foi centrifugado em microcentrífuga a 10.000 rpm por 15'. O sobrenadante foi desprezado e, ao sedimento, foi adicionado 1ml de EDTA 50 mM. Este processo de lavagem foi repetido até que o sobrenadante ficou límpido e foi, então desprezado. Para a digestão da cápsula e parede, as células do sedimento foram ressuspensas em 200 µL de tampão CES (20mM de tampão citrato, pH 5,6; 50mM de EDTA; pH 8,0; 0,9M de sorbitol), contendo 30 µL de enzima lítica obtida de *Trichoderma harzianum* (Sigma). Para tanto, suspensão foi incubada a 37°C por 2h à 3h, sob agitação constante. A seguir, os microtubos contendo os protoplastos foram centrifugados a 5000 rpm por 10 minutos, sob temperatura de 4°C. Foram feitas, a seguir, três lavagens do sedimento com 1mL de tampão CES e, então, o sedimento foi ressuspensão em 200µL de tampão CES.

### 3.2.1.2 Lise Celular (segundo Sambrook et al.,1989)

Aos protoplastos obtidos foi adicionado 200 a 300 µl de tampão de lise. Após homogeneização em vórtex, o material foi incubado em banho maria a 50°C, por 2 horas, com agitação em vórtex a cada 30'. Posteriormente, o material foi centrifugado por 5' e o sobrenadante foi retirado para outro microtubo. Ao sobrenadante foram adicionados 200 a 400 µl de clorofórmio (24:1 clorofórmio/isopropanol) para promover a precipitação das proteínas. Após centrifugação por 15', houve a formação de três fases. A fase superior aquosa foi retirada para outro microtubo e para promover a precipitação do DNA, foi adicionado 300 µl de isopropanol. O material foi centrifugado por 10' a 10.000 rpm e o sobrenadante desprezado. Ao sedimento foi adicionado 200 a 500 µl de etanol a 70%. Após centrifugação por 10' a 10.000 rpm, o sobrenadante foi desprezado. Após secagem do sedimento contendo DNA o mesmo foi ressuspenso com 50 µl de água Mili Q e mantido em freezer -20°C até sua utilização.

### 3.2.2 Fase analítica

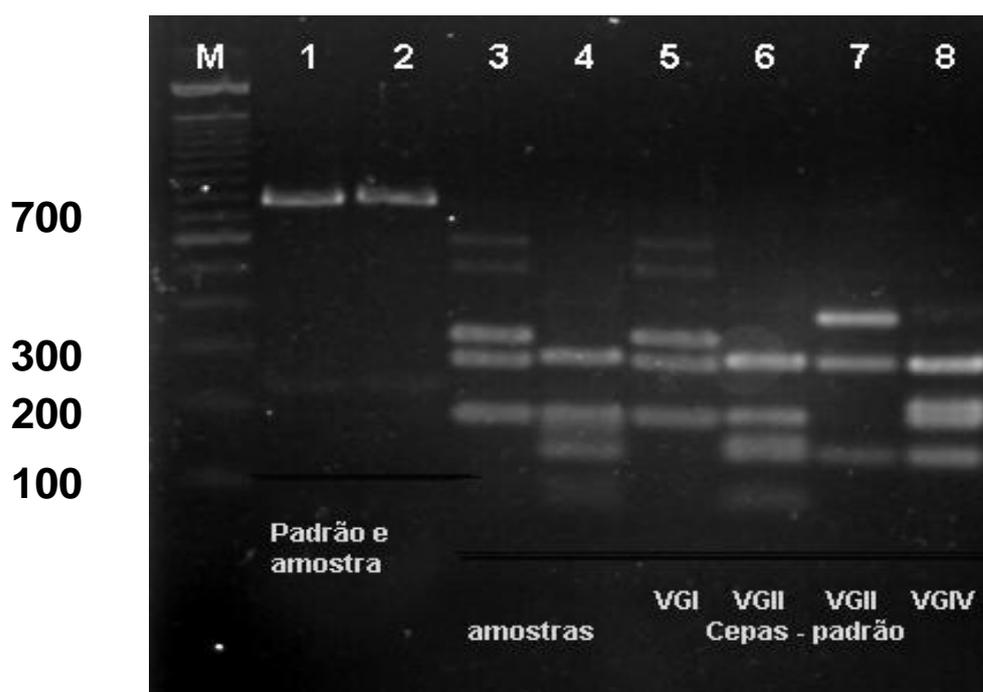
Para a quantificação de DNA genômico, as amostras foram colocadas em um aparelho de quantificação o Nanodrop. O equipamento apresentou o grau de pureza das extrações pela razão entre as leituras de densidade óptica (DO) de 260/ DO 280, que tiveram que apresentar valores entre 1,8 e 2,0 como considera valor ideal Sambrook e colaboradores.

#### 3.2.2.1 Técnicas de PCR e PCR-RFLP

Para a amplificação da seqüência alvo do DNA foi utilizada a solução pronta para uso Go Taq® Green Master Mix (Promega). Esta solução contém *Taq* DNA polimerase, dNTPs, MgCl<sub>2</sub> e tampões em concentrações ótimas para amplificação do DNA por PCR. As soluções contêm também, dois corantes que permitem monitorar o curso da eletroforese e sua densidade é suficiente para que o produto da PCR seja aplicado diretamente no gel.

Para a técnica de PCR-RFLP (Meyer et al., 2003) foi amplificado o fragmento *URA5* utilizando-se par de primers *URA5* (5'-ATGTCCTCCCAAGCCCTCGACTCCG-3') e *Sj01* (5'-TTAAGACCTCTCTGAACACCGTACTC-3') nas seguintes condições: desnaturação inicial sob 94°C por 5', 35 ciclos sob 94°C por 45"; 63°C por 1'; 72°C por 2' e extensão final de 10' a 72°C. Os produtos do PCR foram digeridos duplamente *HhaI* (20 U/ul) e *Cfr13I*, isômero de *Sau96I*, a (10U/ul) por 3 horas. Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em sistema horizontal contendo TBE durante 40 minutos a 100V e 400mA (consta na figura 6).

Os géis foram então observados em transiluminador com luz ultravioleta a 302 nm (Syngene). Os perfis de bandas das cepas clínicas e ambientais de *C. gattii* foram assinalados visualmente por comparação com os perfis obtidos com as cepas referência bem definidas para a espécie (VGI-VGIV).



**Figura 6.** Gel de agarose representativo contendo os tipos moleculares de *C. gattii*. Linhas 1 e 2: fragmentos característicos de *Cryptococcus* spp. (PCR primers *URA5* e *SJ01*). Linhas 3-8: fragmentos obtidos por RFLP (enzimas *Cfr13I* e *HhaI*) de amostras VGI e VGII e cepas-padrão. Linha M: marcador de peso molecular de 100 bp

### 3.3 Determinação da suscetibilidade a antifúngicos

#### 3.3.1 Microdiluição

O perfil de susceptibilidade de cada isolado foi avaliado, em duplicata, pela metodologia de referência de microdiluição em placas AFST-EUCAST documento E. Def. 7.1 (Rodriguez-Tudela et al., 2008) adotando recentes recomendações para leveduras não-fermentadoras (Zaragoza et al., 2011). A seguinte modificação foi adotada: incubação à 30 °C. Os resultados dos testes foram expressos em concentração inibitória mínima (CIM).

O meio de cultura usado na prova foi RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, USA), sem bicarbonato de sódio e com L-glutamina. Os antifúngicos: anfotericina B (SIGMA, St.Louis, EEUU) e fluconazol (*Pfizer Laboratories*) foram utilizados na forma p.a.

A solução-mãe de FLU, na concentração de 5120 µg/mL, foi preparada em água destilada e a de AMB com 1600 µg/mL em DMSO (dimetilsulfóxido). As soluções de uso, para serem colocadas nas placas de microtitulação onde foram feitos os testes, foram preparadas de modo que as concentrações finais dos antifúngicos, após a adição do inóculo de levedura, ficassem de 64 mg/L a 0,125 mg/L para FLU e entre 16 mg/L a 0,03 mg/L para AMB. Cada concentração de antifúngico foi distribuído em alíquotas de 100 µL, nas colunas 2 até a 11, correspondendo a cada coluna, uma concentração. As placas foram vedadas e congeladas à temperatura de -70 °C, por período máximo de 6 meses até o momento do uso (Rodriguez-Tudela et al., 2008).

Em cada placa foram avaliadas seis isolados e duas cepas-padrão. As cepas *C. krusei* ATCC 6258 e *C. parapsilosis* ATCC 22019, foram usadas em todos os testes para validar os resultados (Barry et al., 2000).

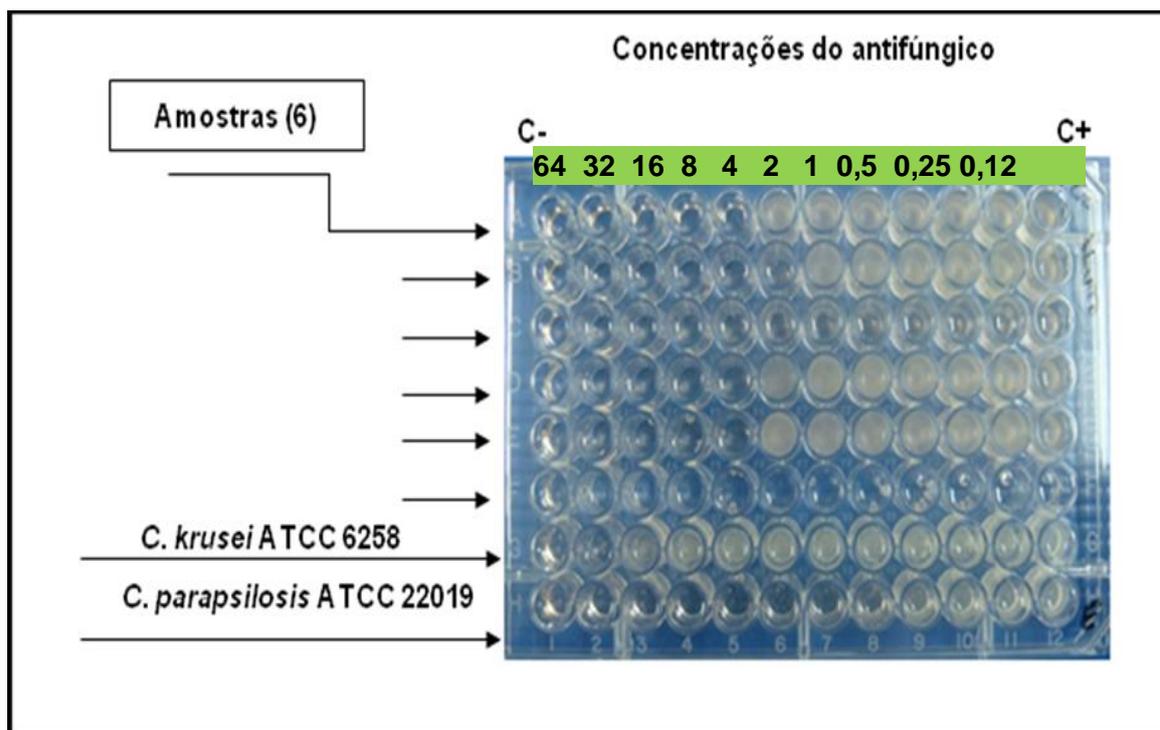
Para o teste, um inóculo de cada isolado foi feito em solução salina em concentração de 1 a  $5 \times 10^5$  ufc/mL. Alíquotas de 100 µL, de cada inóculo foram colocadas nos poços das placas descongeladas contendo antifúngicos. Com este procedimento a concentração final de cada inóculo foi reduzida à metade, ficando 0,5 a  $2,5 \times 10^5$  ufc/mL. Em cada placa foram colocados inóculos de 6 isolados nas

fileiras A e F, sendo as duas últimas fileiras (G e H) destinadas às cepas-padrão, para controle interno de qualidade do teste.

O controle de esterilidade, preparado na coluna 1, foi feito com o meio RPMI, sem antifúngico e sem inóculo o qual serviu também, na hora da leitura, como “branco” do espectrofotômetro o qual foi utilizado na leitura dos testes. O controle de crescimento de cada isolado, denominado de controle positivo, foi colocado na coluna 12, sendo preparado com: 100 µL de RPMI e 100 µL do inóculo. As placas foram, então, tampadas e incubadas a 30 °C. A leitura de turbidez, resultante do crescimento das amostras, foi realizada às 48h e quando o valor da D. O. foi  $\geq 0,3$  o resultado foi lido, caso contrário, nova leitura foi feita às 72h. A absorbância dos orifícios foi lida em espectrofotômetro (TITERTEK MULTISCAN, FLOW, Suécia) sob filtro de 492 nm e os valores foram registrados em impressora, para posterior compilação e análise de resultados.

O ponto de leitura ou “*endpoint*”, que indica a concentração inibitória mínima (CIM) de FLU foi o que permitiu inibição de 50% do crescimento (“*inhibition concentration*” ou IC50) em relação ao controle positivo de cada isolado. Para AMB o ponto de leitura foi naquela concentração que inibiu  $\geq 90\%$  (IC90) do crescimento de cada isolado. Um exemplo representativo da placa de teste consta na Figura 7.

Para interpretar os valores de CIM foi adotado critérios de Aller *et al.* (2000), segundo a qual, valores de CIM de FLU  $\geq 16$  mg/L classificam as cepas como resistentes a este azol. Para AMB, a interpretação utilizada foi a mesma de Pfaller *et al.* (2005), segundo a qual, valores de CIM  $\geq 2$  mg/L classificam as cepas como resistentes a este polieno.



**Figura 7.** Exemplo de placa de microtitulação contendo concentrações (mg/L) de fluconazol para determinação de CIM. C+: controle-positivo, C-: controle-negativo.

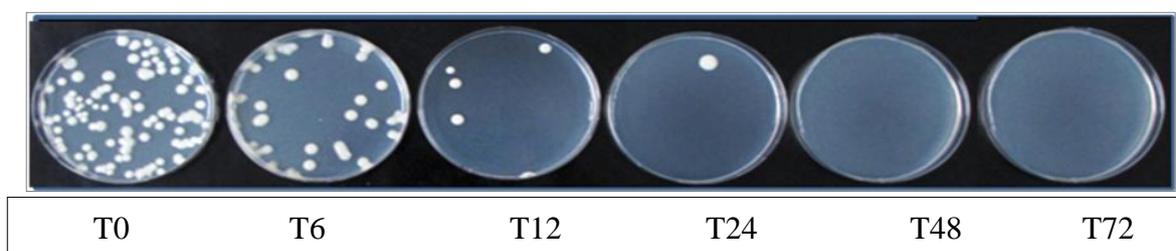
### 3.3.2 Curvas de morte

Para AMB as amostras foram avaliadas pela metodologia de curvas de morte segundo descrito por Klepser et al., 1998, Rodero et al., 2000 e em Pappalardo et al., 2009. As culturas foram cultivadas duas vezes em placas com ágar dextrose batata, previamente, aos testes de curva de morte. Três a cinco colônias, após crescimento (24-48 h) na placa, foram suspensas em 9 mL de água estéril. A suspensão foi ajustada, de acordo à mesma turbidez do tubo 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente  $1 \cdot 10^6$  ufc/mL a  $5 \cdot 10^6$  ufc/mL). Um mililitro da suspensão ajustada foi adicionado a 9 mL de RPMI 1640 tamponado com tampão MOPS. Isso resultou em diluição da suspensão fúngica em 1:10, tornando-a com  $1 \cdot 10^5$  a  $5 \cdot 10^5$  ufc/mL. O inóculo foi também transferido à solução de 1 mg/L de AMB (diluição 1:10). Alíquotas de 30  $\mu$ L dessa suspensão foram, imediatamente, plaqueadas em ágar batata e incubadas a 35°C. Este procedimento caracterizou o

tempo zero (T0) de reação, ou seja, antes do início da incubação do inóculo com a anfotericina B. Em tempos pré-determinados, de 6h,12h, 24h, 48h e 72h, alíquotas de 100- $\mu$ L foram removidas da suspensão contendo inóculo e AMB, foram diluídas em RPMI (1:10) e, então, plaqueadas. Esses procedimentos corresponderam, respectivamente, aos tempos T6, T12, T24, T48, e T72. Após 72h de incubação a 35°C, as colônias foram contadas para elaboração das curvas de morte(Figura 4).

A contagem mínima de 1000 ufc/mL para cada inóculo foi garantida no tempo inicial (T0) para validação do teste. O tempo necessário para redução de  $\geq 99,9\%$  ( $3\log_{10}$ ) em relação ao inóculo inicial foi determinado para cada isolado (Pearson et al., 1980). Atividade fungicida (*endpoint* da reação) foi considerada quando o número de unidades formadoras de colônias (ufc) por mililitro foi  $< 99,9\%$ , quando comparada ao tamanho do inóculo no momento da diluição inicial. Controle-positivo de crescimento do inóculo foi preparado em solução de RPMI sem adição de AMB e, do mesmo modo, foi preparado de T0 ao T72.

A contagem ( $\log_{10}$  do número de ufc/mL) *versus* tempo foi inserida em Figuras, para estudo de comparações da atividade antifúngica. Uma curva de morte *versus* tempo foi feita para cada isolado e comparado com o valor de CIM. Uma curva de morte com valores médios, contemplando todas as amostras, foi elaborada e comparada com a curva do controle-positivo. A técnica permite estimar, de forma dinâmica, a ação fungicida da AMB, ou seja, a diminuição no número de fungos viáveis ao longo do tempo.

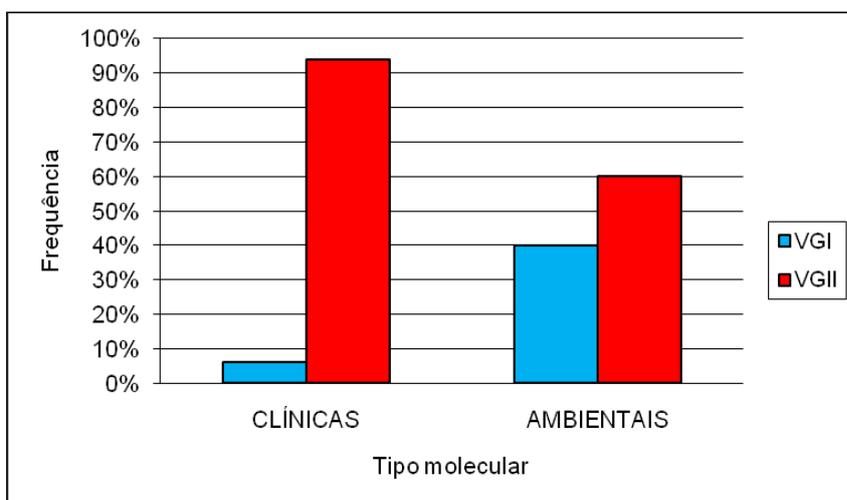


**Figura 8.** Placas de Petri em testes de curvas de morte, ilustrando a diminuição do número de colônias de *C. gattii* (ufc/mL) segundo tempo de exposição a 1 mg/L de anfotericina B. T0, tempo zero; T6, 6 h; T12, 12 h; T24, 24 h; T48, 48 h; T72, 72 h de exposição.

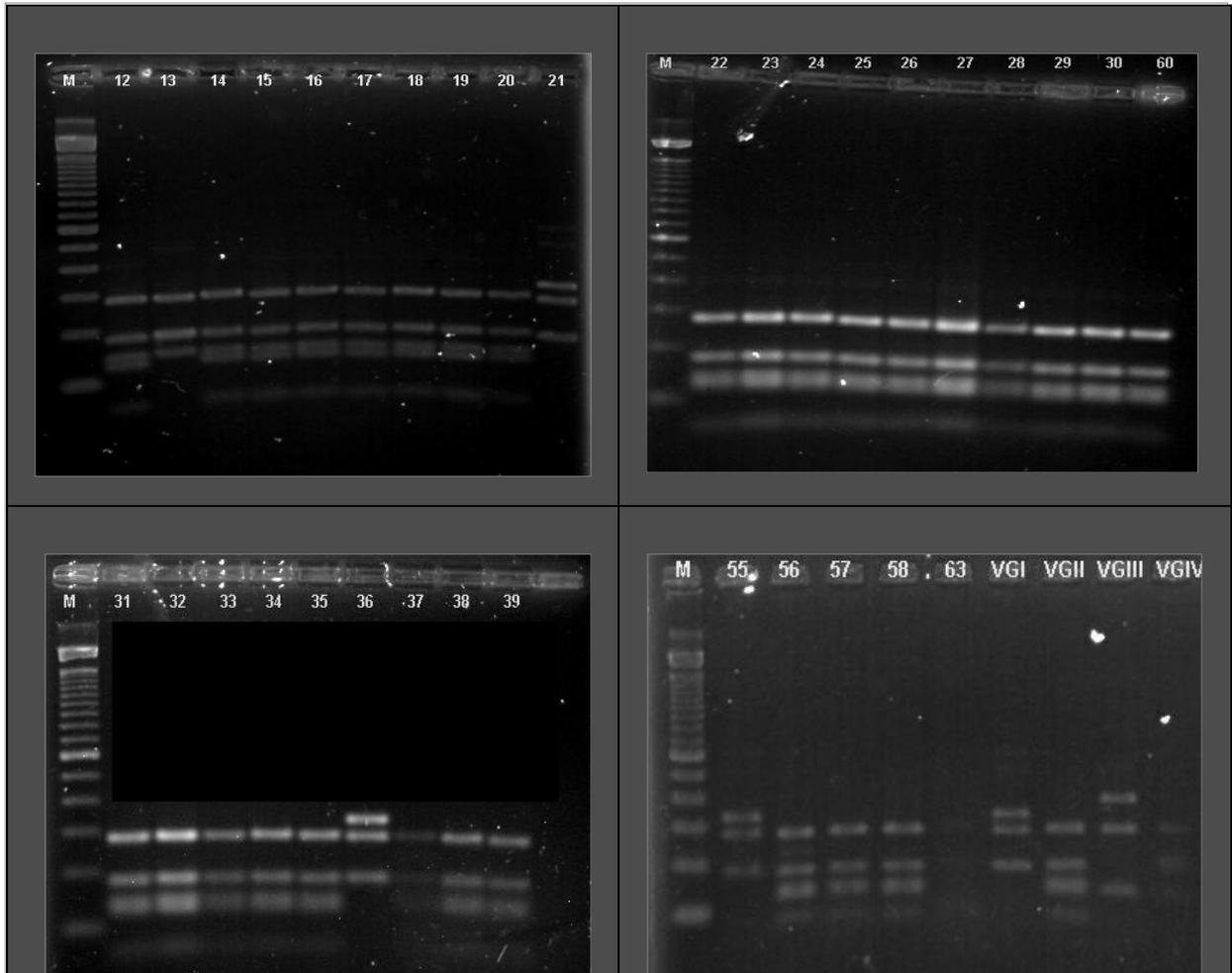
## 4. Resultados

### 4.1 Caracterização genotípica

Neste estudo foram avaliados 55 isolados de *C. gattii* (90,9% clínicos e 9,1% ambientais), dos quais foi amplificado um fragmento do gene de, aproximadamente, 750bp, após uso dos *primers*: *URA5* e *SJO1*. A digestão do fragmento específico usando as endo nucleases *HhaI* e *Cfr13I* (isômero de *Sau96I*) mostraram que: de 50 isolados clínicos de *C. gattii*, 47 (94%) eram do tipo molecular VGII e três (6%) eram VGI. Entre os isolados ambientais houve predominância do genótipo VGII (3/5; 60%), sendo todos provenientes da cidade de São Paulo. Em relação a VGI (2/40%), era um da cidade São Paulo e um de Araraquara (Figuras 5 e 6).



**Figura 9.** Distribuição dos tipos moleculares de *C. gattii* de 55 amostras clínicas e ambientais



**Figura 10.** Gel de agarose contendo os tipos moleculares dos isolados clínicos e ambientais de *C. gattii* por técnica de PCR-RFLP. Linhas 21,36 e 55 tipo molecular VGI, linhas 12-20, 22-60, 31-34, 37-39, e 56-58 tipo molecular VGII

## 4.2 Perfil de Sensibilidade a antifúngicos

### 4.2.1 Microdiluição

Os testes de sensibilidade, para cinquenta isolados clínicos e cinco ambientais, frente aos antifúngicos: fluconazol e anfotericina B, foram realizados pela metodologia de referência AFST-EUCAST E Def 7.1 (Rodríguez-Tudela et al., 2008) adotando recentes recomendações para leveduras não-fermentadoras (Zaragoza et al., 2011). Os valores de CIM, avaliados sob os parâmetros de intervalo

de CIM, CIM<sub>50</sub>, CIM<sub>90</sub> e média geométrica frente aos dois tipos moleculares seguido da origem dos isolados de *C. gattii*, estão expressos na Tabela 1.

O perfil de sensibilidade frente à FLU para os 55 isolados indicou intervalo de CIM de 1 - 64 mg/L, moda 8 mg/L, média 11.3 mg/L, CIM<sub>50</sub> 8 mg/L, CIM<sub>90</sub> 16 mg/L.

O valor da média geométrica para os isolados clínicos frente à FLU foi de 11.8 mg/L. FLU demonstrou baixa atividade frente ao genótipo VGII, sendo que 25.5% dos isolados clínicos apresentaram susceptibilidade reduzida (CIMs ≥16 mg/L). Verificou-se que 24 (47,2%) dos isolados apresentaram CIMs elevadas 8mg/L.

Para AMB, os valores correspondentes a CIM para os 55 isolados, foram: intervalo 0,12-0,5 mg/L, moda 0,5 mg/L, média 0,36 mg/L, CIM<sub>50</sub> 0,5 mg/L, CIM<sub>90</sub> 0,5 mg/L. Todos os isolados apresentaram CIMs baixas para AMB (< 2mg/L) e os tipos moleculares VGI e VGII apresentaram perfil de susceptibilidade equivalente.

**Tabela 1.** Suscetibilidade, em valores de concentração inibitória mínima (CIM) a fluconazol e anfotericina B de 55 isolados de *C. gattii*, segundo origem e tipos moleculares

Origem	Tipo molecular (número de isolados)	Fluconazol				Anfotericina B			
		CIM (mg L <sup>-1</sup> )			%	CIM (mg L <sup>-1</sup> )			%
		Intervalo	50/90	MG	S/R	Intervalo	50/90	MG	S/R
Ambientais	VGI (2)	4-8	4/8	6	100/0	0.12	0.12/0.12	0.12	100/0
	VGII (3)	4-8	8/8	6.6	100/0	0.12-0.25	0.12 / 0.25	0.16	100/0
	Total (5)	4-8	8/8	6.4	100/0	0.12-0.25	0.12 / 0.25	0.14	100/0
Clínicas	VGI (3)	4-8	4/8	5.3	100/0	0.12-0.5	0.25 / 0.5	0.29	100/0
	VGII (47)	1-64	8/16	12.2	74.5/25.5	0.12-0.5	0.5 / 0.5	0.39	100/0
	Total (50)	1-64	8/16	11.8	76.0/24.0	0.12-0.5	0.5 / 0.5	0.38	100/0
Total		1-64	8/16	11.3	78.2/21.8	0.12-0.5	0.5 / 0.5	0.36	100/0

MG, média geométrica; S, sensível; R, resistente

#### 4.2.2 Curvas de morte

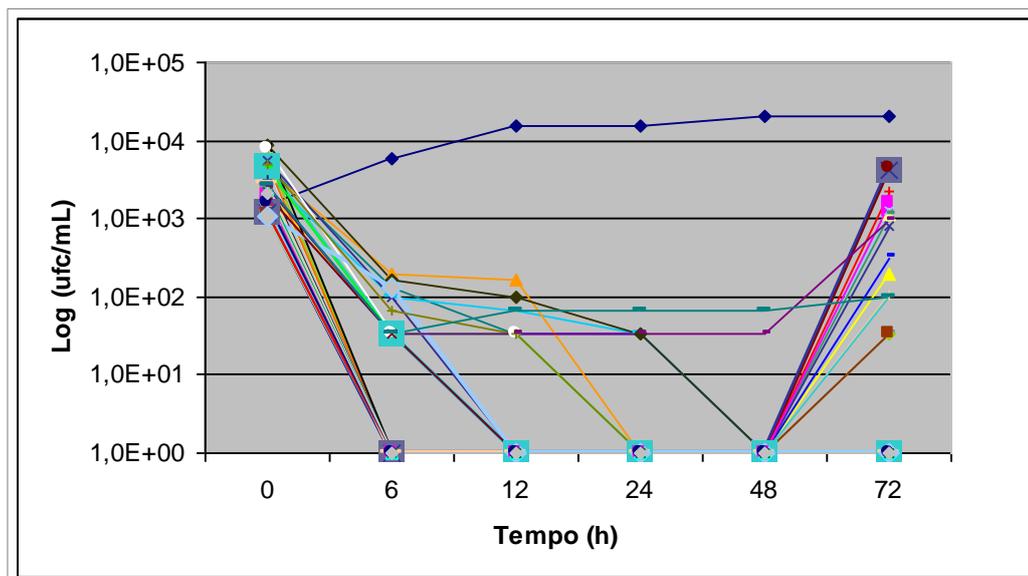
Os resultados das curvas de morte dos 55 isolados clínicos e ambientais frente à AMB estão apresentados respectivamente na Tabela 2 e Figuras 11 e 12. O tempo necessário para ocorrer o efeito fungicida foi de 6h para a maioria dos isolados (70,9%), a taxa de mortalidade aumentou (14,6%) com 12h chegando a 86%. Verificou-se que 3.6% das cepas ainda seguiu crescendo às 24h (94,6%) e atingiu máximo (94,6%) às 48h (consta na tabela 3). Dois isolados não apresentaram efeito fungicida a AMB após 72h de exposição, ambos de origem clínica e do tipo molecular VGII (consta no quadro 3).

**Tabela 2.** Efeito fungicida de anfotericina B (1mg/L) sobre 55 isolados de *C. gattii* por metodologia de curvas de morte

Tempo de exposição (h)	N	(%)	N cumulativo (%)
6	39	(70,9)	70,9
12	8	(14,6)	86
24	5	(9,1)	94,6
48	1	(1,8)	96,4
72	0*	(0)	96,4
Total	53	(96,4)	96,4

N número de isolados mortos

\*Não foi considerado o efeito de recrescimento

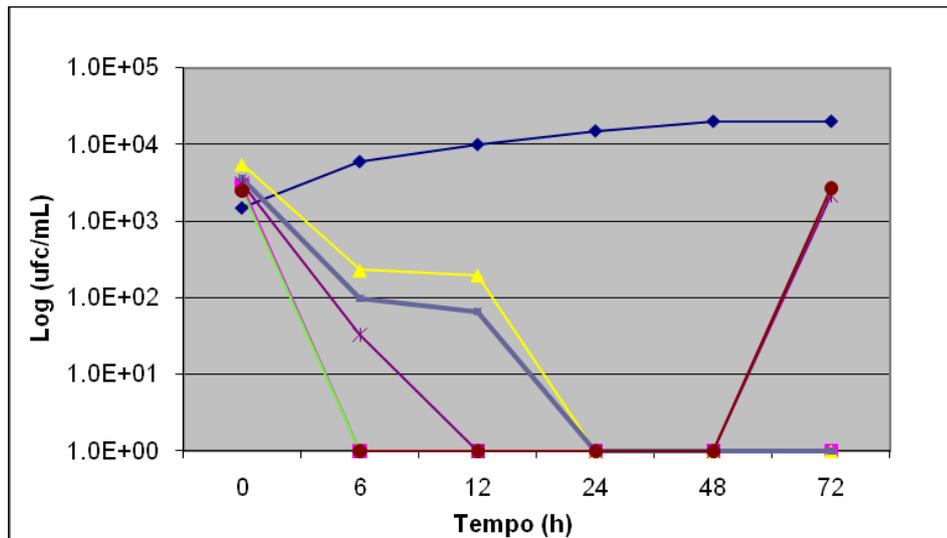


**Figura 11.** Curvas de morte de 50 isolados clínicos de *Cryptococcus gattii* testados com 1 mg L<sup>-1</sup> de anfotericina B. Controle

**Quadro 3.** Isolados de *C. gattii* sem efeito fungicida da anfotericina B (AMB), em testes de curvas de morte, e segundo valor de CIM

Tipo molecular	Nº do isolado	Origem amostra	CIM AMB (mg/L)
VGII	14	Clínica	0,5
VGII	50	Clinica	0,5

Para isolados ambientais do tipo molecular VGI, um teve efeito fungicida após 6h e o outro apenas após 24h de exposição a AMB. Para VGII os tempos de morte foram 6h (1), 12h (1) e 24h (1). Às 72h 18 (34%) isolados clínicos todos VGII e 2 (40%) ambientais (VGI e VGII) tiveram recrescimento após 48 horas de exposição à AMB. Todos os isolados clínicos (3/50; 6%) do tipo molecular VGI morreram no período inicial de 6h.



**Figura 12.** Curvas de morte de 5 isolados ambientais de *Cryptococcus gattii* testados com  $1\text{mg L}^{-1}$  de anfotericina B. Controle

A análise de Curvas de Morte e CIM indicou que entre os isolados do tipo molecular VGI a minoria (2/5; 40%) dos que tiveram CIM baixa para AMB (0,12 mg/L), o tempo para ocorrer o efeito fungicida foi no período inicial de 6 horas (tabela 4). Entre os isolados do tipo molecular VGII 8.3% ainda estavam viáveis após 24 horas de exposição a 1 mg/L do antifúngico, sendo a metade (2/4) com CIM de 0,5 mg/L para AMB.

**Tabela 3.** Concentração inibitória mínima e tipo molecular de isolados de *C. gattii*

Tipo molecular	AMB CIM (mg/L)	0,12	0,25	0,5	Total(%)
	TKC				
VGI	T6	2	1	1	4(80)
	T12	-	-	-	-
	T24	1	-	-	1(20)
	Total(%)	3(60)	1(20)	1(20)	5(100)
VGII	T6	6	8	20	34(71)
	T12	2	1	6	9(18.7)
	T24	1	1	2	4(8.3)
	T48	-	1	-	1(2)
	Total	9(18.7)	11(23)	28(58.3)	48(100%)*

\* Dois isolados clínicos não sofreram efeito fungicida  
TKC, resultado de efeito fungicida por Time-Kill Curves ; T, tempo em horas; AMB, anfotericina B, CIM, concentração inibitória mínima

O efeito de recrescimento observado em (38.1%) dos 55 isolados clínicos e ambientais, não ocorreu no tipo molecular VGI. E entre os isolados do tipo molecular VGII que apresentaram este efeito, 70% tiveram CIM de 0,5 mg/L para AMB.

**Tabela 4.** Concentração inibitória mínima de isolados que tiveram recrescimento em curvas de morte segundo tipo molecular

Tipo molecular	AMB CIM (mg/L)	Recrescimento T72	Total(%)
	VGII	0,12	3
0,25		3	3(15)
0,5		12	14(70)

T, tempo em horas; AMB, anfotericina B; CIM, concentração inibitória mínima

## 5. Discussão

A prevalência do genótipo VGII (91%) observada em nosso estudo foi semelhante a dados nacionais anteriores (76-100%). Dados latino-americanos (99,2%), e do noroeste dos Estados Unidos (80%), além de relatos do Canadá (95%) e Austrália (71%), também demonstraram a prevalência do genótipo VGII entre as infecções por *C. gattii* (Kidd et al., 2004; Campbell et al., 2005; Escadon et al., 2006; MacDougall et al., 2007; Santos et al., 2008; Trilles et al., 2008; Mora et al., 2010).

Os métodos de referência para determinação da CIM não são totalmente padronizados para avaliar o perfil de susceptibilidade antifúngica de leveduras não fermentadoras como *C. gattii*. Isto se deve, em parte, ao crescimento prejudicado dessas leveduras nas condições propostas pelo teste, incluindo a temperatura de incubação e o meio de cultura. Recentemente, um estudo comparativo de análise da cinética de crescimento de espécies representativas de leveduras não fermentadoras, além de outros parâmetros, mostrou que a incubação a 30 °C melhorou a cinética de crescimento desses organismos (Zaragoza et al., 2011).

Nós testamos a susceptibilidade antifúngica de todas as 55 amostras com a temperatura de 30 °C, uma vez que ficou provado que os valores de CIM obtidos nessa condição mostraram elevada porcentagem de concordância e significativa correlação entre os métodos de referência CLSI e AFST-EUCAST. Realizamos testes em duplicata em ambas as temperaturas (35 °C e 30 °C) nas 55 amostras anteriormente (dados não mostrados), e obtivemos resultados de CIM semelhantes (+ 1 diluição log 2) para as duas drogas antifúngicas. A determinação do CIM ficou mais fácil e clara na temperatura de 30 °C, pois os isolados tiveram um crescimento suficiente (densidade óptica > 0,3) em placas de microdiluição em meio RPMI, sem agitação e com até 72h de incubação.

Os *breakpoints* para a interpretação da susceptibilidade das espécies de *Cryptococcus* ainda não foram definidos para metodologia CLSI ou AFST-EUCAST para qualquer um dos agentes antifúngicos. Para os testes de susceptibilidade das

amostras de *C. gattii* frente ao fluconazol usamos os pontos de corte ( $\geq 16$  mg/L) aplicado a *C. neoformans* por Aller (Aller et al., 2000).

Encontramos susceptibilidade *in vitro* reduzida ao fluconazol em 12 de 55 amostras (21,8%). Nosso resultado é inferior em relação ao achado na Colômbia onde a taxa de CIM foi de 33% (De Bedout et al., 1999) e é aproximadamente o dobro 12,7% dos isolados relatados na Espanha (Morera-Lopez et al., 2005). Chen e colaboradores relataram CIMs mais elevadas ( $>64$  mgL<sup>-1</sup>) para fluconazol, em 20% de 18 isolados de *C. gattii* da Austrália (CHEN et al., 2000). Os resultados de CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> para fluconazol deste estudo (CIM<sub>50</sub>, 8 mgL<sup>-1</sup> e CIM<sub>90</sub>, 16 mg L<sup>-1</sup>) foram similares aos de outros estudos (Iqbal et al., 2010; Hagen et al., 2010; Trilles et al., 2011) e 1 log<sub>2</sub> em um estudo (Gomez-Lopez et al., 2008).

Há dados *in vitro* inconsistentes sobre a susceptibilidade a azóis de cepas de *C. gattii*. Dados anteriores mostraram que existe uma semelhança de CIM entre *C. gattii* e *C. neoformans* (Torres-Rodriguez et al., 2008; Thompson et al., 2009). No entanto, outros estudos (Gomez-Lopez et al., 2008; Tay et al., 2006; Trilles et al., 2011) mostraram alta porcentagem de isolados de *C. gattii* com CIMs mais elevadas para fluconazol, quando comparado com *C. neoformans* (Tay et al., 2006; Trilles et al., 2011). Além disso, atenção deve ser dada ao relato de Varma e Kwon-Chung (2010), mostrando que 86% dos isolados de *C. gattii* expressam um nível heterorresistência  $>16$  mgL<sup>-1</sup> ao fluconazol em comparação com 46% das cepas de *C. neoformans*. Eles descobriram que todos os isolados clínicos não expostos ao azóis, assim como as cepas ambientais manifestaram heterorresistência ao fluconazol. Além disso, esta heterorresistência foi uma característica intrínseca que foi associada com sua virulência das cepas testadas. Assim, o nível mais elevado de heterorresistência ao fluconazol das cepas de *C. gattii* pode ser outro fator que influência as CIMs dessas, resultando na variabilidade dos resultados de ensaios de susceptibilidade antifúngica *in vitro* relatadas em diferentes estudos (Varma e Kwon-Chung, 2010) .

Se cepas de *C. gattii* tem CIMs superiores a isolados de *C. neoformans* é incerto, mas em comparação com *C. neoformans*, parece que *C. gattii* requer mais

prolongada terapia antifúngica, já que criptococomas são mais comuns e exige remoção cirúrgica (Perfect et al., 2010).

Infelizmente, não houve estudos que correlacionam CIMs de isolados de *C. gattii* e evolução clínica, e assim a relação entre CIMs elevadas e resultado clínico não é conhecido. Até agora, sabemos que há apenas estudos para a espécie *C. neoformans* (White et al., 1998; Aller et al., 2000; Dannanoui et al., 2006; Chowdhary et al., 2011) comparando CIMs ao fluconazol e evolução clínica. Poucos estudos têm relatado a suscetibilidade de *C. gattii* (De Bedout et al., 1999; Chen et al., 2000; Trilles et al., 2004; Morera-Lopez et al., 2005; Morgan et al., 2006; Gomez-Lopez et al., 2008; Thompson et al., 2009; Chong et al., 2010; Iqbal et al., 2010; Trilles et al., 2011; Chowdhary et al., 2011) e alguns destes estudos não separa os isolados de *C. gattii* de acordo com o seu tipo molecular.

Em um estudo recente, a técnica AFLP foi utilizada para caracterização molecular dos isolados de *C. gattii*. Os testes de sensibilidade mostraram que cepas clínicas pertencentes ao subtipo AFLP6 (VGII) tiveram significativamente CIMs duas vezes mais elevadas para fluconazol em comparação com isolados AFLP4 (VGI). Além disso, estudos têm mostrado CIMs elevadas para azóis entre alguns subtipos moleculares VGII na Índia (Chowdhary et al., 2011) e para os subtipos responsáveis pelo surto do Noroeste do Pacífico (Iqbal et al., 2010; Hagen et al., 2010). Um recente estudo australiano mostrou CIMs mais elevadas aos azóis fluconazol e voriconazol, para o subtipo molecular VGII em comparação com os de VGI, e do subtipo molecular de *C. neoformans* (Chong et al., 2010).

Resultados de outros estudos são semelhantes aos encontrados nesse estudo, indicando que o tipo molecular VGII é menos susceptível ao fluconazol do que o VGI. Curiosamente, encontramos isolados do tipo molecular VGII com CIMs mais elevadas ao fluconazol (47,3% isolados CIM >8 mg/L-1), enquanto dois isolados (40%) VGI tiveram CIM de 8 mg/L-1. Todos isolados com CIMs  $\geq 16$  mg/L-1 eram do subtipo molecular VGII. Além disso, ambos valores de CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> foram o dobro para as cepas do subtipo molecular VGII, em comparação com aqueles de cepas VGI. A observação de que o fluconazol tinha baixa atividade antifúngica contra o tipo molecular VGII foi um achado consistente em estudos anteriores

(Cheng et al., 2009; Chong et al., 2010; Iqbal et al., 2010; Hagen et al., 2010; Trilles, et al., 2011; Chowdhary et al., 2011). No entanto, o número de isolados do tipo molecular VGI é muito pequeno (n = 5) para comparar as suas características de suscetibilidade antifúngica com as do subtipo molecular VGII (n = 50). A diferença na susceptibilidade entre os tipos moleculares de *C. gattii*, pode ter uma importante implicação na escolha do tratamento, representando um novo fator de influência na resposta clínica ao tratamento, especialmente em regiões com alta diversidade genética da população de *C. gattii* VGII.

CIMs frente a anfotericina B neste estudo foram relativamente baixas, com o limite máximo de 0,5 mg/L-1, todas as cepas foram classificadas como suscetíveis, mas a importância clínica destes valores para *C. gattii* é desconhecida. Dados anteriores demonstraram que isolados de *C. gattii* foram altamente sensíveis à anfotericina B e nenhuma diferença foi encontrada na susceptibilidade entre os tipos moleculares VNI, VGI e VGII de isolados brasileiros criptococose (Trilles et al., 2011). Embora alguns autores têm demonstrado que *C. gattii* poderia ser menos suscetível que *C. neoformans* (Khan et al., 2007; Cheng et al., 2009).

O método curva de morte revela a atividade fungicida dos fármacos antifúngicos e representa uma ferramenta mais útil para monitorar a resistência, é importante para alcançar uma compreensão mais clara dos padrões de morte da anfotericina B, um agente fungicida. Em um estudo anterior (Pappalardo et al., 2009), usando a metodologia de curva de morte, mostrou que a diferença entre as atividades fungistática, avaliada por CIM, e as atividades fungicida pode ser cepa dependente entre isolados clínicos de *C. neoformans*.

Foi realizada análise de curva de morte com uma concentração de 1 mg/L-1 de anfotericina B, que representa cerca de 4 vezes a CIM das 50 cepas testadas. Encontramos diferentes atividades de morte, dependendo da cepa de *C. gattii*. A maioria das cepas foram mortas após 6h de exposição à droga. Entre as cepas que apresentaram CIMs baixas no método de microdiluição (CIM, 0,12-0,5 mg/L-1) encontramos seis isolados clínicos (12%; 6/50) e dois isolados ambientais (40%; 2/5) para os quais foi necessário um tempo de exposição longo (24-72h) para alcançar o efeito fungicida. Fato interessante, que todas essas cepas foram do tipo molecular

VGII. Ao contrário, todas as cepas do tipo molecular VGI foram mortas por anfotericina B às 6h, com exceção de um isolado ambiental que apresentou recrescimento após 48h de exposição a AMB. Encontramos células viáveis em dois isolados mesmo às 72 h de exposição.

Fato interessante, caracterizado como recrescimento em 20 (38,1%) dos 55 isolados, sendo 18 clínicos e 2 ambientais. Ainda que, haja na literatura disponível poucos estudos sobre efeito fungicida de anfotericina B em cepas de *Cryptococcus* spp., há relatos anteriores desse fenômeno. O recrescimento de um isolado, após longos períodos ( $\geq 72$ h) de exposição à anfotericina B por método de curvas de morte, foi chamado de *tolerância* por Klepser et al., 1997 e adotado por Rodero et al. (2000), e Pappalardo et al. (2009). A tolerância foi considerada sinônimo de resistência à anfotericina B observada por curva de morte, da mesma forma como relatado neste estudo para espécies de *Candida* (Klepser et al., 1997; Rodero et al., 2000; Keele et al., 2001; Canton et al., 2003; Canton et al., 2004).

Vários estudos concluíram que a taxa de morte de *C. neoformans* não se correlacionou com a CIM para o isolado testado (Rodero et al., 2000; Burgess e Hastings, 2000; Nooney et al., 2005). Do mesmo modo, não encontramos associação entre resultados de curva de morte e CIM. Pela metodologia da curva de morte, observamos padrões fungicidas distintos entre as cepas *C. gattii* com baixas CIM à anfotericina B. Isso pode indicar que a CIM obtidas pelo método de microdiluição em caldo é limitada para avaliar a atividade da anfotericina B como sugerido em estudos anteriores (Rex et al., 1995; Ernest et al., 2000; Pappalardo et al., 2009).

Estudos sobre a suscetibilidade *in vitro* a antifúngicos de isolados ambientais de *C. gattii* são escassos. Dados sobre cepas ambientais podem dar informações úteis para o estabelecimento de pontos de corte epidemiológicos desta espécie emergente. Estudamos cinco isolados, (80%) obtidos a partir de solo que continham excretas de pássaros e (20%) de fezes de pombo. Enquanto cepas do genótipo VGII foram predominantes (60%) em comparação com VGI (40%), porcentagem similar de cada tipo molecular foi descrita no maior estudo ambiental

até a data, onde foram isoladas 57 cepas ambientais (AFLP4/VGI, 21,9% e, AFLP6/VGII 22,5%) de *C. gattii* (Hagen et al., 2010).

Neste estudo, nenhuma das cinco cepas ambientais *C. gattii* testadas apresentaram CIMs elevadas *in vitro*, tanto para fluconazol ou anfotericina B e, portanto, todos os isolados permaneceram altamente suscetíveis, de acordo com dados anteriores (Trilles et al., 2004; Escadon et al., 2006; Hagen et al., 2010). CIMs fluconazol diferiam por um máximo de 1 log<sub>2</sub> de diluição entre cepas ambientais (CIM<sub>50</sub> = CIM<sub>90</sub>, 8mg L<sup>-1</sup>) e cepas clínicas (CIM<sub>50</sub>, 8 mg L<sup>-1</sup> / CIM<sub>90</sub>, 16 mg L<sup>-1</sup>). Alguns estudos anteriores demonstram perfil semelhante de suscetibilidade entre as cepas ambientais e clínicas (Trilles et al., 2004; Escadon et al., 2006; Khan et al., 2007). Estes autores concluíram que a suscetibilidade antifúngica não é dependente da origem dos isolados testados.

Os dados de cepas ambientais permite entender as características dos agentes etiológicos desde que este é o nicho.

A metodologia de curvas de morte poderá ser de grande utilidade para contribuir para o prognóstico da infecção por *C. gattii*.

Os resultados desse estudo podem contribuir para a clínica, desde que avalie a ação de fluconazol e anfotericina B sobre cepas clínicas de *C. gattii*. Ainda, os resultados dos tipos moleculares, podem dar subsídios para estudos futuros sobre correlação entre esses dados e aspectos clínico-terapêuticos.

## 6. Conclusões

- Dois tipos moleculares - VGI (40%) e VGII (60%), em porcentagens semelhantes, foram encontrados entre isolados ambientais;
- Cepas clínicas foram, predominantemente, VGII (94%) mas VGI (6%) foi também encontrado;
- O encontro de VGI, tanto em cepas ambientais quanto clínicas, é bastante relevante, visto a raridade desse achado em estudos prévios nacionais. Este dado é inédito em cepas do estado de São Paulo;
- A resistência a fluconazol, maior em isolados VGII clínicos em relação aos ambientais deste genótipo, foi maior do que no tipo VGI;
- Altos valores de CIM's para fluconazol, para amostras do tipo molecular VGI (50%) e VGII (74%);
- Todos os isolados, independente de origem e tipo molecular, foram altamente sensíveis à anfotericina B segundo método de microdiluição, confirmando dados da literatura;
- Entre as cepas sensíveis, foi observada ação fungicida variada, por método de curvas de morte que discriminou cepas mais resistentes e cepas tolerantes ao fármaco;
- Futuros estudos de correlação clínico-laboratorial poderão avaliar a relevância dos testes de curvas de morte para apoio ao manejo da criptococose.

## 7. Referências Bibliográficas

Abegg MA, Cella FL, Faganello J, Valente P, Schrank A, Vainstein MH. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolated from the excreta of psittaciformes in a southern Brazilian zoological garden. *Mycopathologia* 2006; 161:83-91.

Aller AI, Martin-Mzuelos E, Lozano F, Gomez-Mateos J, Steele-Moore L, Holloway WJ, et al. Correlation of Fluconazol MICs with Clinical Outcome in Cryptococcal infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2000;44:1544-48.

Barry AL, Pfaller MA, Brown SD, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, Knapp C, et al. Quality control limits for broth microdilution susceptibility tests of ten antifungal agents. *J Clin Microbiol* 2000;38:3457-59.

Bennett, JE. Antimicrobianos: agentes antifungicos. In: Goodman LS, Gilman AG, Hardman JG, Limbrid LE. Goodman; Gilman As bases farmacologicas da terapeutica. 10 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill; 2003;971-983.

Boekhout T, Theelen B, Diaz M, Fell JW, Hop WC, Abeln EC, et al. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology* 2001;147:891–907.

Boekhout T, Belkum AV, Leenders AP, Verbrugh HA, Mukamurangwa P, Swinne D, et al. Molecular typing of *Cryptococcus neoformans*: taxonomic and epidemiological aspects. *Inst J Syst Bacteriol.* 1997;47 (2):432-42.

Bovers M, Hagen F, Kuramae EE, Diaz MR, Spanjaard L, Dromer F, et al. Unique hybrids between the fungal pathogens *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *FEMS Yeasts Res.* 2006;599-607.

Branchini ML, Pfaller MA, Rhine-Charbeg J, Frempong T, Isenberg HD. Genotypic variation and slime production among blood and catheter isolates of *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol* 1994;32:452–56.

Burgess DS, Hastings RW. A comparison of dynamic characteristics of fluconazole, itraconazole, and amphotericin B against *Cryptococcus neoformans* using time-kill methodology. *Diag Microbiol Infect Dis* 2000;38:87-93.

Byrnes III EJ, Karen H, Bartlett C, Heitman J. *Cryptococcus gattii*: An emerging fungal pathogen infecting humans and Animals. *Microbes Infect.* 2011 Oct;13(11):895-907.

Campbell LT, Currie BJ, Krockenberge M, Malik R, Meyer W, Heitman J, et al. Clonality and re-combination in genetically differentiated subgroups of *Cryptococcus gattii*. *Eukaryot Cell* 2005;4:1403–09.

Cantón E, Pemán J, Gobernado M, Viudes A, Espinel-Ingroff A. Patterns of amphotericin B killing kinetics against seven *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:2477-82.

Cantón E, Pemán J, Viudes A, Quindós G, Gobernado M, Espinel-Ingroff A. Minimum fungicidal concentrations of amphotericin B for bloodstream *Candida* species. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2003;45:203-6.

Casadevall A, and Perfect, JR. *Cryptococcus neoformans*. ASM Press Washington DC, USA.1998

Casadevall A, Steenbergen JN, Nosanchuk JD. ‘Ready made’ virulence and ‘dual use’ virulence factors in pathogenic environmental fungi - The *Cryptococcus neoformans* paradigm. *Current Opinion in Microbiology.* 2003; 6:332–37.

Chatudervi S, Dyavaiah M, Larsen RA, Chatudervi V. *Cryptococcus gattii* in AIDS Patients, Southern California. *Emerg Infect Dis* 2005;11: 1686–92.

Chen SCA, Sorrell T. Antifungal agents. *Med J Aust.* 2007;187(7):404-9.

Chen YC, Chang SC, Shih CC, Hung CC, Luhbd KT, Pan YS, et al. Clinical features and in vitro susceptibilities of two varieties of *Cryptococcus neoformans* in Taiwan. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2000;36:175–83.

Cheng PY, Sham A, Kromstad JW. *Cryptococcus gattii* isolates from the British Columbia cryptococcosis outbreak induce less protective inflammation in a murine model of infection than *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 2009;77:4284-94.

Chong HS, Dagg R, Malik R, Chen S, Carter D, et al. In vitro susceptibility of the yeast pathogen *Cryptococcus* to fluconazole and other azoles varies with molecular genotype. *J Clin Microbiol* 2010;48:4115–20.

Chowdhary A, Randhawa HS, Sundar G, Kathuria S, Prakash A, Khan Z, et al. In vitro antifungal susceptibility profiles and genotypes of 308 clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* var *grubii* and *Cryptococcus gattii* serotype B from north western India. *J Med Microbiol* 2011;60:961–67.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast, Approved standard. Third Edition. M27-A3 2008;28:1-25.

Consenso em Criptococose. Relatório Técnico. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2008;41:524-44.

Costa SPSE, Lazera MS, Santos WRA, Morales BP, Bezerra CCF, Nishiwaka MM, et al. First isolation of *Cryptococcus gattii* molecular type VGII and *Cryptococcus neoformans* molecular type VNI from environmental sources in the city Belem, Para, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104(4):662-64.

Cuenca-Estrella M, Lee-Yang W, Ciblak MA, Arthington-Skags BA, Mellado E, Warnock DW et al. Comparative evaluation of NCCLS M27 A and EUCAST broth

microdilution procedures for antifungal susceptibility testing of *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(11):3644-7.

Dannanoui E, Abdul M, Arpin M, Michel-Nguyen A, Piens MA, Favel A, et al. Results obtained with various antifungal susceptibility testing methods do not predict early clinical outcome in patients with cryptococcosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:2464-70.

De Bedout C, Ordóñez N, Gómez BL, Rodríguez MC, Arango M, Castaneda RA. *In vitro* antifungal susceptibility of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *Revista Iberoamericana de Micología* 1999;16:36-9.

Dias ALT, Matsumoto FE, Melhem MSC, Silva EG, Auler ME, Siqueira AM, et al. Comparative analysis of Etest and broth microdilution method (AFST-EUCAST) for trends in antifungal drug susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans* isolates. *Journal of Medical Microbiology* 2006;55:1693-99.

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;23(4): 535-45.

Ellis DH, Pfeiffer TJ. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *J Clin Microbiol.* 1990;28(7):1642-44.

Ernest E, Klepser ME, Pfaller MA. Postantifungal effects of echinocandin, azole and polyene antifungal agents *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:1108-11.

Escadon P, Sanchez A, Martinez M, Meyer W, Castañeda E. Molecular epidemiology of clinical and environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex reveals a high genetic diversity and the presence of the molecular type VGII mating type a in Colombia. *FEMS Yeast Res* 2006;6:625–35.

Espinel-Ingroff A, Barchiesi F, Cuenca-Estrella M, Fothergill A, Pfaller MA, Rinaldi M, Rodriguez-Tudela JL, Verweij PE. Comparison of Visual 24-Hour and Spectrophotometric 48-Hour MICs to CLSI Reference Microdilution MICs of Fluconazole, Itraconazole, Posaconazole, and Voriconazole for *Candida* spp.: a Collaborative Study. *J Clin Microbiol* 2005;43:4535-40.

Espinel-Ingroff A, Chowdhary A, Cuenca-Estrella M, Fothergill A, Fuller J, Hagen F, et al. *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* Species Complex: an International Study of Wild-Type Susceptibility Endpoint Distributions and Epidemiological Cutoff Values for Amphotericin B and Flucytosine Antimicrob Agents Chemother. 2012;56:3107-13.

Firacative C, Torres G, Rodríguez MC, Escadón P. First environmental isolation of *Cryptococcus gattii* serotype B, from Cúcuta, Colombia. *Biomédica*. 2011;(1):31.

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;5:137–40.

Gomez-Lopez A, Zaragoza O, Martins MA, Melhem MC, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. In vitro susceptibility of *Cryptococcus gattii* clinical isolates. *Clin Microbiol Infect* 2008;14:727–30.

Graybill JR, Montalbo E, Kirkpatrick WR, Luther MF, Revankar SG, Patterson TF. Fluconazole versus *Candida albicans*: a complex relationship. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:2938-42.

Hagen F, Illnait-Zaragozi MT, Bartlett KH, Swinne D, Geertsen E, Klaassen CH, et al. In vitro antifungal susceptibilities and AFLP genotyping of a worldwide collection of 350 clinical, veterinary and environmental *Cryptococcus gattii* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:5139-45.

Harris JR, Lockhart SR, Debess E, Marsden-Haug N, Goldoft M, Wohrle R. et al. *Cryptococcus gattii* in the United States: Clinical Aspects of Infection With an Emerging Pathogen. *Clinical Infectious Diseases* 2011;53(12):1188–95.

Iqbal N, Debess EE, Wohrle R, Sun B, Nett RJ, Ahlquist AM, et al. Correlation of genotype and in vitro susceptibilities of *Cryptococcus gattii* from the Pacific Northwest of the United States. *J Clin Microbiol* 2010;48:539-44.

Joseph-Horne TR, Loefflin DW, e Kelly SL. Amphotericin B resistant isolates of *Cryptococcus neoformans* without alteration of in sterol biosynthesis. *J. Med. Mycol* 1996;34: 223-225.

Keele DJ, Delallo VC, Lewis RE, Ernst EJ, Klepser ME. Evaluation of amphotericin B and flucytosine in combination against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* using time-kill methodology. *Diag Microbiol Infect Dis* 2001;41: 121-6.

Kelly SL, Lamb DC, Taylor M, Corran AJ, Baldwin BC, e Powderly WG. Resistance to amphotericin B associated with defective sterol delta 8-7 isomerase in a *Cryptococcus neoformans* strain from an AIDS patient. *FEMS Microbiol.* 1994;122: 39-42.

Khan ZU, Randhawa HS, Kowshik T, Chowdhary A, Chandy R. Antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates from decayed wood of trunk hollows of *Ficus religiosa* and *Syzygium cumini* trees in north-western India. *J Antimicrob Chemother* 2007;60:312–16.

Kidd SE, Hagen F, Tschake 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 USA* 2004;101:17258–63.

Klepser ME, Ernst EJ, Ernst ME, Pfaller MA. Growth medium effect on the antifungal activity of LY 303366. *Diag Microbiol Infect Dis* 1997;29:227-31.

Klepser ME, Ernst EJ, Lewis RE, Ernst ME, Pfaller MA. Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results: Proposal for Standardized Methods. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1998;1207-12.

Kwon-Chung, K. J. A new species of *Filobasidiella*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans* B and C serotypes. *Mycologia* 1976;942–946.

Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Cryptococcosis. In Kwong-Chung KJ & Bennett JE (eds.), *Medical Mycology* 1992 1st ed., Lea & Febiger, Philadelphia, 392-446.

Kwong-Chung KJ, Boekhout T, Fell JW, Diaz M. Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae). *Taxon*. 2002;51:804-6.

Kwong-Chung KJ, Polacheck I, Bennett JE. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C). *J Clin Microbiol* 1982;15:535–7.

Kwon-Chung KJ, Varma SA. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? *FEMS Yeast Res* 2006;6:574-87.

Larone DH. *Medically Important Fungi: A guide to identification*. 3<sup>rd</sup> ed. ASM Press, Washington, DC. 1995;244.

Lazera MS, Cavalcanti MA, Trilles L, Nishikawa MM, Wanke B. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* – evidence for a natural habitat related to decaying wood in a porttery tree hollow. *Med Mycol*. 1998;36(2):119-22.

Lazera MS, Cavalcanti SMA, Londero AT, Trilles L, Nishikawa MM, Wanke B. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. *Med Mycol* 2000;38:379–83.

Lazera, MS, Wanke B, Nishikawa MM. Isolation of both varieties of *Cryptococcus neoformans* from saprophytic sources in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*. 1993;31:449-454.

Lin X, Heitman J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annual Review of Microbiology* 2006;8:69-105.

Linderberg ADC, Chang MR, Paniago AMM, Lazéra M dos S, Moncada PM, Bonfim GF, et al. Clinical and epidemiological features of 123 cases of cryptococosis in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2008;50:75-78.

Macdougall L, Kidd SE, Galanis E, Mak S, Leslie MJ, Cieslak PR, et al. Spread of *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and detection in the Pacific Northwest, USA. *Emerg Infect Dis* 2007;13:42–50.

Meyer W, Marszewska K, Amirmostofina M, Igreja RP, Hardtke C, Methiling K, et al. Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by PCR-fingerprinting and RAPD. A pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. *Electrophoresis* 1999;20:1790-99.

Meyer W, Trilles L. Genotyping of the *Cryptococcus neoformans* /*C. gattii* species complex. *Aust Biochem* 2010;41:11-15.

Meyer W, Aanensen DM, Boekhout T, Cogliati M, Diaz MR, Esposto MC, et al. Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Med Mycol* 2009;1-14.

Meyer W, Castaneda A, Jackson S, Huynh M, Castaneda AE, Melhem MSC. IberoAmerican Cryptococcal Study Group. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerg Infect Dis*. 2003;9: 189-95.

Mitchel TG, Perfect JR. Cryptococcosis in the era of AIDS: 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. Clin Microbiol Rev Washington, DC.1995 Oct 8 (4):515-548.

Mora ADJ, Pedrosa AL, Rodrigues V, Leite Maffei CM, Trilles L, Dos Santos Lazéra M, et al. Genotype and mating type distribution within clinical *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates from patients with cryptococcal meningitis in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. Med Mycol 2010;48:561–9.

Morera-Lopez Y, Torres-Rodriguez JM, Jimenez-Cabello T, Baro-Tomas T. *Cryptococcus gattii*: in vitro susceptibility to the new antifungal albiconazole versus fluconazole and voriconazole. Med Mycol 2005;43:505–10.

Morgan J, McCarthy KM, Gould S. *Cryptococcus gattii* infection: characteristics and epidemiology of cases identified in a South African province with high HIV seroprevalence, 2002–2004. Clin Infect Dis 2006;43:1077–80.

Nooney L, Matthews RC, Burnie JP. Evaluation of Mycograb, amphotericin B, caspofungin, and fluconazole in combination against *Cryptococcus neoformans* by checkerboard and time–kill methodologies. Diagn Microbiol Infect Dis 2005;51:19–29.

Ohkusu M, Tangonan N, Takeo K, Kishida E, Ohkubo M, Aoki S, et al. Serotype, mating type and ploidy of *Cryptococcus neoformans* strains isolated from patients in Brazil. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 2002;44:299-302.

Pappalardo MCSM, Melhem MSC. Cryptococcosis: a review of the Brazilian experience for the disease. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 2003;45(6):299-305.

Pappalardo MCS, Szeszs MW, Martins MA, Baceti LB, Bonfietti LX, Purisco SU, et al. Susceptibility of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* to amphotericin B using time–kill methodology. Diagn Microbiol Infect Dis 2009; 64:146–51.

Pappas PG, Perfect JR, Cloud GA, Larsen RA, Pankey GA, Lancaster DJ, et al. Cryptococcosis in human immunodeficiency virus-negative patients in the era of effective azole therapy. *Clin Infect Dis* 2001;33(5):690-9.

Pasa CR. Tipagem molecular e suscetibilidade antifúngica de *Cryptococcus* isolados de pacientes em hospital universitário com investigação domiciliar [Tese]. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul 2011.

Pearson RD, Steigbigel DRT, Davis HT, Chapman SW. Method for reliable determination of minimum lethal antibiotic concentrations. *Antimicrob Agents Chemother* 1980;18:699-708.

Park BJ, Arthington-Skaggs BA, Hajjeh RA, Iqbal N, Ciblak MA, Lee-Yang W, et al. Evaluation of amphotericin B interpretive breakpoints for *Candida* bloodstream isolates by correlation with therapeutic outcome *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50:1287-92.

Perfect JR, Cox GM. Drug resistance in *Cryptococcus neoformans*. *Drug Resist Updat* 1999;2:259–269.

Perfect JR, Casadevall A. Cryptococcosis. *Infect Dis Clin N Am*. 2002; 16:837-74.

Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, Goldman DL, Graybill JR, Hamill RJ, et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2010;50:291–322.

Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, Rice C, Tendolkar S, Hollis RJ, et al. Global trends in the antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* (1990 to 2004). *J Clin Microbiol* 2005;43:2163–7.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. Fármacos antifúngicos. *Farmacologia*. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier 2004;758-64.

Rex JH, Cooper CR, Merz JR, Galgiani JN, Anaissie EJ. Detection of amphotericin B-resistant *Candida* isolates in a broth based system. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:906-9.

Richardson MD, Warnock DW. *Antifungal Drugs. Fungal Infection: diagnosis and management.* Oxford: Blackwell 1993;17-42.

Rodero L, Córdoba S, Cahn P, Hochenfellner F, Davel G, Canteros SC, Kaufman S, Guelfand L. In vitro susceptibility studies of *Cryptococcus neoformans* isolated from patients with no clinical response to amphotericin B therapy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2000;45:239-42.

Rodero L, Mellado E, Rodriguez AC, Salve A, Guelfand L, Cahn P, et al. G484S amino acid substitution in lanosterol 14- $\alpha$  demethylase (ERG11) is related to fluconazole resistance in a recurrent *Cryptococcus neoformans* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47(11):3653-6.

Rodríguez-Tudela JL, Almirante B, Rodríguez-Pardo D, Laguna F, Donnelly PJ, Mouton JW, Pahisssa A, et al. Correlation of the MIC and Dose/MIC ratio of fluconazole to the therapeutic response of patients with mucosal candidiasis and candidaemia. *Agents Antimicrobiol Chemother* 2007Oct;51(10):3599-604.

Rodriguez-Tudela JL, Arendrup MC, Barchiesi F, Bille J, Chryssanthou E, Cuenca-Estrella M, et al. EUCAST definitive document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14:398-405.

Sambrook J, Maniats T, Fritsch EF. *Molecular Cloning.* Cold Spring Harbor Laboratory 1989;2.

Santos WR, Meyer W, Wanke B, Costa SP, Trilles L, Nascimento JL, et al. Primary endemic *Cryptococcus gattii* by molecular type VGII in the state of Para, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2008;103:813–8.

Shin JH, Shin DH, Song JW, Kee SJ, Suh SP, Ryang DW. Electrophoretic Karyotype Analysis of Sequential *Candida parapsilosis* Isolates from Patients with Persistent or Recurrent Fungemia. J Clin Microbiol 2001;39: 1258–63.

Sionov E, Chang YC, Garrafo HM, Kwon-Chung KJ. Heteroresistance to fluconazole in *Cryptococcus neoformans* is intrinsic and associated with virulence. Antimicrob Agents Chemother 2009;53:2804–15.

Sionov E, Lee H, Chang YC, Kwon-chung KJ. *Cryptococcus neoformans* Overcomes Stress of Azole Drugs by Formation of Disomy in Specific Multiple Chromosomes. PLoS Pathog 2010;6(4): e1000848.

Sorrel, TC. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. Med Mycol 2001;39:155-68.

Speed BR, Dunt D. Clinical and hosts differences between infections with the two varieties of *C. neoformans* . Clin Infect Dis 1995;21:28-34.

Springer DJ, Chatudervi V. Projecting global occurrence of *Cryptococcus gattii*. Emerg Infect Dis. 2010;16(1):14-20.

Staib, F. Vogelkot, ein Nashsubstrat für die Gattung *Cryptococcus*. Zbl. Bakt., 186: 233-247, 1962.

Steele KT, Thakur R, Nthobatsang R, Steenhoff AP, Bisson, GP. In-hospital mortality of HIV-infected cryptococcal meningitis patients with *C. gattii* and *C. neoformans* infection in Gaborone, Botswana Medical Mycology 2010; 48:1112–15.

Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST definitive

document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. *Clin Microbiol Infect* 2008;14:398-405.

Tay ST, Tany HT, Ng KP, Rohani MY, Hamimah H. In vitro susceptibilities of Malaysian clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii* to five antifungal drugs. *Mycoses* 2006;49:324–30.

Thompson GR, Wiederhold NP, Fothergill AW, Vallor AC, Wickes BL, Patterson TF. Antifungal susceptibilities among different serotypes of *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;(53):309–11.

Torres-Rodriguez JM, Alvarado-Ramirez E, Murciano F, Sellart M. MICs and minimum fungicidal concentrations of posaconazole, voriconazole and fluconazole for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *J Antimicrob Chemother* 2008;62:205-6.

Trilles L, Fernandez-Torrez B, Lazera MS, Wanke B, Guarro J. In vitro antifungal susceptibility of *Cryptococcus gattii*. *J Clin Microbiol* 2004;42:4815–7.

Trilles L, Lazera M, Wanke B, Oliveira RV, Barbosa GG, Nishikawa MM, et al. Regional pattern of the molecular type of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008;5:455–62.

Trilles L, Meyer W, Wanke B, Guarro J, Lazera M. Correlation of antifungal susceptibility and molecular type within the *Cryptococcus neoformans*/*C. gattii* species complex [published online ahead of print 23 Aug] *Med Mycol*. 2011

Varma A, Kwon-Chung KJ. Heteroresistance of *Cryptococcus gattii* to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:2303-11.

Xue C, Tada Y, Dong X, Heitman J. The human fungal pathogen *Cryptococcus* can complete its sexual cycle during a pathogenic association with plants. *Cell Host Microbe* 2007;1:263-62.

White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbial Rev* 1998;11:382-402.

Zaragoza O, Mesa-Arango AC, Gómez-Lopez A, Bernal-Martínez L, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Process Analysis of Variables for Standardization of Antifungal Susceptibility Testing of Non-Fermentative Yeasts. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55:1563-70.

## **APÊNDICES e ANEXOS**

Apêndice 1. Dados dos isolados clínicos

<b>Número</b>	<b>Cepa</b>	<b>Iniciais</b>	<b>Ano</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade</b>	<b>Mat. Biol.</b>	<b>HIV</b>	<b>Cidade</b>
1	186/94	ER	1994	NI	NI	Líquor	ni	S. José do Rio Preto
2	197/94	RPS	1994	NI	NI	Líquor	pos	S. José do Rio Preto
3	217/94	GP	1994	NI	NI	Líquor	ni	Ribeirão Preto - Sertãozinho
4	40/96	PRT	1996	NI	NI	Líquor	neg	Limeira
5	45/97	JLC	1997	NI	NI	Líquor	pos	Sorocaba
6	47/97	MJM	1997	NI	NI	Líquor	pos	Sorocaba
7	128/97	JAB	1997	NI	NI	Líquor	pos	S. José do Rio Preto
8	05/98	AM	1998	M	40	Líquor	pos	Sorocaba - Avaré
9	51/98	IOF	1998	NI	NI	Líquor	neg	S. José do Rio Preto
10	114/98	RI	1998	NI	NI	Líquor	pos	S. José do Rio Preto
11	118/98	AAR	1998	NI	NI	Líquor	pos	Campinas- Paulínia
12	127/98	OJM	1998	NI	NI	Líquor	pos	Campinas- Jundiáí
13	132/98	CBL	1998	NI	NI	Líquor	pos	Campinas
14	01/99	GSA	1999	NI	NI	Líquor	neg	São Paulo
15	21/99	AFS	1999	NI	NI	Líquor	ni	Sorocaba- Tatuí
16	64/99	LCG	1999	M	31	Líquor	pos	Campinas - Piracicaba
17	67/99	DAS	1999	NI	NI	Líquor	neg	Campinas- Indaiatuba
18	275/99	UA	1999	NI	NI	Líquor	pos	S. José do Rio Preto
19	02/00	EB	2000	F	NI	Líquor	ni	SP- DST/AIDS N. Sra do Ó
20	43/00	VLFS	2000	M	50	Líquor	pos	Campinas
21	237/00	MAP	2000	F	43	Líquor	ni	Bauru
22	1869/00	GPS	2000	NI	NI	Líquor	neg	São Paulo
23	20/01	MTY	2001	M	25	Líquor	neg	IIER
23	1913/01	MBB	2001	NI	NI	Líquor	pos	S. José do Rio Preto
25	30/01	RCM	2001	M	10	Líquor	ni	IIER
26	118/01	CRT	2001	NI	NI	Líquor	neg	Campinas-PUCC
27	121/01	ACNS	2001	F	NI	Líquor	neg	Campinas-Itatiba
28	125/01	SMS	2001	M	NI	Líquor	ni	Campinas-HMMG
29	136/01	MCG	2001	M	NI	Líquor	pos	S. José do Rio Preto
30	174/01	BAM	2001	M	NI	Líquor	pos	IAL Campinas-Jundiáí

Continuação do apêndice 1.

31	188/01	NFM	2001	M	NI	Líquor	ni	IIER
32	28/02	JFM	2002	M	12	Líquor	neg	Hospital Universitário - USP
33	74/02	FLS	2002	M	35	Líquor	neg	Sorocaba
34	93/02	JBO	2002	M	51	Líquor	ni	Campinas
35	95/02	VMB	2002	M	NI	Líquor	ni	IAL Campinas-Jundiaí
36	87/03	EJC	2003	M	50	Líquor	ni	IAL Campinas-Jundiaí
37	131/03	GAN	2003	M	NI	Líquor	neg	IIER
38	196/03	LPT	2003	F	NI	Líquor	ni	IIER
39	194/04	SCFM	2004	F	21	Líquor	pos	Ribeirão Preto – Sertãozinho
40	582/04	GRM	2004	F	34	LBA	neg	HC- SP
41	600/04	MJR	2004	F	48	Líquor	pos	IAL Campinas-Valinhos
42	34/05	MRS	2005	M	NI	Líquor	ni	Atibaia
43	86/05	NPL	2005	M	27	Líquor	ni	Ubatuba-IAL Taubaté
44	1-54131-1/01	GGL	2001	M	31	Líquor	ni	Taubaté
45	1-57050-1/01	SCB	2001	F	36	Líquor	pos	São Paulo
46	2-12357-1/09	MJSS	2009	F	NI	Líquor	ni	Bauru
47	10-3940-1/09	CMCC	2009	NI	NI	Líquor	ni	S. José do Rio Preto
48	10-3945-1/09	MF	2009	43	NI	Líquor	ni	S. José do Rio Preto
49	1-103947-1/09	JPB	2009	65	NI	Líquor	ni	S. José do Rio Preto
50	1-1154-1/09	DSS	2001	26	NI	Líquor	ni	São Paulo

Apêndice 2. Tipos moleculares e susceptibilidade a antifúngicos de 55 isolados clínicos e ambientais de *C. gattii*

<b>Número</b>	<b>Cepa</b>	<b>Genótipo</b>	<b>FLU</b>	<b>AMB</b>
1	186/94	VGII	64	0,5
2	197/94	VGII	8	0,5
3	217/94	VGII	16	0,5
4	40/96	<b>VGI</b>	4	0,25
5	45/97	VGII	16	0,5
6	47/97	VGII	16	0,25
7	128/97	VGII	8	0,5
8	05/98	VGII	8	0,5
9	51/98	VGII	4	0,25
10	114/98	VGII	64	0,25
11	118/98	VGII	8	0,12
12	127/98	VGII	4	0,5
13	132/98	VGII	4	0,5
14	01/99	VGII	8	0,5
15	21/99	VGII	8	0,5
16	64/99	VGII	16	0,5
17	67/99	VGII	4	0,5
18	275/99	VGII	4	0,25
19	02/00	VGII	8	0,5
20	43/00	VGII	8	0,5
21	237/00	VGII	1	0,5
22	1869/00	VGII	8	0,5
23	20/01	VGII	8	0,5
23	1913/01	<b>VGI</b>	4	0,5
25	30/01	VGII	4	0,25
26	118/01	VGII	4	0,25

27	121/01	VGII	2	0,25
28	125/01	VGII	4	0,5
29	136/01	VGII	8	0,5
30	174/01	VGII	8	0,25
31	188/01	VGII	64	0,5
32	28/02	VGII	8	0,5
33	74/02	VGII	8	0,5
34	93/02	VGII	8	0,5
35	95/02	VGII	4	0,5
36	87/03	VGII	8	0,5
37	131/03	<b>VGI</b>	8	0,12
38	196/03	VGII	4	0,12
39	194/04	VGII	32	0,12
40	582/04	VGII	4	0,12
41	600/04	VGII	8	0,12
42	34/05	VGII	8	0,12
43	86/05	VGII	16	0,5
44	1-54131-1/01	VGII	8	0,12
45	1-57050-1/01	VGII	16	0,25
46	2-12357-1/09	VGII	16	0,5
47	10-3940-1/09	VGII	8	0,5
48	10-3945-1/09	VGII	8	0,5
49	1-103947-1/09	VGII	8	0,25
50	1-1154-1/09	VGII	16	0,5
51	82-ICB	<b>VGI</b>	8	0,12
52	182-ICB	VGII	4	0,12
53	183-ICB	VGII	8	0,12
54	184-ICB	VGII	8	0,25
55	2G	<b>VGI</b>	4	0,12

## ANEXO 1



ELSEVIER

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

SciVerse ScienceDirect

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 72 (2012) 332–339

DIAGNOSTIC  
MICROBIOLOGY  
AND INFECTIOUS  
DISEASE

[www.elsevier.com/locate/diagmicrobio](http://www.elsevier.com/locate/diagmicrobio)

# Susceptibility to antifungal agents and genotypes of Brazilian clinical and environmental *Cryptococcus gattii* strains<sup>☆</sup>

Dayane C. Silva, Marilena A. Martins, Maria Walderez Szeszs,  
Lucas X. Bonfietti, Dulcilena Matos, Marcia S.C. Melhem\*

*Mycology Unit of Adolfo Lutz Institute, Public Health Reference Laboratory, Secretary of Health, São Paulo-SP, 01246-902, Brazil*

Received 25 October 2011; accepted 23 November 2011

## Abstract

There are few reports concerning the in vitro antifungal susceptibility of clinical and environmental *Cryptococcus gattii* isolates. In this study, we performed polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism to investigate the molecular subtypes of 50 clinical and 4 environmental Brazilian isolates of *C. gattii* and assessed their antifungal susceptibility for fluconazole (FLU) and amphotericin B (AmB) according to recent recommendations proposed for antifungal susceptibility testing of nonfermentative yeasts. Time–kill curve studies were performed using RPMI 1640 medium to analyze the fungicidal effect of AmB. We found 47 VGII (94%) molecular types and 3 VGI (6%) types among the clinical isolates. The environmental isolates were VGII (75%) subtype and VGI (25%) subtype. The FLU-MIC ranged from 1 to 64 mg L<sup>-1</sup>, and MIC<sub>50</sub>/MIC<sub>90</sub> values were, respectively, 8/16 mg L<sup>-1</sup>. For AmB, the MICs were low and homogeneous, ranging from 0.12 to 0.5 mg L<sup>-1</sup>, for VGI or VGII. The time required to reach the fungicidal end point (99.9% killing) was 6 h for the majority of strains (64%), but viable cells of VGII were still present after 48 h of exposition. We pointed out the occurrence of high FLU-MICs for *C. gattii* isolates with highest values for VGII. Our data also suggest that the rate of killing of *C. gattii* by AmB is strain dependent, and viable cells of VGII genotype strains were still observed after an extended incubation time, addressing future studies to determine whether the in vitro fungicidal activity could be clinically relevant.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** *Cryptococcus gattii*; Molecular types; Antifungal susceptibility; Time–kill study

## 1. Introduction

*Cryptococcus* species are basidiomycetous fungi capable of causing invasive infections in both humans and animals. The major human pathogens in the genus *Cryptococcus* are *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* (Brandt et al., 1996; Iqbal et al., 2010). *C. gattii* has its common ecological niche in the environment and is estimated to have diverged from *Cryptococcus neoformans* 37.5 million years ago (Byrnes et al., 2011).

*Cryptococcus gattii* can be discerned from *C. neoformans* using a wide range of phenotypical and molecular techniques

(Boekhout et al., 2001; Meyer and Trilles, 2010; Meyer et al., 2009). The *Cryptococcus* species complex has been divided into 8 major molecular types by polymerase chain reaction (PCR) fingerprinting, amplification fragment length polymorphism (AFLP), restriction fragment length polymorphism (RFLP), and, more recently, multilocus sequencing typing analysis. Results indicate that VNI and VNII genotypes correspond to serotype A, VNIII is related to serotype AD, and VNIV to serotype D of *C. neoformans*. However, VGI, VGII, VGIII, and VGIV contain isolates of both serotypes (B and C) of *C. gattii* (Boekhout et al., 2001; Iqbal et al., 2010; Latouche et al., 2003; Meyer et al., 2003, 2009; Santos et al., 2008). The VNI genotype is distributed worldwide and can be recovered mainly from AIDS patients; on the other hand, VGI is associated with infection in immunocompetent hosts and is the most common genotype in Asian countries (Feng et al., 2008; Tay et al., 2006). The VGII genotype occurs in Oceania and in

<sup>☆</sup> This research was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo (FAPESP) processo (2010/04508-0).

\* Corresponding author. Tel.: +55-11-3068-2890; fax: +55-11-3068-2890.

E-mail address: [melhemr@uol.com.br](mailto:melhemr@uol.com.br) (M.S.C. Melhem).

North and South American countries (Ellis et al., 2000; Escandon et al., 2006; Igreja et al., 2004; Kidd et al., 2004, 2005; MacDougall et al., 2007; Matsumoto et al., 2007; Sionov et al., 2010). Most clinical and environmental isolates from the south, southeast, and central-west Brazilian regions are VNI, whereas VGII predominates in the north and northeastern regions of Brazil, especially causing disease in immunocompetent young adults and children (Casali et al., 2003; Meyer et al., 2003; Ribeiro and Ngamskulrungraj, 2008; Santos et al., 2008). *C. gattii* is known as a primary pathogen and is linked with high mortality rates, lengthy treatment regimens, long-term sequelae, and frequently high rates of therapeutic failures (Mitchell et al., 1995; Perfect et al., 2010; Sorrell, 2001). *C. gattii* cryptococcosis therapy with fluconazole (FLU) and amphotericin B (AmB) antifungal agents has also been reported to be more difficult than infections caused by *C. neoformans* (Speed and Dunt, 1995; Santos et al., 2008). Currently, no interpretative breakpoints are defined for any antifungal agents against this specie, and the relationship between in vivo and in vitro AmB activity on cryptococcosis is still a concern in clinical practice (Speed and Dunt, 1995). It is recognized that broth microdilution methods are not suitable for detecting resistance to AmB, and time–kill methodologies have been proposed to obtain a clearer understanding of the killing patterns of AmB. The aim of this study was to assess the fungicidal activity of amphotericin B and the susceptibility to FLU of clinical and

Susceptibility Testing of fermentative yeasts (AFST-EUCAST, definitive document 7.1) added by recent recommendations (Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST); Zaragoza et al., 2011). The tested antifungal drugs included AmB (Sigma, St. Louis, MO, USA) and FLU (Pfizer, São Paulo, Brazil). Stock solutions were prepared in water (FLU) or dimethylsulfoxide (AmB). Further dilutions of each antifungal agent were prepared with (RPMI) broth medium 1640, with 2% glucose and L-glutamine (Cultilab, São Paulo, Brazil), adjusted to a pH of 7.0 with 0.165 mol L<sup>-1</sup> morpholinepropanesulfonic acid (MOPS) (Sigma). The drug dilutions were dispensed in 96-well microdilution plates, sealed and frozen at -70 °C until needed. The final concentrations of the drugs ranged from 0.125 to 64 µg mL<sup>-1</sup> for FLU and from 0.03 to 16 µg mL<sup>-1</sup> for AmB. The yeast inoculum was adjusted to a concentration of 0.5–2.5 × 10<sup>5</sup> cells per milliliter in RPMI medium, and an aliquot of 0.1 mL was added to each well containing various concentrations of antifungal drugs. Drug-free and yeast-free controls were included, and microplates were incubated at 35 °C for 72 h. The MIC end points were read up to 72 h, with the aid of a 530-nm-filter spectrophotometer (Titertek Multiskan, Sweden) and defined for FLU as the lowest drug concentration that caused a prominent decrease in growth (50%) in the controls. For AmB, the MIC was defined as the

environmental *C. gattii* genotypes obtained around the southeast part of Brazil.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Isolates

Between 1994 and 2010, a total of 3450 isolates of *Cryptococcus* spp. from medical centers throughout the cities located in the central and southeast region of Brazil were submitted to a public reference center laboratory (Adolfo Lutz Institute, São Paulo, Brazil) for identification and antifungal susceptibility testing. Among these, 50 clinical isolates of *C. gattii* were obtained from cerebrospinal fluid samples and pulmonary sample (1 strain) and were included in this study. Additionally, we studied 4 environmental strains of *C. gattii* obtained from soil that contained bird excrements.

All isolates were identified by standard methods and were confirmed as *C. gattii* phenotype using canavanine–glycine–bromthymol blue medium (Kwon-Chung et al., 1982) and were kept frozen in glycerol 15% solutions under -20 °C, until ready for use in the study. Before testing, each isolate was plated on CHROMagar (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) to ensure purity and viability.

### 2.2. Antifungal susceptibility testing

MIC results were performed according to the recommendations proposed by the European Committee for Antibiotic

lowest concentration at which there was ≥90% inhibition of growth compared with the drug-free control wells. Data are reported as MIC ranges and MICs of each antifungal agent necessary to inhibit 50% (MIC<sub>50</sub>) and 90% (MIC<sub>90</sub>) of the isolates tested. We consider high MICs (≥16 mg L<sup>-1</sup>) based on the values considered relevant for FLU (Aller et al., 2000) and for AmB those used previously (≥2 mg L<sup>-1</sup>) (Dannaoui et al., 2005; Pfaller et al., 2005).

Following the AFST-EUCAST recommendations, 2 quality control strains, *Candida krusei* (ATCC 6258) and *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), were used with each test. More than 99% of the QC results were within the acceptable limits. The reproducibility of the in vitro results was assessed by determining the MICs for all strains twice on 2 different days.

### 2.3. Genotype determination by *URA5-RFLP*

Amplification reactions of the *URA5* gene were performed in a final volume of 50 µL as described previously (Meyer et al., 2003). Each reaction contained 50 ng of DNA; 1 × PCR buffer (10 mol L<sup>-1</sup> Tris–HCl, pH 8.0; 50 mol L<sup>-1</sup> KCl); 0.2 mol L<sup>-1</sup> each of dATP, dCTP, dGTP, and dTTP; 2 mol L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>; 1.5 U of Taq DNA polymerase; and 50 ng of each primer of *URA5* (5'-ATGTCCTCCCAAGCCCTCGACTCCG3') and *SJ01* (5'-TTAAGACCTCTGAACACCGTACTC-3') (Invitrogen, Brazil). The PCR consisted of an initial denaturation at 95 °C for 4 min, followed by 34 cycles of amplification: 45 s of denaturation

at 94 °C, 1 min of annealing at 57 °C, and 1 min of extension at 72 °C. A final extension step was applied at 72 °C for 10 min. A volume of 30 µL of the PCR amplicons was double digested with *Cfr131* (isomer of *Sau96I*) (10 U µL<sup>-1</sup>) and *HhaI* (20 U µL<sup>-1</sup>) (Fermentas, Brazil), and then incubated in a dry bath at 37 °C for 3 h. The restricted fragments were separated by electrophoresis on 2% agarose gels at 100 V for 40 min. *URA5*-RFLP patterns were assigned visually by comparison with patterns obtained from standard strains representing 8 molecular types (Meyer et al., 2003).

#### 2.4. Time-kill curves

Time-kill curves were carried out as previously described (Klepser et al., 2000; Nooney et al., 2005; Rodero et al., 2000a,b). Before testing, isolates were subcultured on potato dextrose agar plates. Individual colonies (≥1 mm) from 48-h culture were suspended in 10-mL buffered RPMI 1640 with 2% glucose and L-glutamine medium. Isolates were grown overnight with shaking at 35 °C. Initial inoculum was adjusted to 0.5 McFarland turbidity standard (10<sup>6</sup> CFU mL<sup>-1</sup>). One milliliter of the adjusted fungal suspension was then added to either a 9-mL MOPS-buffered RPMI medium alone (control) or a solution of growth medium plus an appropriated amount of AmB stock solution. Amphotericin B was tested at a concentration of 1 mg L<sup>-1</sup> against all

### 3. Results

#### 3.1. Molecular characterization

All the isolates of *C. gattii* amplified a fragment of approximately 750 bp of the *URA5* gene, using the *URA5* and *SJ01* primers. Digestion of the specific fragment using the endonucleases *HhaI* and *Cfr131* (isomer of *Sau96I*) showed that, of the 50 isolates of *C. gattii*, 47 (94%) were of type VGII and 3 (6%) were VGI. The environmental isolates were of VGII (75%) and VGI (25%) types.

#### 3.2. Antifungal susceptibility

Geometric mean (GM), MIC ranges, and MICs inhibiting 90% (MIC<sub>90</sub>) and 50% (MIC<sub>50</sub>) of the isolates are shown in Table 1. There was a wide range of MICs for FLU (1–64 mg L<sup>-1</sup>). The geometric mean MICs vary widely by subtype, with VGII isolates generally having the highest values (11.9 mg L<sup>-1</sup>). The VGI isolates showed MIC<sub>50</sub>/MIC<sub>90</sub> values of 4/8 mg L<sup>-1</sup> and GM, 6.0 mg L<sup>-1</sup>. For the 47 genotype VGII clinical strains, the MIC<sub>50</sub>/MIC<sub>90</sub> values were 8/16 mg L<sup>-1</sup> and GM was 12.2 mg L<sup>-1</sup> to FLU. Not one VGI strain showed in vitro high MIC to FLU. On the other hand, FLU showed poor activity against the VGII subtype, with MIC values higher than 8 mg L<sup>-1</sup> for 24% of 50 isolates.

All isolates had relatively low MICs with AmB, and the range was small (0.12–0.5 mg L<sup>-1</sup>). High susceptibility to

isolates. The test tubes were incubated at 35 °C. Samples of 0.5 mL were removed at time points 0, 6, 12, 24, 48, and 72 h from each tube, serially diluted 1:10 in sterile deionizer water, and 30 µL was plated on yeast morphologic agar. After 72 h of incubation at 35 °C, colony counts were determined. AmB fungicidal effect was defined as ≥99.9% growth inhibition in colony count compared with the starting inoculum count. The lower limit of quantification was 33 CFU mL<sup>-1</sup>. All time-kill experiments were conducted in duplicate. Colony count data (in log<sub>10</sub> CFU mL<sup>-1</sup>) from duplicate time-kill studies were averaged and plotted as a function of time for each isolate.

AmB was observed among the *C. gattii* strains studied (GM 0.37, mg L<sup>-1</sup>; MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub>, 0.5 mg L<sup>-1</sup>), with very close MICs to both VGI and VGII subtypes.

#### 3.3. Time-kill curves

Time-kill plots of AmB activity against clinical and environment isolates are shown in Figs. 1 and 2. Overall, the times required to reach the fungicidal end point (≥99.9% killing) were 6 h for the majority of strains (64%), and the killing rate increased up to 82% at 12 h of exposition to the drug. Viable cells were noted after 48 h for 6% of the strains, but not at 72 h of exposition to AmB. The majority (75%) of

Table 1

MIC ranges, MIC<sub>50</sub>s, MIC<sub>90</sub>s, and geometric mean MICs for all 54 clinical and environmental *C. gattii* isolates and *URA5*-RFLP genotypes

<i>C. gattii</i>	Genotype (n)	Drug							
		Fluconazole				Amphotericin B			
		MIC (mg L <sup>-1</sup> )		Geometric mean	S/R <sup>a</sup>	MIC (mg L <sup>-1</sup> )		Geometric mean	S/R <sup>b</sup>
		Range	50/90			Range	50/90		
Environmental (n = 4)	VGI (1)	8				0.12			100/0
	VGII (3)	4–8	8/8	6.6		0.12–0.25	0.12/0.25	0.25	100/0
	All strains (4)	4–8	8/8	7		0.12–0.25	0.12/0.25	0.25	100/0
Clinical (n = 50)	VGI (3)	4–8	4/8	5.3		0.12–0.5	0.25/0.5	0.29	100/0
	VGII (47)	1–64	8/16	12.2	74.5/25.5	0.12–0.5	0.5/0.5	0.39	100/0
	All strains (50)	1–64	8/16	11.8	76.0/24.0	0.12–0.5	0.5/0.5	0.38	100/0
All <i>C. gattii</i> strains (n = 54)		1–64	8/16	11.9	77.7/22.2	0.12–0.5	0.5/0.5	0.37	100/0

<sup>a</sup> Fluconazole breakpoints by Aller et al. (2000).

<sup>b</sup> Amphotericin B breakpoints by Pfäler et al. (2005).

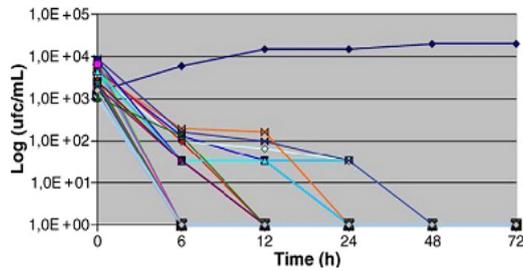


Fig. 1. Time–kill curves of 46 clinical isolates of *C. gattii* tested with 1 mg L<sup>-1</sup> of amphotericin B. Control (◆).

VGI (2 clinical, 1 environmental) isolates were killed at 6 h and only 1 died at 12 h of exposition time. Regarding the VGII subtypes, the time–kill period of 6 h was also the highest (61.7%) and after 12 h of exposition time, 38 (80.9%) isolates died.

#### 4. Discussion

The understanding of the dynamics of the infection by *C. gattii* was challenged after its occurrence in the Pacific Northwest region. Because *C. gattii* typically had been regarded as tropical or subtropical in geographic distribution, its emergence in a temperate climate calls for a global systematic surveillance to track *C. gattii* infections. The

The standard methods to determine MIC values are not completely reliable for assessing the antifungal susceptibility profile of nonfermentative yeasts such as *C. gattii*. This is due, in part, to the impaired growth of those yeasts in the proposed test conditions, including incubation temperature and culture medium. Recently, a comparative analysis of the growth kinetics and the antifungal susceptibility results of representative species of nonfermentative yeasts showed, besides other parameters, that incubation at 30 °C improved the growth kinetics of the organisms. We tested the antifungal susceptibility of all 54 isolates using this temperature since it was proven that the MIC values obtained by this condition showed a high percentage of agreement and significant correlation coefficient values between the reference methods by the Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI) and EUCAST (Zaragoza et al., 2011). We performed tests under both temperatures (35 °C and 30 °C) for all 54 strains in duplicate previously (data not shown), and we got similar MIC results (+1 log<sub>2</sub> dilution) for all antifungal drugs. Nevertheless, we found that a temperature of 30 °C made MIC determination easier and clearer because it yielded sufficient growth (optical density, ≥0.3) on RPMI medium in microdilution plates without shaking up to 72 h of incubation time.

No CLSI or EUCAST susceptibility breakpoints for *Cryptococcus* species are currently available for any of the antifungal agents. For testing *C. gattii* susceptibility to FLU, we used the so-called surrogate breakpoints applied to *C. neoformans* (Pfaller et al., 2005). We found decreased

strains should be examined by molecular and phenotypic tools to reveal the emergence of novel virulent or resistant genotypes, and allow for comparisons of disease-causing agents in different geographic areas. The prevalence of the VGII genotype (94%) observed in our study was similar to previous national data (76–100%). Latin American data (99.2%) and Australian data (71%), besides the reports from the United States (80%) and Canada (95%) (Campbell et al., 2005; Escandon et al., 2006; Kidd et al., 2004; MacDougall et al., 2007; Mora et al., 2010; Santos et al., 2008; Trilles et al., 2008), also demonstrate the prevalence of the VGII genotype among the *C. gattii* infections.

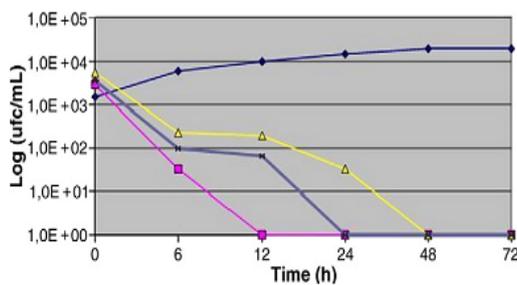


Fig. 2. Time–kill curves of 4 environmental isolates of *C. gattii* tested with 1 mg L<sup>-1</sup> of amphotericin B. Control (◆).

in vitro susceptibility (≥16 mg L<sup>-1</sup>) to FLU observed for 12 (22.2%) of 54 strains. Our finding is quite lower than the 33% of isolates in this category or higher (32 mg L<sup>-1</sup>) than that reported in Colombia (De Bedout et al., 1999) and is roughly double the 12.7% of isolates reported in Spain (Morera-Lopez et al., 2005). Although we did not find any isolates with FLU MICs of 32 mg L<sup>-1</sup>, a previous Brazilian study (Trilles et al., 2004) reported it among 57 isolates. Chen et al. (2000a,b) reported higher MICs (≥64 mg L<sup>-1</sup>) in 20% of the 18 *C. gattii* isolates from Australia that they tested for FLU. The MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> results for FLU (MIC<sub>50</sub>, 8 mg L<sup>-1</sup>; MIC<sub>90</sub>, 16 mg L<sup>-1</sup>) were comparable to those from other studies (Hagen et al., 2010; Iqbal et al., 2010; Trilles et al., 2011) and were 1 log<sub>2</sub> dilution lower than that found (MIC<sub>50</sub>, 16 mg L<sup>-1</sup>) in one study (Gomez-Lopez et al., 2008).

It is notable that, for *C. neoformans*, a significant rate (up to 44%) of the isolates had an MIC to FLU of >8 mg L<sup>-1</sup> (Pfaller et al., 2005) contrary to the most common yeast pathogen *Candida* spp. Inconsistent data exist on the in vitro susceptibility to azoles of *C. gattii* strains. Previous findings support a similar MIC range between *C. gattii* and *C. neoformans* (Torres-Rodriguez et al., 2008; Thompson et al., 2009). Nevertheless, other studies (Gomez-Lopez et al., 2008; Tay et al., 2006; Trilles et al., 2011) showed a high percentage of *C. gattii* isolates with higher MICs to FLU,

when compared with *C. neoformans* (Tay et al., 2006; Trilles et al., 2011). Furthermore, attention may be called to the report of Varma and Kwon-Chung (2010), showing that 86% of the *C. gattii* strains expressed a heteroresistance level of  $>16 \text{ mg L}^{-1}$  to FLU compared to 46% of *C. neoformans* strains. They found that all of the clinical isolates not exposed to azoles as well as the environmental strains manifested heteroresistance to FLU. Furthermore, this heteroresistance of the test strains was an intrinsic characteristic which was associated with their virulence. Thus, the inherently higher level of heteroresistance to FLU of *C. gattii* strains may be another factor that influences the MICs of the strains resulting in the variability of results of in vitro antifungal susceptibility reported in different studies (Varma and Kwon-Chung, 2010). Whether *C. gattii* strains have overall higher MICs than *C. neoformans* isolates is uncertain, but in comparison to *C. neoformans*, it seems that *C. gattii* requires more prolonged antifungal therapy because cryptococcomas are more common and require surgical removal (Perfect et al., 2010). Unfortunately, there have been no studies to date which correlate *C. gattii* MICs to clinical outcome, and so the relationship between elevated MICs and clinical outcome is not known. Until now, we know that there are only 4 studies on *C. neoformans* (Aller et al., 2000; Chowdhary et al., 2011; Dannanoui et al., 2006; White et al., 1998) comparing FLU MICs to clinical outcome and reaching opposite conclusions about the correlation of MIC results and clinical response. Chowdhary et al. (2011) observed increased MICs to FLU in serial isolates obtained after 1.5–2.5 months of therapy. This fact may partially

$\geq 8 \text{ mg L}^{-1}$ , while 2 (50%) genotype VGI isolates had a MIC of  $8 \text{ mg L}^{-1}$ . All of the isolates with MICs of  $\geq 16 \text{ mg L}^{-1}$  were of subtype VGII. Furthermore, both MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> values were double for the genotype VGII strains, in comparison with those for the VGI strains. The observation that FLU had poorer antifungal activity against the VGII genotype was a consistent finding in previous studies (Cheng et al., 2009; Chong et al., 2010; Chowdhary et al., 2011; Hagen et al., 2010; Iqbal et al., 2010; Trilles et al., 2011). However, the number of strains within genotype VGI is too small ( $n = 4$ ) to compare its antifungal susceptibility characteristics with those of the larger group ( $n = 50$ ) of strains within genotype VGII.

Amphotericin B MICs in this study were relatively low, with a maximum limit of  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$ , which classified all strains as susceptible, but the clinical significance of these values for *C. gattii* is unknown. Previous data demonstrated *C. gattii* isolates to be highly susceptible to AmB, and no difference was found in the susceptibilities among molecular types VNI, VGI, and VGII of Brazilian cryptococcal isolates (Trilles et al., 2011). Although some authors have demonstrated that *C. gattii* could be less susceptible than *C. neoformans* (Cheng et al., 2009; Khan et al., 2007). Although having higher GM values, the same as found in our study, none of the earlier publications described high MICs ( $\geq 2 \text{ mg L}^{-1}$ ) to AmB (Chen et al., 2000a,b; Gomez-Lopez et al., 2008; Hagen et al., 2010; Iqbal et al., 2010; Tay et al., 2006). Although the time–kill method reveals the inhibition activity of antifungal drugs and represents the most useful tool to monitor resistance, it

explain why these authors observed a lower susceptibility of the VGI isolates to FLU when compared to VNI isolates. These findings emphasize that more studies are needed to address this.

Only a few studies have reported the susceptibilities of *C. gattii* (Chen et al., 2000a,b; Chong et al., 2010; Chowdhary et al., 2011; De Bedout et al., 1999; Gomez-Lopez et al., 2008; Iqbal et al., 2010; Morera-Lopez et al., 2005; Morgan et al., 2006; Thompson et al., 2009; Trilles et al., 2011; Trilles et al., 2004) and a few of these studies divided isolates of *C. gattii* into groups according to their genotype. In a recent study, AFLP fingerprint analysis was employed to genotype *C. gattii* isolates, and the susceptibility testing showed that clinical strains belonging to AFLP6 (VGII) had significantly double geometric mean MICs for FLU compared to AFLP4 (VGI) isolates. Furthermore, studies have documented high-MIC strains for azoles among some molecular-type VGII genotypes in India (Chowdhary et al., 2011) and for those responsible for the Pacific Northwest outbreak (Hagen et al., 2010; Iqbal et al., 2010). A recent Australian study showed higher MICs for the azoles FLU and voriconazole for molecular-type VGII in comparison to those for VGI and for *C. neoformans* molecular types (Chong et al., 2010).

Interestingly, we found that genotype VGII isolates had comparatively higher FLU MICs (72% isolates; MIC,

remains important to achieve a clearer understanding of the killing patterns of AmB, a fungicidal agent. In a prior study (Pappalardo et al., 2009), by using time–kill curve methodologies, we have shown that the difference between fungistatic activities, assessed by MIC, and fungicidal activities could be strain dependent among *C. neoformans* clinical isolates. We performed time–kill analysis with an AmB concentration of  $1 \text{ mg L}^{-1}$  that represents up to 4 times the MIC of the 50 tested strains. We found different killing activities, depending on the *C. gattii* strain. The majority of the strains were killed after 6 h of exposition to the drug. Among low-MIC strains in microdilution method (MIC,  $0.12\text{--}0.5 \text{ mg L}^{-1}$ ), we found 3 (6.3%; 3/47) clinical isolates and 2 (50%; 2/4) environmental isolates for which a long exposition time (24–48 h) was required to reach the fungicidal end point. Interestingly, all these strains were VGII genotypes. On the contrary, all VGI genotype strains were killed by AmB at 6 h of exposition time. No regrowth (tolerance) was seen for *C. gattii* in this study like that reported for *C. neoformans* strains in a prior study (Pappalardo et al., 2009). Tolerance to AmB has been observed by time–kill curves, similarly as reported for *Candida* species (Cantón et al., 2003, 2004; Klepser et al., 1997; Keele et al., 2001; Rodero et al., 2000a,b). Several investigators have concluded that the rate of killing of *C. neoformans* was not correlated with the MIC for the

isolated tested (Burgess and Hastings, 2000; Nooney et al., 2005; Rodero et al., 2000a,b). In the same way, we did not find any association between time–kill results and MIC. By time–kill curve methodology, we observed distinct fungicidal patterns among low-MIC *C. gattii* strains to AmB. This may indicate that the MIC obtained by the broth microdilution method is limited for assessing the activity of AmB as previously suggested (Ernst et al., 2000; Pappalardo et al., 2009; Rex et al., 1995). This idea is based on the fact that time–kill curves provide a quantitative assessment of fungicidal activity as well as the rapidity of killing over time, so they provide more information than the broth microdilution method.

Reports on the in vitro antifungal susceptibilities of environmental isolates of *C. gattii* are scarce. Data on environmental strains could give useful information for the establishment of the epidemiologic breakpoints of this emerging species. We studied 4 genotypes obtained from soil containing bird excrements. While genotype VGII strains were prevalent (75%) compared to VGI strains (25%), in the largest global study of environmental *C. gattii* isolates to date (57 environmental strains), a similar percentage of each genotype was described (AFLP4/VGI, 21.9%; AFLP6/VGII, 22.5%) (Hagen et al., 2010). In this study, none of the 4 environmental *C. gattii* strains tested showed high in vitro MICs, either to FLU or to AmB, and, thus, all isolates remained highly susceptible, in accordance with previous data (Escandon et al., 2006; Hagen et al., 2010; Trilles et al., 2004). Although this study encompasses a low number of environmental

isolates, the lowest FLU and AmB MIC range was observed for the VGI strains. FLU MICs differed by a maximum of 1 log<sub>2</sub> dilution steps between environmental strains (MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub>, 8 mg L<sup>-1</sup>) and clinical strains (MIC<sub>50</sub>, 8 mg L<sup>-1</sup>/MIC<sub>90</sub>, 16 L<sup>-1</sup>). Some prior studies demonstrate a similar profile of susceptibility between environmental and clinical strains (Escandon et al., 2006; Khan et al., 2007; Trilles et al., 2004). These authors concluded that antifungal susceptibility is not dependent on the origin of the isolates tested.

This study encompasses the first data of the killer profile of Brazilian *C. gattii* isolates according to their molecular subtypes. We showed that time–kill curve methods could distinguish distinct patterns of susceptibility to AmB, even among strains showing equal MIC. Although we found VGII genotype strains showing the highest fungicidal end point, further studies with larger number of isolates could confirm a lesser susceptibility to AmB of this genotype. We consider time–kill curve methods as a complementary tool for detecting the fungicidal activity of AmB. Moreover, we found all genotype VGI isolates with low MIC (fluconazole-MIC, ≤8 mg L<sup>-1</sup>), while VGII strains showed decreased susceptibility to the drug. A better understanding of the correlation between MICs, time–kill curve results, and clinical outcome is warranted since infections caused by *C. gattii* are an emergent public health concern.

## Acknowledgments

The authors would like to thank Dr. Claudete Rodrigues Paula from the Universidade de São Paulo for providing us with environmental samples. They also thank Andrés Avelino Baez for technical support and Sandra Regina Brasil S. Pukinskas for scientific assistance and comments.

## References

- Aller AI, Martin-Mazuelos E, Lozano F, Gomez-Mateos J, Steele-Moore L, Holloway WJ, Gutiérrez MJ, Recio FJ, Espinel-Ingroff A (2000) Correlation of fluconazole MICs with clinical outcome in cryptococcal infection. *Antimicrob Agents Chemother* 44:1544–1548.
- Boekhout T, Theelen B, Diaz M, Fell JW, Hop WC, Abeln EC, Dromer F, Meyer W (2001) Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology* 147:891–907.
- Brandt ME, Hutwagner LC, Klug LA, Baughman WS, Rimland D, Graviss EA, Hamill RJ, Thomas C, Pappas PG, Reingold AL, Pinner RW (1996) Molecular subtype distribution of *Cryptococcus neoformans* in four areas of the United States. Cryptococcal Disease Active Surveillance Group. *J Clin Microbiol* 34:912–917.
- Burgess DS, Hastings RW (2000) A comparison of dynamic characteristics of fluconazole, itraconazole, and amphotericin B against *Cryptococcus neoformans* using time–kill methodology. *Diag Microbiol Infect Dis* 38:87–93.
- Bymes EJ, Karen H, Bartlett C, et al (2011) *Cryptococcus gattii*: an emerging fungal pathogen infecting humans and animals. *Microbes Infect*. In press.
- Campbell LT, Currie BJ, Krockenberge M, Malik R, Meyer W, Heitman J, Carter D (2005) Clonality and re-combination in genetically differentiated subgroups of *Cryptococcus gattii*. *Eukaryot Cell* 4:1403–1409.
- Cantón E, Pemán J, Gómeado M, Viudes A, Espinel-Ingroff A (2004) Patterns of amphotericin B killing kinetics against seven *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother* 48:2477–2482.
- Cantón E, Pemán J, Viudes A, Quindós G, Gómeado M, Espinel-Ingroff A (2003) Minimum fungicidal concentrations of amphotericin B for bloodstream *Candida* species. *Diagn Microbiol Infect Dis* 45:203–206.
- Casali AK, Goulart L, Rosa e Silva LK, Ribeiro AM, Amaral AA, Alves SH, Schrank A, Meyer W, Vainstein MH (2003) Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. *FEMS Yeast Res* 3:405–415.
- Chen S, Sorrell T, Nimmo G, Speed B, Currie B, Ellis D, Marriott D, Pfeiffer T, Parr D, Byth K (2000a) Epidemiology and host- and variety dependent characteristics of infection due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zealand. Australasian Cryptococcal Study Group. *Clin Infect Dis* 31:499–508.
- Chen YC, Chang SC, Shih CC, Hung CC, Luhbd KT, Pan YS, Hsieh WC (2000b) Clinical features and in vitro susceptibilities of two varieties of *Cryptococcus neoformans* in Taiwan. *Diagn Microbiol Infect Dis* 36:175–183.
- Cheng PY, Sham A, Kronstad JW (2009) *Cryptococcus gattii* isolates from the British Columbia cryptococcosis outbreak induce less protective inflammation in a murine model of infection than *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 77:4284–4294.
- Chong HS, Dagg R, Malik R, Chen S, Carter D (2010) In vitro susceptibility of the yeast pathogen *Cryptococcus* to fluconazole and other azoles varies with molecular genotype. *J Clin Microbiol* 48:4115–4120.
- Chowdhary A, Randhawa HS, Sundar G, Kathuria S, Prakash A, Khan Z, Sun S, Xu J (2011) In vitro antifungal susceptibility profiles and genotypes of 308 clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* var *grubii* and *Cryptococcus gattii* serotype B from north western India. *J Med Microbiol* 60:961–967.
- Dannanoui E, Abdul M, Arpin M, Michel-Nguyen A, Piens MA, Favel A, Lortholary O, Dromer F; French Cryptococcosis Study Group (2006)

## ANEXO 2

RESPEITO POR VOCÊ

**Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos - CEPIAL**  
Av. Dr. Arnaldo, 355 – Sala 83 - Cerqueira César - 01246-902  
Fone: 3068-2859

---

---

São Paulo, 29 de Outubro de 2009.

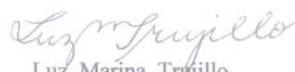
Protocolo: 28/2009

Projeto de Pesquisa: **Caracterização fenotípica e genotípica de isolados clínicos e ambientais de *Cryptococcus gattii* do estado de São Paulo.**

Pesquisador Responsável: Marcia de Souza Carvalho Melhem

Prezado Pesquisador

O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz – CEPIAL analisou e deliberou, em reunião de outubro de 2009, que para o referido projeto **NÃO SE APLICA** a apreciação de acordo com a Resolução 196/96 - CNS que aprova as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos.



Luz Marina Trujillo  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos  
Instituto Adolfo Lutz - CEPIAL