

Leticia Marielle Feliciano

Heterorresistência ao fluconazol em agentes de criptococose

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 do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientador: Profa. Dra. Marcia de Souza Carvalho Melhem

SÃO PAULO
2016

FICHA CATALOGRÁFICA

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

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Feliciano, Leticia Marielle.

Heterorresistência ao fluconazol em agentes de criptococose/
Leticia Marielle Feliciano. – 2016.

Dissertação (Mestrado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde
de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2016.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

Orientação: Profa. Dra. Marcia de Souza Carvalho Melhem.

1. *Cryptococcus gattii*. 2. *Cryptococcus neoformans*.
3. Heterorresistência. 4. Fluconazol. 5. Concentração Inibitória
Mínima. 6. Antifúngicos

SES/CCD/CD-325/2015

DEDICATÓRIA

À minha família.

Especialmente aos meus queridos pais e a minha querida avó, pelo incentivo, por estarem sempre ao meu lado e por sempre me motivarem.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por me dar a vida e por me permitir a realização de mais uma etapa.

À minha família, pela carinho, amor, paciência e compreensão pelos meus momentos de ausência. Agradeço aos meus queridos pais Edson e Melcia pela vida, amor e compreensão. Muito obrigada meus queridos irmãos Hector e Larissa pelos momentos de descontração, ajuda com a formatação deste trabalho, apoio e compreensão. Agradeço à minha querida avó Lourdes pelo apoio, torcida, amor, dedicação e compreensão durante esta etapa. Agradeço a minha tia Eliana pelo apoio e amor.

À minha querida orientadora Prof. Dra. Marcia de Souza Carvalho Melhem, pela orientação, pela imensa paciência, atenção, estadia na casa de sua sogra, carinho, conhecimentos e conselhos transmitidos durante a realização desse trabalho e pela grande disposição em ensinar. Muito obrigada por todo aprendizado e pela confiança. Tê-la como orientadora foi um imenso privilégio.

À Biologista Silézia Doralice Pessoa Ramos do Centro Regional de Laboratório de Rio Claro Instituto Adolfo Lutz. Muito obrigada pela imensa colaboração e disposição em me ajudar, para que esse trabalho fosse concluído com sucesso.

À Diretora geral do Instituto Adolfo Lutz – Centro Regional de Laboratório de Rio Claro Vânia Lúcia Pessoa Fiorio pelo apoio e compreensão.

Aos Diretores de Núcleos do Centro Regional de Laboratório de Rio Claro do Instituto Adolfo Lutz, Kaizer José Ferreira Alves, Regina Cely Tavares, Israel Tadeu de Jesus Zanella, pelo apoio e compreensão.

Às pesquisadoras do Núcleo de Micologia do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, Dulcilena M. Castro e Silva, Maria Walderez Szeszs, Marilena dos Anjos Martins. Muito obrigada pela ajuda com a parte laboratorial.

À Biologista Gislene Aparecida Palmeira e a auxiliar de laboratório Sylvana Kwong Arregui Bay, ambas do setor de Microbiologia Clínica do Centro Regional de Laboratório de Rio Claro do Instituto Adolfo Lutz, pelo convívio, amizade e disposição em me ajudar.

À amiga e colega de pós-graduação Hélid Raquel Lautenschlaeger Rodrigues De Lucca do Centro Regional de Laboratório de Rio Claro do Instituto Adolfo Lutz, pelo apoio, disposição em me ajudar e amizade.

À bolsista Fédial Jennifer Fernanda Jacobucy do Centro Regional de Laboratório de Rio Claro do Instituto Adolfo Lutz, pela disposição em me ajudar.

Às Bolsistas do Programa de Aprimoramento do Centro Regional de Laboratório de Rio Claro do Instituto Adolfo Lutz, Larissa Helena Fadul e Débora Freitas, pela ajuda na parte laboratorial desse trabalho.

Ao funcionário Allan Antonio Kubo, do Centro Regional de Laboratório de Rio Claro do Instituto Adolfo Lutz, pela colaboração na parte de informática desse trabalho.

Ao funcionário Rogério Antonio de Oliveira, do Centro Regional de Laboratório de Rio Claro do Instituto Adolfo Lutz, pela colaboração na parte de estatística desse trabalho.

A todos os funcionários do Centro Regional de Laboratório de Rio Claro do Instituto Adolfo Lutz, em especial, à: Catia Regina Costa, Creuza Aparecida Leite, Elenir Cristina dos Santos Garcia, Eliana Traina, Florindo Edvaldo Carniato, Gisele Monteiro, Guaciara M. Barthman, Hélio Aparecido Daniel, Noeli Aparecida da Costa, Olga Maria Diniz, Rita Maria da Silva e Silvia Regina Baraldi pelo convívio, amizade e que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho fosse concluído.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento do Estado de São Paulo (FAPESP), processo número 2013/04567-5, pelo apoio financeiro e concessão de bolsa.

Resumo

Cepas de *Cryptococcus gattii* e *C. neoformans* têm potencial para desenvolver resistência *in vitro* ao fluconazol (FCL), o que poderia explicar as constantes falhas terapêuticas e recidivas observadas em pacientes com criptococose e sob terapia com este fármaco. Heterorresistência é um fenômeno descrito como a emergência de uma subpopulação pequena de células resistentes, dentro de uma única colônia de uma cepa suscetível, que pode tolerar concentrações de FCL mais elevadas do que os níveis de CIM. O objetivo deste estudo foi investigar o nível de heterorresistência a FCL em 100 cepas, incluindo *C. gattii* e *C. neoformans* de origem ambiental e clínica (uma por paciente), provenientes de 3 coleções de culturas (1987-2013). O CIM de FCL foi determinado por microdiluição e, em seguida, o seu nível de heterorresistência ao FCL (NHF) foi avaliado. As suspensões celulares de todas as cepas foram inoculadas em placas de meio YPD contendo distintas concentrações de FCL (4 a 128 mg/L). O nível de heterorresistência (NHF) de cada isolado foi determinado pela maior concentração do fármaco que permitiu crescimento de subpopulações heterorresistentes; a partir destas, foram obtidas subpopulações altamente heterorresistentes em concentrações maiores do fármaco (até 256 mg/L). A estabilidade da heterorresistência foi analisada por transferência diária das subpopulações em meio de cultura isento de fármaco até a reversão para o NHF original. A cepa-padrão H99, com valores de CIM e NHF conhecidos, foi utilizada como controle do teste de heterorresistência. Os CIMs de FCL variaram entre 0,12 a 64 mg/L e foi demonstrado que todas as 100 cepas manifestaram heterorresistência (NHF entre 8 e 128 mg/L) com indução de até 256 mg/L. De 13 cepas avaliadas para estabilidade da heterorresistência, todas permaneceram estáveis até 9 passagens diárias em meio isento de FCL. Observou-se que o nível de heterorresistência a FCL foi cepa-dependente e em *C. gattii* maior do que em *C. neoformans*. Constatou-se que essa resposta adaptativa é estável com difícil reversão. O estudo sobre heterorresistência revela um mecanismo adaptativo para sobrevivência sob estresse de exposição ao FCL e pode oferecer

informações úteis para compreensão da resistência observada em pacientes sob terapia azólica de longo prazo.

Abstract

Strains of *Cryptococcus gattii* and *C. neoformans* have the potential to develop fluconazole (FCL) resistance *in vitro*, which could explain the therapeutic failure and relapses observed in Cryptococcosis patients undergoing therapy with this drug. Heteroresistance is a phenomenon described as the emergence of a resistant subpopulation of small cells within a single colony of a susceptible strain that can tolerate concentrations of FCL higher than CIMs. The objective of this study was to investigate the level of heteroresistance to FCL in 100 strains, including *C. gattii* and *C. neoformans* from environmental and clinical origin (one per patient) from 3 culture collections (1987-2013). The CIM was determined by microdilution FCL and the level of the FCL heteroresistance (NHF) was evaluated. Cell suspensions of all strains were inoculated in YPD medium plates containing distinct concentrations of FCL (4 to 128 mg/L). The level of heteroresistance (NHF) of each isolate was determined by the highest concentration of drug allowing growth of heteroresistant subpopulations; from these colonies the highly heteroresistant subpopulations were obtained at sequential higher drug concentrations (up to 256 mg/L). The stability of heteroresistance was analyzed by daily transfer of subpopulations onto culture medium-free drug to revert to the original NHF. The standard strain H99 with known CIM and NHF values was used as control in the heteroresistance test. The FCL-CIMs for the 100 strains varied between 0.12 and 64 mg/L and all 100 strains expressed heteroresistance (NHF between 8 and 128 mg/L) induced up to 256 mg/L. All 13 strains evaluated for stability heteroresistance remained stable up to 9 daily passes at free FCL culture medium. It was observed that the level of FCL heteroresistance was strain dependent and for *C. gattii* was higher than for *C. neoformans*. It was found that this adaptive response is stable with hard reversion. The heteroresistance study reveals an adaptive mechanism for survival under stress exposure to FCL and can provide useful information for understanding the resistance observed in patients ongoing long-term azole therapy.

Lista de Abreviaturas e Siglas

AFST- EUCAST – *Antifungal susceptibility testing - Europe Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing -*

ATCC – *American Type Culture Collection*

cel/mL – células por mililitro

CFP – Coleção de Fungos Patogênicos

CGB - *L-Canavanine Glycine Bromothymol Blue*

CIM – concentração inibitória mínima

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

FCL - Fluconazol

IAL – Instituto Adolfo Lutz

ICB – Instituto de Biociências

INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia

IPEC/FIOCRUZ – Instituto de Pesquisas Clínicas Evandro Chagas da Fundação Oswaldo Cruz

LBA Lavado brônquico alveolar

LCR Líquor

mg/L – miligramas por litro

MLST Multilocus gene sequence typing

NCCLS National Committee for Clinical Laboratory Standards

NHF – Nível de heterorresistência ao fluconazol

NIH - *National Institutes of Health*

nm – nanômetro

PCR – *Polymerase chain reaction*, reação em cadeia da polimerase

RFLP – Restriction fragment length polymorphisms

RPMI - *Roswell Park Memorial Institute* (meio quimicamente definido composto por aminoácidos e vitaminas)

® Marca registrada

NHF - Nível de Heterorresistência ao Fluconazol –
ufc/mL– unidades formadoras de colônias por mililitro

µL - microlitro

UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

UFTM – Universidade Federal do Triângulo Mineiro

USP – Universidade de São Paulo

YPD- *yeast peptone dextrose*

Lista de Tabelas

Tabela 1. Cepas de origem clínica e ambiental de <i>C. gattii</i> e <i>C. neoformans</i> usadas nesse estudo.....	22
Tabela 2. Origem e instituição cedente de 100 cepas de <i>C. gattii</i> e <i>C. neoformans</i>	28
Tabela 3. Cepas-padrão utilizadas no estudo de heterorresistência ao fluconazol.....	29
Tabela 4. Parâmetros para avaliação da concentração inibitória mínima (CIM em mg/L) de fluconazol frente a 100 cepa de <i>Cryptococcus</i> spp. segundo grupo de cepas.....	44
Tabela 5. Valores de concentração inibitória mínima de fluconazol para cepa-padrão H99 e cepas de referência, segundo método Etest®.....	45
Tabela 6. Valores de NHF para 100 cepas de <i>C. gattii</i> e <i>C. neoformans</i>	46
Tabela 7. Valores de concentração inibitória mínima (CIM em mg/L) de fluconazol, determinados pelo método de microdiluição, tipo molecular, nível de heterorresistência, adaptação e estabilidade de 100 cepas de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i>	51

Lista de Figuras

- Figura 1. Exemplo de placa de microtitulação usada para determinação do CIM contendo concentrações de fluconazol (mg/L), na qual C+ indica a coluna usada para controle-positivo (controle de crescimento) e C- representa a do controle negativo (controle de esterilidade).....32
- Figura 2. Exemplo de esquema de trabalho para determinação do nível de heterorresistência de fluconazol (NHF) em 4 cepas de *Cryptococcus* spp...35
- Figura 3. Ilustração do *spot test* para determinação do nível de heterorresistência em cepa de *C. gattii*..... 35
- Figura 4. Exemplo de nível de heterorresistência ao fluconazol (NHF) em 16 mg/L (seta em vermelho), usando-se *spot test*, onde: YPD, *yeast peptone dextrose*; FCL, fluconazol; 10^6 , 10^5 , 10^4 e 10^3 cel/mL, concentrações celulares. Na concentração de 32 mg/L não há crescimento em nenhuma diluição.....36
- Figura 5. Ilustração de estudo-piloto realizado para determinar melhor volume de suspensão celular a ser utilizado no testes de adaptação.....38
- Figura 6. Diagrama de avaliação de estabilidade, onde cepa (A) com NHF de 32 mg/L foi adaptada até 64 mg/L e, no teste de estabilidade retornou ao NHF após 5 dias. FCL, fluconazol; YPD, meio *yeast peptone dextrose*.....40
- Figura 7. Exemplos de ensaios por E-test[®] para determinação de CIM de FCL frente a 2 cepas clínicas de *C. gattii*, onde T, fenômeno *trailing*.....42

Figura 8 Distribuição das cepas de *C. gattii* em relação ao NHF.....48

Figura 9 Distribuição das cepas de *C. neoformans* em relação ao NHF.....48

Figura 10. Exemplo de ensaio de adaptação a 2 níveis acima do NHF (nível de heterorresistência a fluconazol), onde: colônias de cepa com NHF de 64mg/L (esquerda); populações altamente resistentes a 128 mg/L (centro) e populações altamente resistentes a 256 mg/L.....50

ÍNDICE

1.INTRODUÇÃO.....	14
2.OBJETIVOS.....	20
2.1 Geral.....	20
2.2 Específicos.....	20
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1 Cepas de <i>C. gattii</i> e <i>C. neoformans</i>	21
3.1.1 Identificação das cepas de <i>C. gattii</i> e <i>C. neoformans</i>	22
3.1.2 Cepas-padrão de <i>C. gattii</i> e <i>C. neoformans</i>	28
3.2 Determinação da suscetibilidade ao fluconazol.....	29
3.2.1 Determinação de suscetibilidade por Etest®.....	29
3.2.2 Determinação de suscetibilidade por microdiluição.....	30
3.3 Procedimentos para Testes de Heterorresistência ao fluconazol.....	33
3.3.1 Validação da técnica de heterorresistência ao fluconazol.....	33
3.3.2 Preparação das placas de ágar YPD com e sem fluconazol.....	33
3.3.3 Avaliação do nível de heterorresistência ao fluconazol.....	34
3.3.4 Análise da frequência de ocorrência de heterorresistência ao fluconazol	37
3.3.5 Teste de adaptação a níveis de fluconazol acima do NHF.....	37
3.4 Análise da estabilidade da heterorresistência ao fluconazol.....	38
3.5 Análise estatística.....	39
4. RESULTADOS.....	41
4.1 Valores de concentração inibitória mínima de fluconazol por Etest®.	41
4.2 Valores de concentração inibitória mínima de fluconazol obtidas por microdiluição.....	43
4.3 Nível de heterorresistência ao fluconazol (NHF).....	45
4.3.1 Frequência da heterorresistência ao fluconazol.....	47
4.4 Capacidade de Adaptação.....	49
4.5 Estabilidade da heterorresistência ao fluconazol.....	50

5. DISCUSSÃO.....	55
6. CONCLUSÕES.....	65
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
ANEXOS.....	76

1. INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas em humanos acometem grande parte da população mundial e, cada vez mais, vem aumentando sua frequência, principalmente, em pacientes com sistema imunitário deficiente, situação agravada nos portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS - *Acquired Immune Deficiency Syndrome*) (Baltazar e Ribeiro et al., 2008; Segal et al. 2008). Dessa forma, é notável a importância das micoses para a saúde pública e, dentre as principais micoses emergentes, destaca-se a criptococose (Sidrim e Rocha et al., 2004).

A criptococose é uma micose sistêmica causada por fungos do gênero *Cryptococcus*, sendo considerado não patogênicos mais de 100 espécies (Ferreira-Paim et al., 2014), com exceção das duas principais espécies causadoras de infecções em humanos: *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* (Kwon-Chung e Varma et al., 2006; Moretti et al., 2008). Entretanto, espécies anteriormente consideradas saprófitas, como *Cryptococcus laurentii*, *C. albidus*, *C. humicola* e *C. curvatus* nas últimas décadas estão acometendo pacientes imunodeprimidos (Kordossis et al., 1998; Khawcharoenporn, et al., 2007).

A doença fúngica, então conhecida como torulose, blastomicose européia e doença de Busse-Buschke, teve o seu agente, pela primeira vez, descrito em 1894 por Busse e Buschke, em um caso de lesão na tíbia e quase simultaneamente por Sanfelice pelo isolamento do agente a partir de suco de pêssigo (Mitchell e Perfect, 1995; Moretti et al., 2008; Sidrim e Rocha et al., 2004).

Cryptococcus spp. são uma levedurass encapsulada, com reprodução assexuada e sexuada pertencente à divisão *Eumycota*, filo *Basidiomycota*, ordem *Filobasidiales*, família *Tremellales* e gênero *Cryptococcus* (Fell et al., 2000; Brito, 2006; Sidrim e Rocha et al., 2004; Takahara, 2011). De acordo com análise filogenética e molecular, *C. gattii*, antes considerado *C. neoformans* var. *gattii*, passou a ser uma espécie distinta de *C. neoformans*,

por sua vez, considerado *C. neoformans* var. *neoformans* (Kwon-Chung e Varma et al., 2006;).

O complexo *Cryptococcus* compreende as 2 principais espécies com sorotipos A, D, AD, B e C e é hoje dividido de acordo com genótipos, determinados segundo a reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*, PCR) e *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), em: genótipos VNI, VNII, VNIII e VNIV (*C. neoformans*) e genótipos VGI, VGII, VGIII e VGIV (*C. gattii*) (Meyer et al., 2003; Brito, 2006; Byrnes et al., 2009; Matos et al., 2012; Hagen et al., 2010; Springer e Chaturvedi, 2010; Gillece et al., 2011; Harris et al., 2011b).

Para ambas as espécies a infecção ocorre por entrada desses agentes no organismo animal, em regra, após inalação de propágulos viáveis dispersos no meio ambiente, tendo como primeiro alvo os pulmões, seguido de disseminação para o sistema nervoso central e outros órgãos (Costa et al., 2009; Kidd et al., 2007). Os principais fatores de virulência, que contribuem com o sucesso no processo de infecção, são: capacidade de crescimento a 37°C, mecanismo de combate à oxidação e produção da cápsula (Lester et al., 2011). O crescimento *in vitro* a 37°C é importante, visto que, essa é a temperatura média interna do hospedeiro; com relação ao combate à oxidação, a produção de melanina serve como proteção do patógeno contra danos de oxidação, garantindo a sobrevivência do fungo; por fim, a produção de cápsula de polissacarídeos dificulta a fagocitose por macrófagos e neutrófilos do hospedeiro (Brito, 2006; Matsumoto, 2006).

C. neoformans está, geralmente, associado a pacientes imunocomprometidos, especialmente, aqueles HIV positivos. Além disso, *C. neoformans* é encontrado no solo e fezes de pássaros (em especial as de pombos) e tem distribuição global, enquanto, *C. gattii* é comumente encontrado em regiões tropicais e subtropicais estando associado a várias espécies de árvores (Chen et al., 2000; Filiu et al., 2002; Srikanta et al., 2014). *C. gattii* teve seu *habitat* relatado, pela primeira vez, por Ellis e Pfeiffer (1990) em árvores de *Eucalyptus camaldulensis* na Austrália; assim sendo, o nicho ecológico do patógeno foi, por muito tempo, associado às

árvores de eucalipto e ambientes de clima tropical e subtropical (Baltazar e Ribeiro et al., 2008; Chakrabarti et al., 1997; Dixit et al., 2009; Ellis e Pfeiffer et al., 1990). Entretanto, essa espécie já foi isolada de outras espécies de árvores, como: *Prunus dulcis*, *Ficus soatensis*, *Cupressus lusitanica*, *Pinus radiata*, *Cassia fistula*, *Acacia decurrens*, *Pseudotsuga menziessii* e *Guettarda acreana* etc (Dixit et al., 2009; Goulart, 2009, Kidd et al., 2007; Springer e Chaturvedi et al., 2010). Um surto de criptococose por *C. gattii*, em humanos e animais, que ocorreu na Ilha de Vancouver (Canadá) e noroeste dos Estados Unidos, no início do ano 2000, indicou a existência desse agente em regiões de clima temperado (Byrnes et al., 2009; Dixit et al., 2009; Datta et al., 2009; Kidd et al., 2004; Harris et al., 2011a; Marr, 2011).

No Brasil há relatos de casos de *C. gattii* no nordeste e norte, onde essa espécie é endêmica e responsável por 71% dos episódios de criptococose, conforme revisão de Pappalardo e Melhem (2003). Em contrapartida, nas regiões sul e sudeste, apenas casos esporádicos de infecções por *C. gattii* são relatados (Martins et al., 2011). Sobre a incidência nacional, não há números oficiais e alguns estudos mostram dados regionais (Nucci et al., 2010).

O diagnóstico laboratorial é baseado, inicialmente, na observação da levedura em exame direto da amostra biológica, tratada com tinta da China (tinta nanquim) e posterior isolamento em ágar Sabouraud sem cicloheximida. Diversas provas são necessárias, para triagem do gênero e espécie, como: 1. cultivo em ágar niger, em que as colônias tornam-se marrons devido presença da enzima fenoloxidase; 2. prova de crescimento a 37°C; 3. teste de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio; 4. cultivo em ágar uréia, no qual ocorre a modificação na coloração do meio devido à hidrólise da uréia; 5. cultivo em meio contendo canavanina, glicina e azul de bromotimol (*L-Canavanine Glycine Bromothymol Blue* - CGB), para diferenciar *C. neoformans* e *C. gattii*, no qual *C. gattii* cresce e modifica o pH alterando a cor do meio para azul (Williamson, 1997; Brito, 2006; Klein et al.,

2009; Sidrim e Rocha, 2004; Moretti et al., 2008; Hagen et al., 2010; Harris et al., 2011b).

Outros testes para diagnóstico clínico são: 1. imunodiagnóstico, como o teste de aglutinação em látex, que permite a detecção do antígeno presente em amostras de pacientes; 2. método molecular, como a PCR, através da amplificação de uma região específica do DNA do fungo presente na amostra clínica (Paschoal et al., 2004; Saha et al., 2008; Saha et al., 2009).

O tratamento da criptococose depende do estado geral e imunológico do paciente; em casos de Aids constitui-se, basicamente, por meio de três etapas: indução, consolidação e manutenção. Na fase de indução, utiliza-se, como antifúngico, a anfotericina B por até 4 semanas; depois, segue-se a fase de consolidação, por período de até 8 semanas, no qual se utiliza o fluconazol (FCL); por fim, após as terapias de indução e consolidação, é iniciada a terapia de manutenção com FCL, durante período de 6 a 12 meses ou, ainda, por prazo indeterminado.

Sabe-se que terapias de longo prazo, podem favorecer a resistência de micro-organismos ao fármaco respectivo, ainda que neste caso, pouco tem sido descrito na literatura sobre resistência de cepas de *Cryptococcus* ao FCL (Perfect et al., 2010; Moretti et al., 2008). Alguns relatos indicam que isolados clínicos de *Cryptococcus* possuem potencial em desenvolver resistência *in vitro* ao fluconazol, o que poderia explicar as constantes falhas terapêuticas e recidivas nos pacientes acometidos por essa doença e sob tratamento (Sar et al., 2004; Sanguinetti et al., 2006).

Para a determinação de resistência a antifúngicos, existem métodos de referência. A metodologia empregada para isolados de *Cryptococcus* tem como base a microdiluição e está descrita no documento M27-A3 do *Clinical and Laboratory Standards Institutes* – CLSI (CLSI, 2008). O comitê *European Committee Antimicrobial Susceptibility Testing- EUCAST* (AFST-EUCAST, 2015) - da Sociedade Europeia de Microbiologia propôs modificações no método do CLSI e também publicou um método reconhecido como referência. Outros métodos comerciais, tais como ATB

Fungus®, disco-difusão e fita de difusão, método que emprega fitas impregnadas com antifúngicos podem ser, também, utilizados (Petrou e Shanson, 2000; Dias et al., 2006).

Tais métodos de referência e comerciais são indicados para avaliar a concentração inibitória mínima (CIM) de uma cepa frente ao fármaco antifúngico. A suscetibilidade da cepa é descrita por esse parâmetro em mg/L ou unidade correspondente.

Para cepas de *Candida albicans* e *Cryptococcus* spp. foi demonstrado que parte das células tem capacidade de crescer em concentrações maiores e acima do valor de CIM. A frequência de células, avaliadas em termos de unidades formadoras de colônias-ufc, que apresentam esse fenômeno varia conforme a cepa. A esse comportamento, verificado na totalidade ou maioria das cepas analisadas, dá-se o nome de heterorresistência (Xu et al., 2001; Sionov et al., 2010). O nível de heterorresistência ao fluconazol (NHF) é a concentração máxima que suporta essa subpopulação de células. Algumas cepas de *C. neoformans*, com alto NHF, conseguem crescer em concentrações de FCL cinco vezes maiores do que aquelas do CIM (Sionov et al., 2009). Ainda mais interessante é o fato dessa subpopulação gerar outra, ainda mais heterorresistente, por passagens gradativas em meio de cultura contendo concentrações crescentes de FCL. A esse procedimento, dá-se o nome de “teste de adaptação” a níveis de FCL acima do NHF. A segunda geração de células que se adaptam a altos níveis de FCL é denominada “subpopulação altamente heterorresistente” (Sionov et al., 2009). A heterorresistência é um processo reversível na quase totalidade das cepas, porém, muitas delas necessitam de várias passagens em meio isento de FCL para retornar ao perfil de suscetibilidade original. A importância na clínica médica da formação de subpopulação altamente heterorresistente está por ser estabelecida (Sionov et al., 2009; Varma e Kwon-Chung, 2010).

Para isolados de *C. gattii* e *C. neoformans*, a heterorresistência a FCL foi avaliada por poucos pesquisadores norte-americanos e não existem

estudos com cepas oriundas do Brasil (Sionov et al., 2009; Varma e Kwon-Chung, 2010).

2.OBJETIVOS

2.1 Geral

Estudar o fenômeno de heterorresistência ao fluconazol em cepas clínicas e ambientais de *C. gattii* e *C. neoformans* isoladas no Brasil.

2.2 Específicos

- Determinar os valores de concentração inibitória mínima de fluconazol frente a cepas clínicas e ambientais, de *C. gattii* e *C. neoformans*;
- Validar a técnica de avaliação de heterorresistência ao fluconazol para os principais agentes da criptococose, com vistas à implantação do teste em laboratório de referência de microbiologia;
- Investigar, qualitativa e quantitativamente, a ocorrência do fenômeno de heterorresistência ao fluconazol nos agentes de criptococose;
- Analisar a estabilidade da heterorresistência ao fluconazol em subpopulações altamente heterorresistentes.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cepas de *C. gattii* e *C. neoformans*

Na presente pesquisa foram utilizadas 100 cepas brasileiras do gênero *Cryptococcus*, sendo 50 cepas de *C. gattii* e 50 cepas de *C. neoformans*, em que metade de cada grupo foi composta de cepas ambientais e metade de cepas clínicas.

Todas as cepas utilizadas neste estudo foram escolhidas de forma aleatória, pela instituição cedente, a saber: 53 cepas (25 cepas de *C. gattii* clínicas, 01 cepa de *C. gattii* ambiental, 25 cepas de *C. neoformans* clínicas e 02 cepas de *C. neoformans* ambientais) foram escolhidas do acervo da micoteca do Núcleo de Micologia do Instituto Adolfo Lutz (IAL) de São Paulo. As 47 cepas restantes foram gentilmente cedidas ao acervo da micoteca do Núcleo de Micologia do Instituto Adolfo Lutz (IAL) de São Paulo e autorizadas o uso para esse trabalho por: Dr. Mário Léon Silva Vergara da Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM (23 cepas de *C. neoformans* ambientais); Dra. Luciana Trilles do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas da Fundação Oswaldo Cruz – IPEC/FIOCRUZ do Rio de Janeiro (20 cepas de *C. gattii* ambientais); Dra. Claudete Rodrigues Paula do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo – ICB/USP (4 cepas de *C. gattii* ambientais).

A caracterização e origem das 100 cepas constam das Tabelas 1 e 2. Todas as cepas utilizadas neste trabalho estavam armazenadas, sob -20°C em glicerol 20%, no acervo da micoteca do Núcleo de Micologia do Instituto Adolfo Lutz (IAL) de São Paulo. Para fins deste estudo, uma cópia de cada cepa foi repassada para o Instituto Adolfo Lutz- Centro de Laboratório Regional de Rio Claro, no qual todas as etapas desse trabalho foram desenvolvidas. As cepas foram semeadas em ágar cromogênico (Chromagar Candida®) para confirmação de pureza. Confirmada a pureza, as cepas foram armazenadas em glicerol 20% a -20°C até a sua utilização no IAL de Rio Claro e foram mantidas em ágar *Yeast Peptone Dextrose*

(YPD), 1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% dextrose, a 25°C durante todo o estudo.

3.1.1 Identificação das cepas de *C. gattii* e *C. neoformans*

Todas as 100 cepas foram identificadas, previamente, a nível de tipo molecular pela equipe do Núcleo de Micologia do Instituto Adolfo Lutz (IAL). As análises moleculares foram feitas pela técnica de PCR e PCR-RFLP pelos pesquisadores Marilena dos Anjos Martins e Lucas Xavier Bonfietti e, também, pela doutoranda Dayane Cristina da Silva (Silva et al., 2012). Os resultados das identificações e tipos moleculares constam no banco de dados do acervo da micoteca do Núcleo de Micologia do IAL de São Paulo e foram, gentilmente, cedidos para esse trabalho.

Tabela 1. Cepas de origem clínica e ambiental de *C. gattii* e *C. neoformans* usadas nesse estudo

Cepas	Instituição cedente	Fonte de isolamento	Ano de isolamento	Tipo Molecular	Estado
<i>C. gattii</i> clínicos (n = 25)					
186/94	IAL	LCR	1994	VG II	SP
197/94	IAL	LCR	1994	VG II	SP
45/97	IAL	LCR	1997	VG II	SP
47/97	IAL	LCR	1997	VG II	SP
51/98	IAL	LCR	1998	VG II	SP
114/98	IAL	LCR	1998	VG II	SP
01/99	IAL	LCR	1999	VG II	SP
21/99	IAL	LCR	1999	VG II	SP
64/99	IAL	LCR	1999	VG II	SP
67/99	IAL	LCR	1999	VG II	SP
96/99	IAL	LCR	1999	VG II	SP
58/00	IAL	LCR	2000	VG II	SP
43/00	IAL	LCR	2000	VG II	SP
02/00	IAL	LCR	2000	VG II	SP
125/01	IAL	LCR	2001	VG II	SP
136/01	IAL	LCR	2001	VG II	SP

Continuação Tabela 1.

Cepas	Instituição cedente	Fonte de isolamento	Ano de isolamento	Tipo Molecular	Estado
<i>C. gattii</i> clínicos (n = 25)					
174/01	IAL	LCR	2001	VG II	SP
188/01	IAL	LCR	2001	VG II	SP
28/02	IAL	LCR	2002	VG II	SP
87/03	IAL	LCR	2003	VG II	SP
131/03	IAL	LCR	2003	VG II	SP
194/04	IAL	LCR	2004	VG II	SP
582/04	IAL	LBA	2004	VG II	SP
600/04	IAL	LCR	2004	VG II	SP
34/05	IAL	LCR	2005	VG II	SP
<i>C. gattii</i> ambientais (n = 25)					
CFP 70	IPEC/ FIOCRUZ	Madeira em decomposição	2008	VG I	RJ
CFP 198	IPEC/ FIOCRUZ	Fezes de morcego	1987	VG I	RJ
CFP 365	IPEC/ FIOCRUZ	Madeira em decomposição	2013	VG I	RJ
CFP 367	IPEC/ FIOCRUZ	Madeira em decomposição	2013	VG I	RJ
CFP 368	IPEC/ FIOCRUZ	Madeira em decomposição	2013	VG I	RJ
CFP 422	IPEC/ FIOCRUZ	Restos vegetais	1996	VG II	PI
CFP 433	IPEC/ FIOCRUZ	Restos vegetais	1993	VG II	PI
CFP 443	IPEC/ FIOCRUZ	Madeira em decomposição	1995	VG II	PI
CFP 502	IPEC/ FIOCRUZ	Madeira em decomposição	1995	VG II	PI
CFP 503	IPEC/ FIOCRUZ	Madeira em decomposição	1993	VG II	PI
CFP 504	IPEC/ FIOCRUZ	Madeira em decomposição	1995	VG II	PI

Continuação Tabela 1.

Cepas	Instituição cedente	Fonte de isolamento	Ano de isolamento	Tipo Molecular	Estado
<i>C. gattii</i> ambientais (n = 25)					
CFP 505	IPEC/ FIOCRUZ	Madeira em decomposição	1995	VG II	PI
CFP 506	IPEC/ FIOCRUZ	Madeira em decomposição	1997	VG II	PI
CFP 507	IPEC/ FIOCRUZ	Madeira em decomposição	1997	VG II	PI
CFP 508	IPEC/ FIOCRUZ	Madeira em decomposição	1997	VG II	PI
CFP 509	IPEC/ FIOCRUZ	Madeira em decomposição	1997	VG II	PI
CFP 510	IPEC/ FIOCRUZ	Madeira em decomposição	1997	VG II	PI
CFP 511	IPEC/ FIOCRUZ	Madeira em decomposição	1997	VG II	PI
CFP 512	IPEC/ FIOCRUZ	Madeira em decomposição	1997	VG II	PI
CFP 513	IPEC/ FIOCRUZ	Madeira em decomposição	1997	VG II	PI
82-ICB	ICB-USP	Solo com fezes	1996	VG I	SP
182-ICB	ICB-USP	Solo com fezes	1996	VG II	SP
183-ICB	ICB-USP	Solo com fezes	1996	VG II	SP
184-ICB	ICB-USP	Solo com fezes	1996	VG II	SP
2G	IAL	Fezes de pombo	2011	VG I	SP
<i>C. neoformans</i> clínicos (n = 25)					
5639	IAL	LCR	2013	VN II	SP
11503	IAL	LCR	2013	VN I	SP
11861	IAL	LCR	2013	VN I	SP
12670	IAL	LCR	2013	VN I	SP
19353	IAL	LCR	2013	VN I	SP
21920	IAL	LCR	2013	VN I	SP
21921	IAL	LCR	2013	VN I	SP
23914	IAL	LCR	2013	VN I	SP

Continuação Tabela 1.

Cepas	Instituição cedente	Fonte de isolamento	Ano de isolamento	Tipo Molecular	Estado
<i>C. neoformans</i> clínicos (n = 25)					
32225	IAL	LCR	2013	VN II	SP
48354	IAL	LCR	2013	VN II	SP
51710	IAL	LCR	2013	VN I	SP
54676	IAL	LCR	2013	VN I	SP
55149	IAL	LCR	2013	VN I	SP
57697	IAL	LCR	2013	VN I	SP
59152	IAL	LCR	2013	VN I	SP
63643	IAL	LCR	2013	VN I	SP
71321	IAL	LCR	2013	VN I	SP
74112	IAL	LCR	2012	VN II	SP
76985	IAL	LCR	2013	VN I	SP
77155	IAL	LCR	2012	VN I	SP
77189	IAL	LCR	2013	VN I	SP
87956	IAL	LCR	2013	VN I	SP
89043	IAL	LCR	2013	VN I	SP
90939	IAL	LCR	2013	VN II	SP
91631	IAL	LCR	2013	VN I	SP
<i>C. neoformans</i> ambientais (n = 25)					
V272C	IAL	Oco de árvore (Jatobá)	2010-2011	VN I	SP
I271E	IAL	Oco de árvore (Jatobá)	2010-2011	VN I	SP
87291	UFTM	Excretas de aves de ambientes peri-hospitalar	2007-2008	VN II	MG
87296	UFTM	Excretas de aves de ambientes peri-hospitalar	2007-2008	VN I	MG
87297	UFTM	Excretas de aves de ambientes peri-hospitalar	2007-2008	VN I	MG
87298	UFTM	Excretas de aves de ambientes peri-hospitalar	2007-2008	VN I	MG
87299	UFTM	Excretas de aves de ambientes peri-hospitalar	2007-2008	VN I	MG

Continuação Tabela 1.

Cepas	Instituição cedente	Fonte de isolamento	Ano de isolamento	Tipo Molecular	Estado
<i>C. neoformans</i> ambientais (n = 25)					
87301	UFTM	Excretas de aves de ambientes peri-hospitalar	2007-2008	VN I	MG
87303	UFTM	Excretas de aves de ambientes peri-hospitalar	2007-2008	VN I	MG
87305	UFTM	Excretas de aves de ambientes peri-hospitalar	2007-2008	VN I	MG
87306	UFTM	Excretas de aves de ambientes peri-hospitalar	2007-2008	VN I	MG
87308	UFTM	Excretas de aves de ambientes peri-hospitalar	2007-2008	VN II	MG
87309	UFTM	Excretas de aves de ambientes peri-hospitalar	2007-2008	VN I	MG
87312	UFTM	Excretas de aves de ambientes peri-hospitalar	2007-2008	VN I	MG
87313	UFTM	Excretas de aves de ambientes peri-hospitalar	2007-2008	VN I	MG
87314	UFTM	Excretas de aves de ambientes peri-hospitalar	2007-2008	VN II	MG
87316	UFTM	Excretas de aves de ambientes peri-hospitalar	2007-2008	VN I	MG
87318	UFTM	Excretas de aves de ambientes peri-hospitalar	2007-2008	VN I	MG

Continuação Tabela 1.

Cepas	Instituição cedente	Fonte de isolamento	Ano de isolamento	Tipo Molecular	Estado
<i>C. neoformans</i> ambientais (n = 25)					
87320	UFTM	Excretas de aves de ambientes peri-hospitalar	2007-2008	VN II	MG
87322	UFTM	Excretas de aves de ambientes peri-hospitalar	2007-2008	VN I	MG
87323	UFTM	Excretas de aves de ambientes peri-hospitalar	2007-2008	VN I	MG
87324	UFTM	Excretas de aves de ambientes peri-hospitalar	2007-2008	VN I	MG
87325	UFTM	Excretas de aves cativas (Pet Shop) de Uberaba	2007-2008	VN II	MG
87327	UFTM	Excretas de aves cativas (Pet Shop) de Uberaba	2007-2008	VN I	MG
87329	UFTM	Detritos de árvore	2009	VN I	MG

Tabela 2. Origem e instituição cedente de 100 cepas de *C. gattii* e *C. neoformans*

<i>C. gattii</i>		
Origem	N	Instituição
Clínicos	25	IAL
Ambientais	20	IPEC/FIOCRUZ
	4	ICB/USP
	1	IAL
Subtotal	50	
<i>C. neoformans</i>		
Origem	N	Instituição
Clínicos	25	IAL
Ambientais	23	UFTM
	2	IAL
Subtotal	50	
Total	100	

3.1.2 Cepas-padrão de *C. gattii* e *C. neoformans*

Em todos os experimentos foram incluídas cepas-padrão. Para *C. gattii* foram utilizados 2 tipos moleculares, a saber: VGI (WM 179) e VGII (WM 178), e para *C. neoformans* VNI (H99) e VNII (WM 626). As cepas de *C. gattii* WM178, WM179 e de *C. neoformans* WM626 foram, gentilmente, cedidas pela referência internacional Prof. Dr. Wieland Meyer, da Universidade de Sidney (Austrália) e repassadas ao IAL pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da FIOCRUZ. A cepa-padrão H99 foi, do mesmo modo, cedida pelo Prof. Dr. Marcio Rodrigues da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). A Tabela 3 resume as cepas-padrão que foram utilizadas.

Tabela 3. Cepas-padrão utilizadas no estudo de heterorresistência ao fluconazol

Espécie	Identificação	Sorotipo	Tipo molecular	Instituição cedente
<i>C. gattii</i>	WM 179	B	VG I	Universidade de Sidney/ INCQS
	WM 178	B	VG II	Universidade de Sidney/ INCQS
<i>C. neoformans</i>	H99	A	VN I	UFRJ
	WM 626	A	VN II	Universidade de Sidney/ INCQS

3.2 Determinação da suscetibilidade ao fluconazol

3.2.1 Determinação de suscetibilidade por Etest®

O ensaio pela metodologia de difusão em ágar por fita foi realizado pelo sistema Etest® (Biomérieux, França), com fitas de fluconazol, para determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Esse sistema consiste em uma fita impregnada com fluconazol, com concentrações variando de 0,016 a 256 µg/mL e foi utilizado para determinação da suscetibilidade de 13 cepas de *C. gattii* clínicos. Este grupo de cepas foi escolhido, aleatoriamente, para demonstrar a correlação da concentração inibitória mínima (CIM) entre os métodos Etest® e a metodologia de referência, método de microdiluição em placas de microtitulação, pela metodologia de AFST-EUCAST (www.eucast.org).

Os ensaios de Etest® foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante e como sugerido por Sionov et al. (2009). Uma

suspensão celular de turbidez 0,5 na escala McFarland, foi preparada para cada cepa, na qual um *swab* estéril foi imerso e depois semeado em três direções na superfície de ágar YPD. As placas foram deixadas secando por cerca de 15 minutos, antes da aplicação da fita de Etest® de fluconazol à superfície semeada do ágar YPD. As placas foram incubadas a 30°C+2°C por 48h para a obtenção da concentração inibitória mínima (CIM).

A ocorrência de crescimento residual em concentração (ões) acima do CIM, associado à ação fungistática do FCL, fenômeno denominado de *trailing*, foi observada e compilada.

Para o gênero *Cryptococcus* não há consenso quanto aos pontos de corte (*breakpoints*) para a interpretação dos resultados de CIM. Porém, o *breakpoint* de ≥ 16 µg/mL é considerado relevante e foi adotado neste estudo, com base na recomendação de Aller et al. (2000).

Como controle de qualidade interno foram utilizadas as cepas-padrão de *Candida krusei* ATCC 6258 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019.

3.2.2 Determinação de suscetibilidade por microdiluição

Os perfis de sensibilidade de todas as 100 cepas foram avaliados, em duplicata, pelo método de referência europeu AFST-EUCAST documento E. Def 7.2 Revision (AFST-EUCAST, 2012). Os resultados dos testes foram expressos em mg/L. O meio de cultura usado na prova foi RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, USA), sem bicarbonato de sódio e com L-glutamina. O antifúngico FCL (*Pfizer Laboratories*) foi utilizado na forma p. a. Todas as placas foram preparadas, simultaneamente, e congeladas à -20° C no Instituto Adolfo Lutz de Rio Claro.

A solução-estoque de FCL, na concentração de 5120 µg/mL, foi preparada em água destilada. 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, foram de 64 mg/L a 0,125 mg/L. Cada concentração de

antifúngico foi distribuído em alíquotas de 100 µL, em uma placa de microtitulação, da coluna 2 até a 11, correspondendo a cada coluna, uma concentração. As placas foram congeladas à temperatura de -20°C, até o momento do uso, por período máximo de 6 meses (AFST- EUCAST, 2012). Em cada placa foi possível avaliar seis cepas e duas cepas-padrão. As cepas-padrão de *Candida krusei* ATCC 6258 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019 foram usadas em todos os testes para validar os resultados (Barry et al., 2000).

Para essas avaliações, um inóculo de cada cepa foi preparado em solução salina em concentração de 1 a 5 x10⁵ ufc/mL. Alíquotas de 100 µL, de cada inóculo foram colocadas nos poços das placas contendo o antifúngico fluconazol e sua concentração final foi reduzida à metade (0,5 a 2,5 x10⁵ ufc/mL). Em cada placa foram colocados inóculos de 6 leveduras, sendo as duas últimas linhas (G e H) destinadas às cepas-padrão, para controle interno de qualidade do teste. O controle de esterilidade, preparado em toda a 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, denominado de controle positivo, foi colocado na coluna 12, sendo preparado com 100 µL de RPMI e 100 µL do inóculo. As placas foram tampadas e incubadas a 30 °C, em estufa incubadora. A leitura de turbidez, resultante do crescimento das cepas, foi realizada às 48h e quando o valor da densidade ótica (D. O.) foi ≥ 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. A CIM de FCL foi a que permitiu inibição de 50% do crescimento (“*inhibition concentration*” ou IC50) de cada cepa, em relação ao observado no poço de controle positivo. Para interpretação dos valores de CIM, foram utilizados os critérios de Aller et al. (2000), o mesmo utilizado na interpretação de Etest®, cujos valores de CIM ≥16 mg/L

classificam as cepas como resistentes a este azol. A Figura 1 mostra o esquema de preparação da placa para teste de microdiluição.

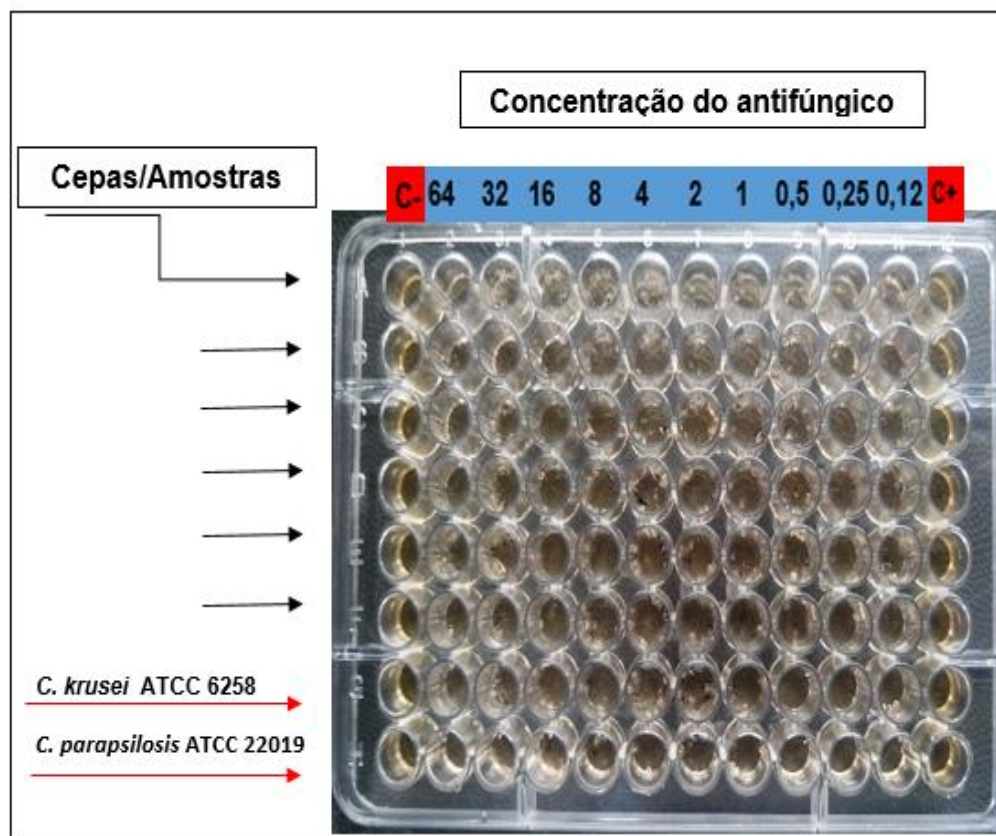


Figura 1. Exemplo de placa de microtitulação usada para determinação do CIM contendo concentrações de fluconazol (mg/L), na qual C+ indica a coluna usada para controle-positivo (controle de crescimento) e C- representa a do controle negativo (controle de esterilidade).

3.3 Procedimentos para testes de heterorresistência ao fluconazol

3.3.1 Validação da técnica de heterorresistência ao fluconazol

A Norma DOQ-CGCRE-008-Revisão 04-jul/2011 (INMETRO) foi consultada para validar a técnica de determinação da heterorresistência ao fluconazol. Os parâmetros de precisão e repetitividade foram avaliados com a cepa H99 de *C. neoformans*. Foram mantidas inalteradas as seguintes condições: analista, laboratório, equipamentos, marcas de meios de cultura e reagentes. Para cada procedimento, ou seja: determinação do nível de heterorresistência ao fluconazol (NHF), capacidade de adaptação a altos níveis de fluconazol e avaliação da estabilidade, foram realizadas 20 repetições, dentro de um período máximo de três meses.

3.3.2 Preparação das placas de ágar YPD com fluconazol

Para todas as etapas da determinação da heterorresistência foram utilizadas o meio agar *Yeast Peptone Dextrose* – YPD - (1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de glicose), exceto para a etapa de determinação da estabilidade em que usou-se para crescimento o meio caldo YPD. O meio ágar YPD foi preparado em diferentes concentrações (4, 8, 16, 32, 64, 128 e 256 mg/L) adicionando FCL, na concentração desejada, diretamente, no meio ágar YPD. Placas contendo meio agar YPD sem adição de FCL foram preparadas para serem utilizadas como controle dos testes.

3.3.3 Avaliação do nível de heterorresistência ao fluconazol

Para todas as 100 cepas, com CIM determinado, foram realizados os testes de determinação da heterorresistência ao fluconazol (NHF). Para tanto, suspensões celulares preparadas em soluções salina 0,85% estéril foram feitas para todas as cepas, com turbidez igual à 0,5 McFarland que representa uma concentração aproximada de $1,5 \times 10^6$ cel/mL. Para o ajuste da concentração foi feita contagem em Câmara de Neubauer até que a concentração final da suspensão ficasse em $1,5 - 2,5 \times 10^6$ cel/mL. Em seguida, o NHF foi determinado e realizado por *spot test* (Figura 2).

O ensaio consistiu, inicialmente, de diluições seriadas, da suspensão ajustada a 10^6 cel/mL, e a partir dela, fez-se as diluições seriadas e obteve-se as concentrações de 10^5 cel/mL, 10^4 cel/mL e 10^3 cel/mL.

A partir de uma concentração acima do CIM para FCL frente a cada cepa, uma alíquota de 3 μ L de cada suspensão (10^6 , 10^5 , 10^4 e 10^3 cel/mL) foi, então, adicionada, com replicador de placas (*replica plate*), à superfície de meio ágar YPD isento de fluconazol e em placas com meio ágar YPD suplementado com diferentes concentrações de fluconazol (4 mg/L, 8 mg/L, 16 mg/L, 32 mg/L, 64 mg/L e 128 mg/L). Em cada placa de Petri, com ágar YPD isento de fluconazol e com ágar YPD com concentrações de fluconazol (4 a 128mg/L) foram ensaiadas 8 cepas (Figura 3).

As placas foram, então, incubadas à $30^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ por 72h e após esse período foi feita a leitura do teste (Sionov et al., 2009; Varma e Kwon-Chung et al., 2010). Todas as amostras foram realizadas em duplicata. Para tal, foi observado crescimento de cada cepa nos pontos inoculados e determinada a maior concentração que permitiu crescimento de cada cepa. Esta indica o NHF para cada cepa.

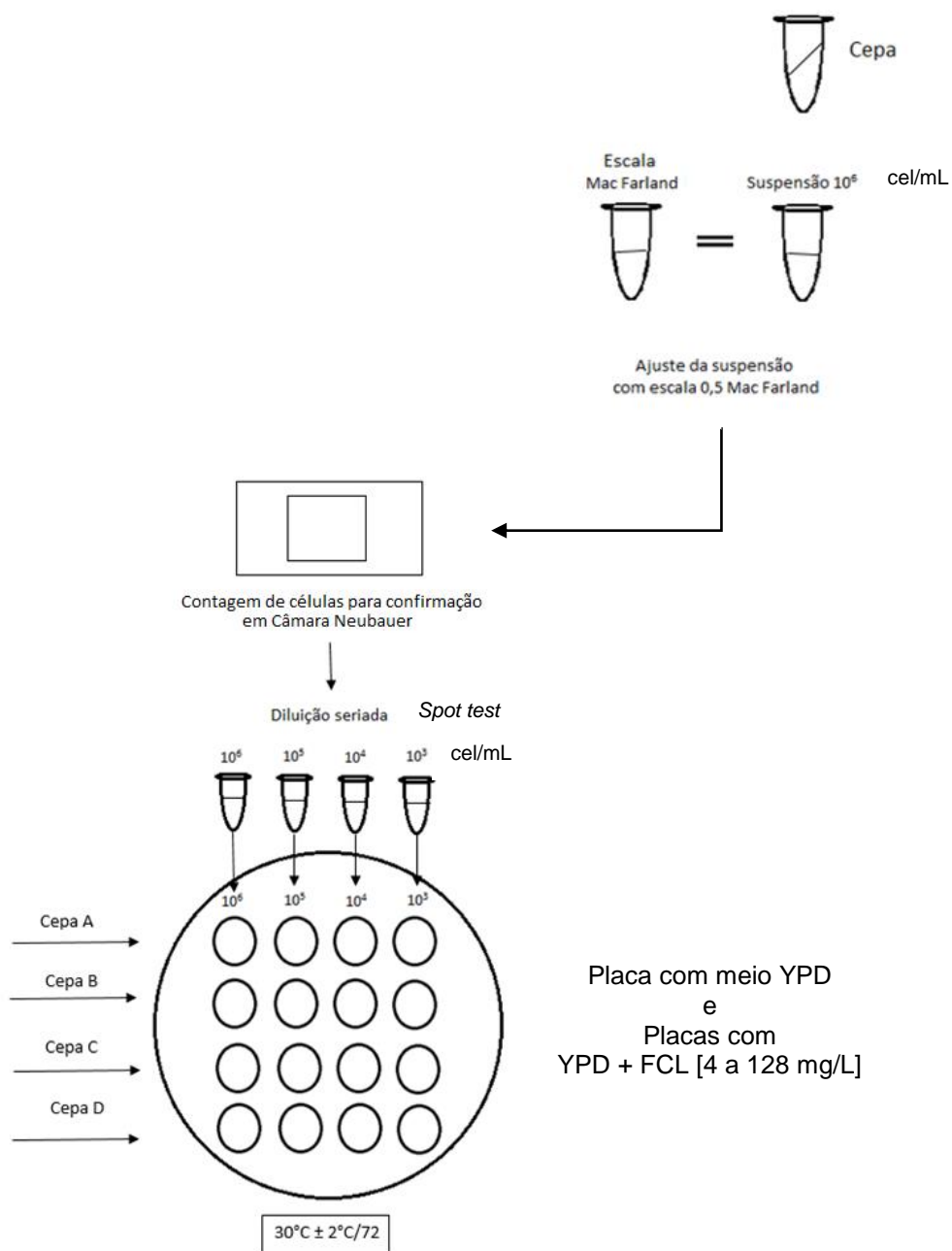


Figura 2. Exemplo de esquema de trabalho para determinação do nível de heterorresistência de fluconazol (NHF) em 4 cepas de *Cryptococcus* spp.



Figura 3. Ilustração do *spot test* para determinação do nível de heterorresistência em cepa de *C. gattii*




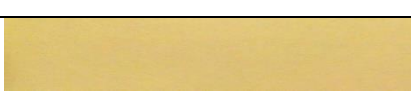
	10 ⁶ cel/mL 10 ⁵ cel/mL 10 ⁴ cel/mL 10 ³ cel/mL
Meio YPD	
	10 ⁶ cel/mL 10 ⁵ cel/mL 10 ⁴ cel/mL 10 ³ cel/mL
Meio YPD+8mg/L FCL	
	10 ⁶ cel/mL 10 ⁵ cel/mL 10 ⁴ cel/mL 10 ³ cel/mL
Meio YPD+16mg/L FCL	
	10 ⁶ cel/mL 10 ⁵ cel/mL 10 ⁴ cel/mL 10 ³ cel/mL
Meio YPD+32mg/L FCL	

Figura 4. Exemplo de nível de heterorresistência ao fluconazol (NHF) em 16 mg/L (seta em vermelho), usando-se *spot test*, onde: YPD, *yeast peptone dextrose*; FCL, fluconazol; 10⁶, 10⁵, 10⁴ e 10³ cel/mL, concentrações celulares. Na concentração de 32 mg/L não há crescimento em nenhuma diluição.

3.3.4 Análise da frequência de ocorrência de heterorresistência ao fluconazol

Para a análise da frequência da heterorresistência foi procedida contagem de ufc em meio ágar YPD isento de fluconazol (controle positivo de crescimento) e contagem em ágar YPD com FCL na concentração do NHF de cada cepa. Esses valores foram comparados e a porcentagem foi obtida (ufc heterorresistentes/ ufc total). Para os procedimentos, foi preparada, inicialmente, uma suspensão celular de cada cepa, em turbidez equivalente à do tubo 0,5 da escala McFarland. Essa suspensão foi ajustada, por contagem de células em câmara de Neubauer, para 1,5 - 2,5 10^6 cel/mL e, em seguida, foi diluída para obtenção de concentração final de 10^3 cel/mL, usada no teste. Alíquotas de 150 μ L desta suspensão foram, então, plaqueadas em ágar YPD com FCL na concentração do valor do NHF de cada cepa, bem como, em ágar YPD sem fluconazol (controle positivo). A incubação das placas foi realizada a $30^\circ\text{C} \pm 2^\circ$ por 72h, após o que foi feita e anotada a contagem de ufc/mL em ambas as placas. Todas as cepas foram avaliadas em duplicata.

3.3.5 Teste de adaptação a níveis de fluconazol acima do NHF

Todas as 100 cepas foram avaliadas na fase de adaptação, fase em que se testa se a cepa é capaz de tolerar altas concentrações, de maneira gradual. Para cada cepa foi preparada uma suspensão que foi semeada (150 μ L) em meio agar YPD contendo a concentração de NHF. A incubação das placas foi realizada a $30^\circ\text{C} \pm 2^\circ$ por 72h. As colônias que cresceram foram repassadas para outra placa contendo o dobro da concentração e assim, sucessivamente, até repique em placa contendo 256 mg/L de FCL. Em paralelo, a suspensão inicial para cada cepa, foi plaqueada em meio agar YPD sem fluconazol para controle positivo de crescimento. Os testes foram realizados em duplicata.

Para esta fase foi feito um estudo piloto para determinar a concentração e o volume da suspensão, nos quais foram testados os volumes 5 μ L, 10 μ L, 50 μ L e 150 μ L, a ser utilizado no teste de suspensão celular para ser utilizado na fase de adaptação, em que o maior volume (150 μ L), foi definido como o mais adequado para o referido ensaio (Figura 5). Com a padronização desses parâmetros, houve crescimento adequado e as colônias foram contadas para cálculo da porcentagem de subpopulações altamente resistentes. Todos os testes foram realizados em duplicata.

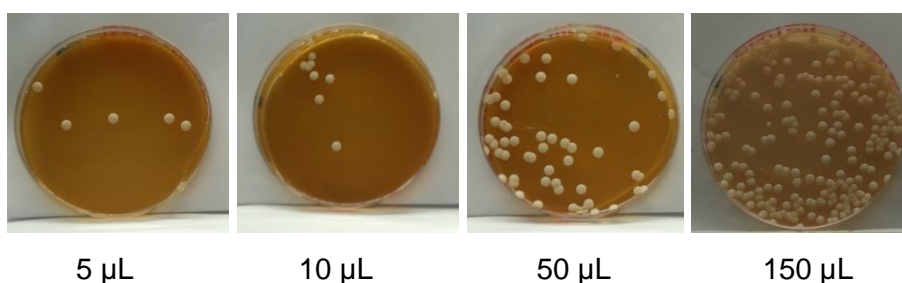


Figura 5. Ilustração de estudo-piloto realizado para determinar melhor volume de suspensão celular a ser utilizado no testes de adaptação

3.4 Análise da estabilidade da heterorresistência ao fluconazol

Para o teste de estabilidade, foram selecionadas cepas representativas, com NHF de ≥ 16 mg/L que se adaptaram a concentrações ≥ 64 mg/L de FCL. Um grupo de 14 cepas, incluindo *C. gattii*, *C. neoformans*, clínicas e ambientais, foi utilizado.

A estabilidade da heterorresistência, como ilustrada na Figura 6, foi determinada com base no número de repiques necessários para que uma cepa retornasse ao nível de NHF. Para tanto, cada uma das 14 cepas foi semeada (50 μ L de suspensão de 10^3 ufc/mL) em 5 mL de YPD e incubada por 24h a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. A seguir, 50 μ L da suspensão foram retirados e

repassados em novo caldo YPD e assim, sucessivamente, 9 passagens foram realizadas em 10 dias consecutivos.

De modo simultâneo a cada passagem, foi avaliado o retorno ao NHF da suspensão celular, como segue. Uma alíquota de 50 µL da suspensão foi retirada e inoculada em placas contendo ágar YPD com FCL em distintas concentrações (16 mg/L a 128 mg/L). Um controle positivo de crescimento foi preparado do mesmo modo em ágar isento de FCL.

Todas as placas foram, então, incubadas a 30°C + 2°C por 72h para verificar o crescimento e contagem de ufc. Na passagem em que o crescimento ocorreu no valor do NHF foi dado o resultado do teste. Desse modo, o número de dias necessários para o retorno ao NHF foi definido como a unidade de medida deste ensaio.

3. 5 Análise estatística

Como forma de análise dos resultados os parâmetros de valor médio, valor modal, CIM₅₀ e CIM₉₀, definidos, respectivamente, como a concentração do fármaco necessária para inibir 50% e 90% das cepas analisadas também foram calculados. A análise estatística e comparação de médias por ANOVA (com valor de significância P<0,05) foi realizada no Microsoft Office Excel 2007.

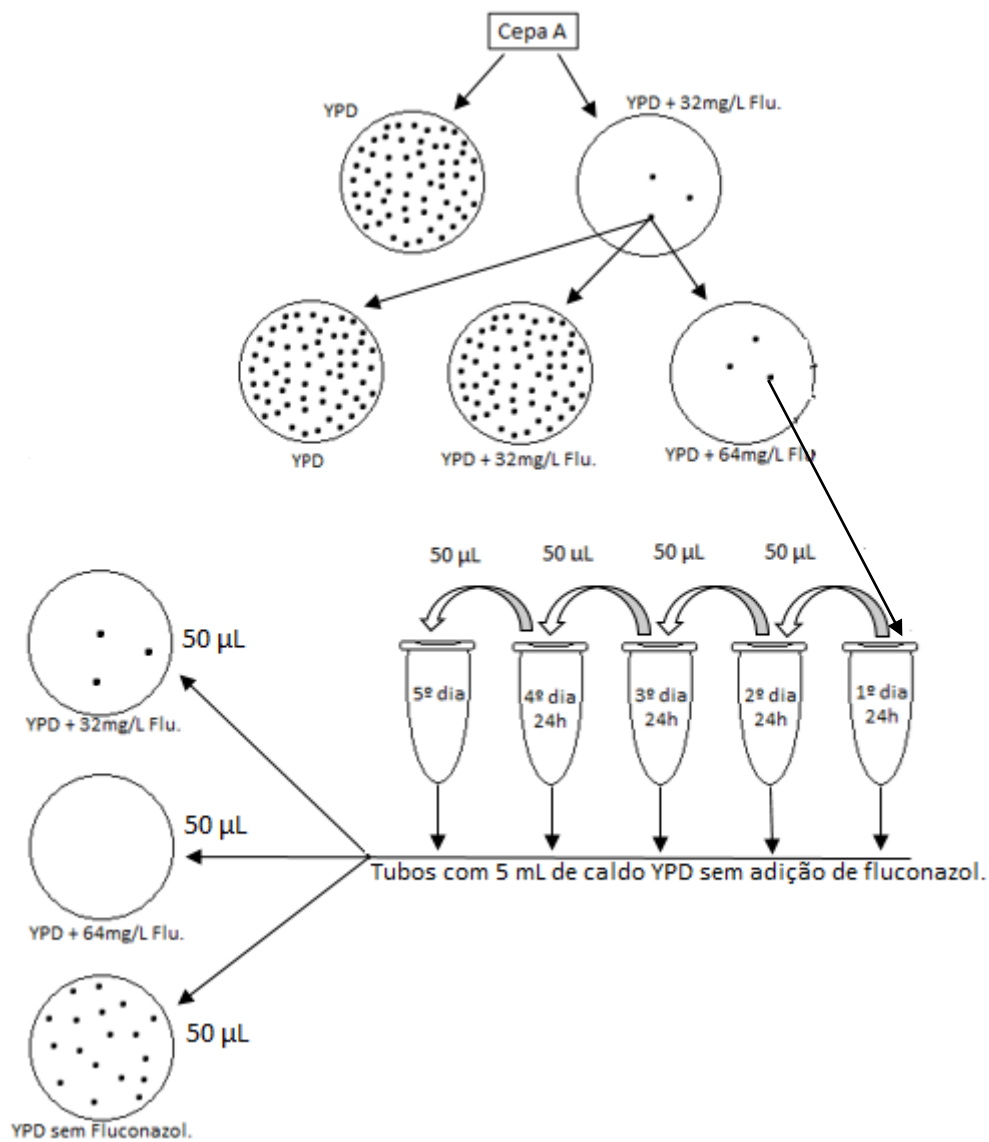
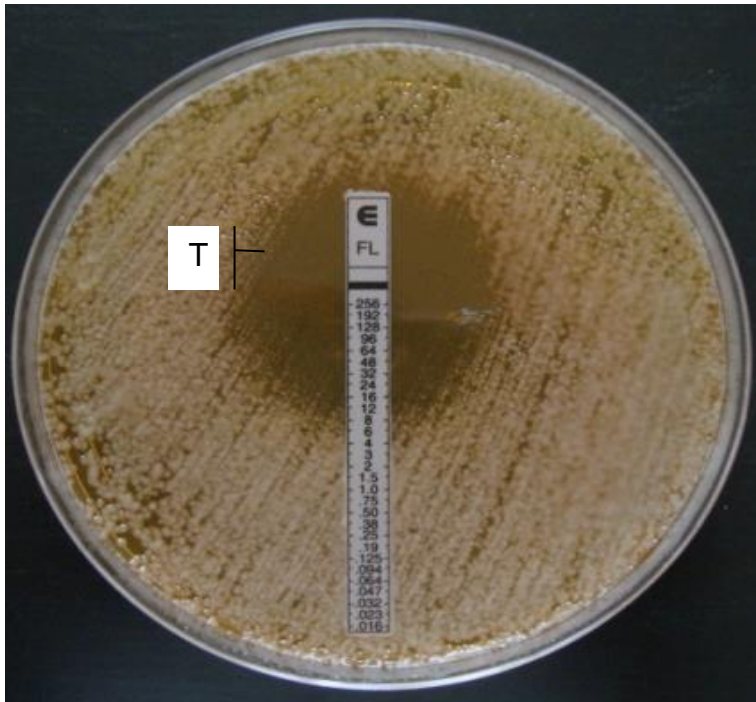


Figura 6. Exemplo de diagrama de avaliação de estabilidade, onde cepa (A) com NHF de 32 mg/L foi adaptada até 64 mg/L e, no teste de estabilidade retornou ao NHF após 5 dias. Flu, fluconazol; YPD, meio *yest peptone dextrose*

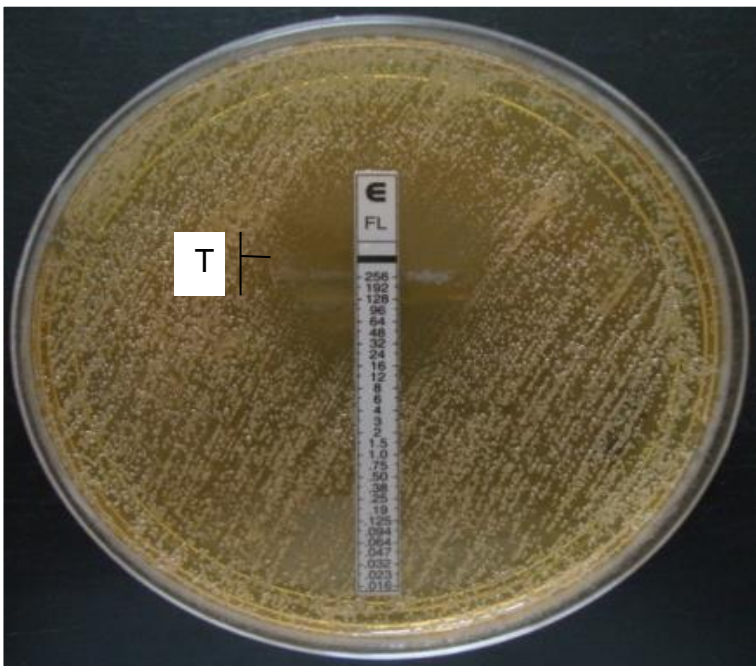
4 RESULTADOS

4.1 Valores de concentração inibitória mínima de fluconazol por Etest®

Os CIMs de FCL pelo método de Etest® foram determinados frente a 13 cepas e os valores foram de: 8 mg/L (cepa186/94), 12 mg/L (47/97), 3 mg/L (51/98), 8 mg/L (114/98), 3 mg/L (01/99), 6 mg/L (21/99), 24 mg/L (67/99), 3 mg/L (02/00), 3 mg/L (174/01), 12 mg/L (188/01), 8 mg/L (28/02), 3 mg/L (131/03) e 8 mg/L (34/05). Todos os resultados foram equivalentes aos obtidos por método de microdiluição. A presença de fenômeno *trailing* ocorreu em 90% dos testes com Etest® (Figura 7).



CIM= 8mg/L



CIM 16mg/L

Figura 7. Exemplos de ensaios por E-test® para determinação de CIM de FCL frente a 2 cepas clínicas de *C. gattii*, onde T, fenômeno *trailing*

4.2 Valores de concentração inibitória mínima de fluconazol obtidas por microdiluição

Na Tabela 4, estão parametrados os valores de CIM. O intervalo de valores de CIM foi de 1 mg/L a 32 mg/mL para *C. gattii* clínicos, de 2 mg/L a 32mg/mL para *C. gattii* ambientais, de 1 mg/L a 64 mg/L para *C. neoformans* clínicos e de 0,12 mg/L a 32 mg/L para *C. neoformans* ambientais. As médias geométricas de CIM para *C. gattii* clínicos, *C. neoformans* clínicos, *C. gattii* ambientais e *C. neoformans* ambientais foram, respectivamente, de 5,28 mg/L, 7,36 mg/L, 11,47 mg/L e 6,76 mg/L. Para *C. gattii* clínicos, *C. neoformans* clínicos, *C. gattii* ambientais e *C. neoformans* ambientais, os valores de CIM₅₀ e CIM₉₀, foram respectivamente de: 8mg/L e 16 mg/L, 8 mg/L e 16 mg/L, 16 mg/L e 32 mg/L e 8 mg/L e 16 mg/L.

A classificação de resistência, segundo *breakpoint* de ≥ 16 mg/L, resultou em 16% (4/25) para cepas ambientais de *C. gattii*, 24% (6/25) para *C. neoformans* ambientais, 32% (8/25) *C. neoformans* clínicos e em 56% (6/25) para *C. gattii* clínicos.

Os valores de CIM de fluconazol frente à cepa-padrão para heterorresistência *C. neoformans* (H99) e cepas de referência para a espécie de *C. gattii* (VGI, VGII) e *C. neoformans* (VGII) constam da Tabela 5.

Para as cepas de *C. gattii* de origem clínica, foram encontrados valores de CIM: 1 mg/L frente a 1 (4%; 6/25) cepa, 2 mg/L frente a 6 (24%; 6/25) cepas, 4mg/L frente a 5 (20%; 5/25) cepas, 8 mg/L frente a 9 (36%; 9/25) cepas, 16 mg/L frente a 3 (12%; 3/25) cepas e 32 frente a 1 (4%; 1/25) cepa.

Para as cepas de *C. gattii* de origem ambiental, foram encontrados valores de CIM de 2 mg/L frente a 1 (4%; 1/25) cepa, de 4mg/L frente a 5 (20%; 5/25) cepa, de 8 mg/L frente a 5 (20%; 5/25) cepas, de 16 mg/L frente a 8 (32%; 8/25) cepas e de 32 frente a 6 (24%; 6/25) cepas.

Para as cepas de *C. neoformans* de origem clínica, foram encontrados valores de CIM: 1 mg/L frente 1 (4%; 1/25) cepa, 2 mg/L frente 4 (16%; 4/25) cepas, 4 mg/L frente a 4 (16%; 4/25) cepa, 8 mg/L frente a 8

(32%; 8/25) cepas, 16 mg/L frente a 6 (24%; 6/25) cepas e 64 frente a 2 (8%; 8/25) cepa.

Para as cepas de *C. neoformans* de origem ambiental, o CIM foi de 0,12 mg/L frente a 1 (4%; 1/25) cepa, de 0,25 mg/L frente a 1 (4%; 1/25) cepa, de 2 mg/L frente a 1(4%; 1/25) cepa, de 4 mg/L frente a 2 (8%; 2/25) cepas, de 8 mg/L frente a 12 (48%; 12/25) cepas e de 16 mg/L frente a 7 (28%; 7/25) cepas e CIM 32 mg/L frente a 1(4%; 1/25) cepas.

O valor de CIM de FCL obtido para cada cepa consta da Tabela 7.

Tabela 4. Parâmetros para avaliação da concentração inibitória mínima (CIM em mg/L) de fluconazol frente a 100 cepa de *Cryptococcus* spp. segundo grupo de cepas

Cepas	CIM ₅₀	CIM ₉₀	Mínimo	Máximo	Média geométrica	Moda
<i>C. gattii</i> clínicos (n=25)	8	16	1	32	5,28	8
<i>C. neoformans</i> clínicos (n=25)	8	16	1	64	7,36	8
<i>C. gattii</i> ambientais (n=25)	16	32	2	32	11,47	16
<i>C. neoformans</i> ambientais (n=25)	8	16	0,12	32	6,76	8

Tabela 5. Valores de concentração inibitória mínima de fluconazol para cepa-padrão H99 e cepas de referência, segundo método Etest®

Espécie	Identificação	Tipo Molecular	CIM (mg/L)
<i>C. neoformans</i>	H99	VN I	16
<i>C. neoformans</i>	WM 626	V N II	8
<i>C. gattii</i>	WM 179	VG I	2
<i>C. gattii</i>	WM 178	VG II	16

4.3 Nível de heterorresistência ao fluconazol (NHF)

Os valores de NHF para todas as cepas estão explicitados na Tabela 6.

Para as 25 cepas clínicas de *C. gattii*, 100% apresentaram NHF em valores acima de ≥ 16 mg/L, assim distribuídos: 32 mg/L (24%; 6/25), 64 mg/L (72%; 18/25) e 128 mg/L (4%; 4/25).

Nas 25 cepas de *C. neoformans* clínicos 2 mostram NHF de 8 mg/L (8%; 2/25) e as demais apresentaram NHF ≥ 16 mg/L, incluindo valores de: 16 mg/L (12%; 3/25), 32 mg/L (48%; 12/25), 64 mg/L (24%; 6/25) e 128 mg/L (8%; 2/25). Nas 25 cepas de *C. gattii* ambientais analisadas 1 apresentou NHF acima de 8 mg/L (4%; 1/25) e as demais apresentaram NHF ≥ 16 mg/L, incluindo valores de: 16 mg/L (4%; 1/25), 32 mg/L (36%; 9/25), 64 mg/L (52%; 13/25) e 128 mg/L (4%; 1/25). Nas cepas de *C. neoformans* ambientais, 100% das cepas apresentaram NHF em valores de ≥ 16 mg/L, assim distribuídos: 16 mg/L (32%; 8/25) e 32 mg/L (56%; 14/25) e 64 mg/L (12%; 3/25).

Considerando CIM e heterorresistência a FCL, observa-se que 19 cepas clínicas de *C. gattii* sensíveis tinham NHF considerado como altamente heterorresistentes (≥ 64 mg/L), sendo: 1 (4%, 1/25) cepa CIM 8mg/L e NHF 128 mg/L, 8 (32%, 8/25) cepas CIM 8 mg/L e NHF 64 mg/L, 2 (8%, 2/25) cepas CIM 2 mg/L e NHF 64 mg/L, 3 (12%, 3/25) cepas CIM 4 mg/L e NHF 64 mg/L e 1 (4%, 1/25) cepa CIM 1 mg/L e NHF 64 mg/L.

Para *C. neoformans*, foram encontradas 2 cepas sensíveis e NHF ≥ 64 mg/L, incluindo: 1 (4%, 1/25) cepa CIM 2 mg/L e NHF 64 mg/L, 1 (4%, 1/25) cepa CIM 8 mg/L e NHF 64 mg/L.

Dentre 3 cepas ambientais de *C. gattii* sensíveis e com NHF ≥ 64 mg/L, encontrou-se 1 (4%, 1/25) cepa CIM 4 mg/L e NHF 64 mg/L, 2 (8%, 2/25) cepas CIM 8 mg/L e NHF 64 mg/L.

Para cepas ambientais de *C. neoformans* 1 (4%, 1/25) cepa sensível e NHF ≥ 64 mg/L, havia 1 (4%, 1/25) cepa CIM 4 mg/L e NHF 64 mg/L.

Tabela 6. Valores de NHF para 100 cepas de *C. gattii* e *C. neoformans*

<i>C. gattii</i>				
Origem	NHF mg/L	Nº isolados testados	% cumulativa	Heterorresistência
Clínica	4	0	0	100
	8	0	0	
	16	0	0	
	32	6 (24%)	24	
	64	18 (72%)	96	
	128	1 (4%)	100	
Ambiental	4	0	0	100
	8	1 (4%)	4	
	16	1 (4%)	8	
	32	9 (36%)	44	
	64	13 (52%)	96	
	128	1 (4%)	100	

Cont. Tabela 6.

C. neoformans				
Origem	NHF mg/L	Nº isolados testados	% cumulativa	Heterorresistência
Clinica	4	0	0	
	8	2 (8%)	8	100
	16	3 (12%)	20	
	32	12 (48%)	68	
	64	6 (24%)	92	
	128	2 (8%)	100	
Ambiental	4	0	0	
	8	0	0	100
	16	8 (32%)	32	
	32	14 (56%)	88	
	64	3 (12%)	100	

As Figuras 8 e 9 mostram as distribuições de cepas dos grupos de *C. gattii* e *C. neoformans*, ambientais e clínicas, respectivamente.

Dados pelo programa estatístico ANOVA sugerem uma heterogeneidade entre os 4 grupos (espécie, origem e concentração) revelando a inclusão aleatória das cepas.

4.3.1 Frequência da heterorresistência ao fluconazol

Esta fase foi realizada para todas as 100 cepas, tomando-se em conta os resultados na fase de determinação de NHF (valores de 8 mg/L a 128 mg/L).

A frequência de heterorresistência, ou seja, a quantidade de colônias heterorresistentes, obtida no NHF, ocorreu em taxas entre 0,3% a 14% em relação às colônias da cepa parental.

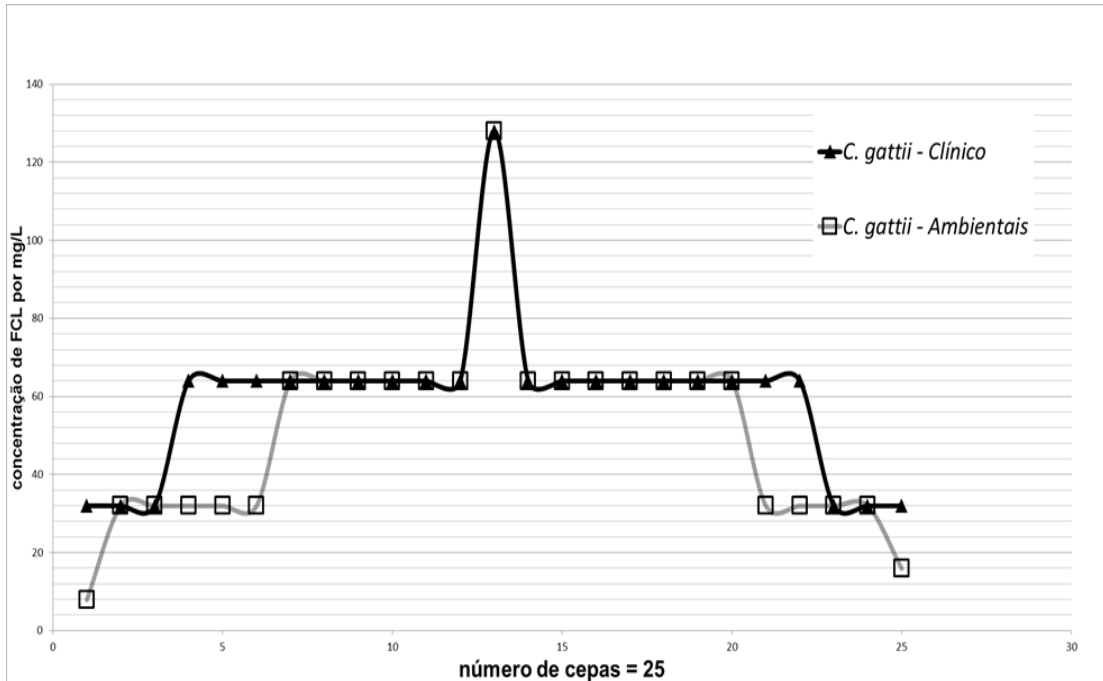


Figura 8. Distribuição das cepas de *C. gattii* em relação ao NHF

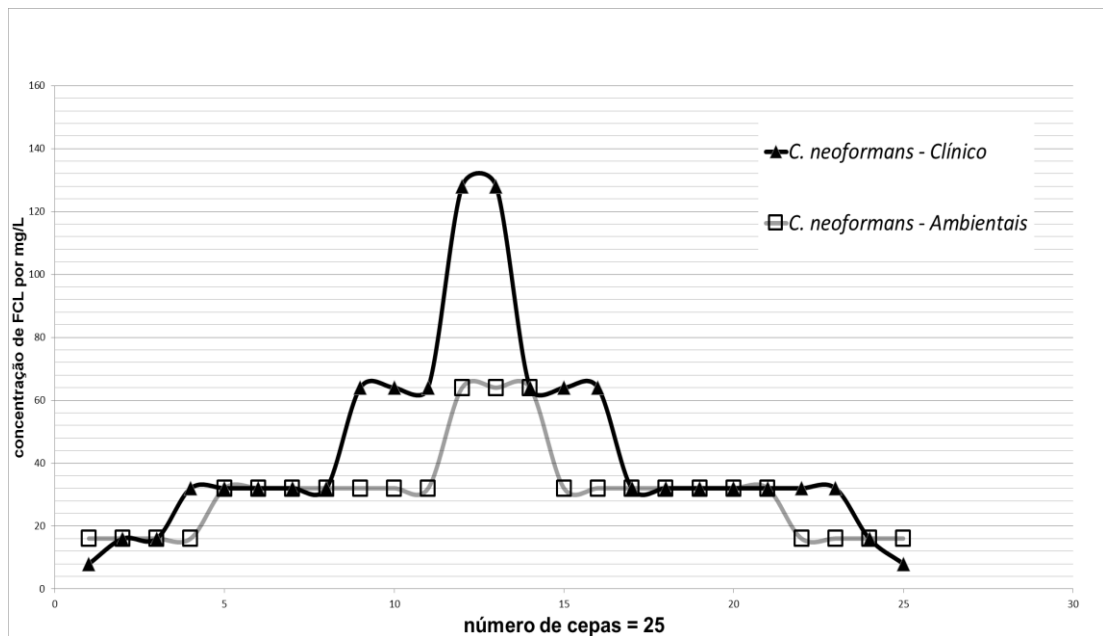


Figura 9. Distribuição das cepas de *C. neoformans* em relação ao NHF

4.4 Capacidade de Adaptação

A partir da placa com meio agar YPD contendo FCL em concentração do NHF, obteve-se adaptação da subpopulação até 256 mg/L do fármaco, como ilustrado à Figura 10. Os resultados desses ensaios constam da Tabela 7.

Com esses procedimentos foi possível verificar que dentre as 25 cepas clínicas de *C. gattii*, o nível de adaptação foi de 64 mg/L a 256 mg/L, sendo 3 cepas (12%; 3/25) no valor máximo de 256 mg/L e 5 cepas (20%; 5/25) não adaptaram. Para cepas clínicas de *C. neoformans*, o nível de adaptação a fluconazol variou de 64 a 256 mg/L e 3 (12%; 3/25) atingiram o valor máximo de 256 mg/L e 3 cepas (12%; 3/25) não adaptaram. Para cepas ambientais de *C. gattii*, foram obtidos níveis de adaptação que variou de 16 a 256 mg/L e 3 (12%; 3/25) atingiram o valor máximo de 256 mg/L e 8 cepas (32%; 8/25) não adaptaram. As cepas de *C. neoformans* ambientais obtiveram níveis de adaptação que variaram de 32 a 128 mg/L e 5 (20%; 5/25) atingiram o valor máximo de 128 mg/L, um nível menor em relação aos outros grupos de cepas, e 6 cepas (24%; 6/25) não adaptaram.

Em uma análise individual das 25 cepas clínicas de *C. neoformans* clínicos, destaca-se em relação entre o NHF e capacidade de adaptação a maiores níveis do fármaco: 3 grupos de cepas que conseguiram adaptar em 3 níveis acima do NHF, sendo de 32 mg/L para 128 mg/L (8%; 2/25), 64 mg/L para 256 mg/L (4%; 1/25) e 8 mg/L para 64 mg/L (8%, 2/25), esta última destaca-se o valor baixo do NHF inicial que conseguiu atingir um valor considerado altamente heterorresistentes (64 mg/L).

A mesma análise, de relação entre NHF e adaptação, para as cepas clínicas de *C. gattii* clínicos destacam-se: 2 grupos de cepas que conseguiram adaptar em 2 níveis acima do NHF, sendo um grupo (8%; 2/25) que de 32 mg/L atingiu 128 mg/L e outro grupo (8%; 2/25) que de 64 mg/L resistiu até 256 mg/L. Para as cepas ambientais de *C. gattii* analisadas na fase de adaptação, na relação entre NHF e o resultado do ensaio destacam-se: uma (4%; 1/25) cepa que adaptou a 3 níveis acima do NHF (16 mg/L

para 128mg/L) e outra (4%,1/25) cepa que de 8 mg/L se adaptou até 16mg/L, sendo que esta cepa passou de baixo NHF (8mg/L) para nível de heterorresistência relevante (≥ 16 mg/L). A cepa ambiental de *C. neoformans*, com NHF de 32 mg/L adaptou-se até 128mg/L.

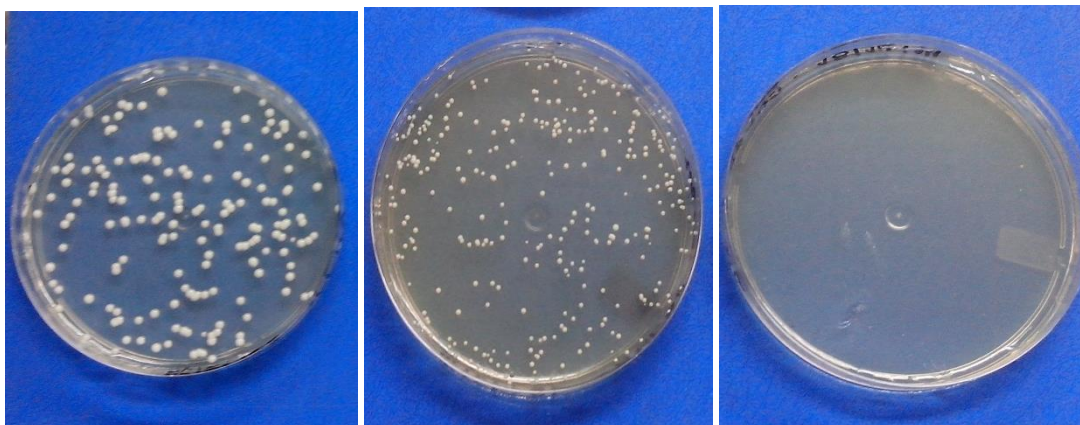


Figura 10. Exemplo de ensaio de adaptação a 2 níveis acima do NHF (nível de heterorresistência ao fluconazol), onde: colônias de cepa com NHF de 64 mg/L (esquerda); populações altamente resistentes a 128 mg/L (centro) e populações altamente resistentes a 256 mg/L

4.5 Estabilidade da heterorresistência ao fluconazol

Para avaliar a estabilidade da heterorresistência ao FCL, foi aplicado critério de NHF ≥ 16 mg/L e adaptação em ≥ 64 mg/L. Foram selecionadas, aleatoriamente, uma cepa representativa de cada grupo dentro do intervalo estabelecido. Assim, uma cepa de *C. gattii* clínicos, *C. gattii* ambiental, *C. neoformans* clínicos e *C. neoformans* ambiental foram selecionadas nas seguintes concentrações de NHF inicial: 16, 32, 64 e 128 mg/L. Foram, assim, selecionadas 13 cepas com NHF nessa faixa de valores. As subpopulações altamente heterorresistentes desse grupo de cepas, após transferências diárias para meio isento de FCL, mostraram estabilidade do fenômeno após as 9 transferências, não mostrando reversão ao NHF inicial, como indicado na Tabela 7.

Tabela 7. Valores de concentração inibitória mínima (CIM em mg/L) de fluconazol, determinados pelo método de microdiluição, tipo molecular, nível de heterorresistência, adaptação e estabilidade de 100 cepas de *C. neoformans* e *C. gattii*

Cepas	No. Cepa	Tipo Molecular	CIM (mg/L)	NHF (mg/L)	Nível de Adaptação (mg/L)	Estabilidade (dias)
<i>C. gattii</i> clínicos (n=25)	186/94	VG II	8	128	256	9
	197/94	VG II	8	64	256	NR
	45/97	VG II	16	32	N	NR
	47/97	VG II	16	64	256	NR
	51/98	VG II	2	64	128	NR
	114/98	VG II	8	64	128	NR
	01/99	VG II	2	32	64	NR
	21/99	VG II	8	64	128	NR
	64/99	VG II	4	64	128	9
	67/99	VG II	32	64	128	NR
	96/99	VG II	8	64	128	NR
	58/00	VG II	2	64	N	NR
	02/00	VG II	2	32	128	9
	43/00	VG II	4	64	128	NR
	125/01	VG II	4	64	128	NR
	136/01	VG II	4	32	64	NR
	174/01	VG II	2	32	64	NR
	188/01	VG II	16	64	N	NR
	28/02	VG II	8	64	128	NR
	87/03	VG II	4	32	128	NR
	131/03	VG II	2	64	N	NR
	194/04	VG II	8	64	N	NR
	582/04	VG II	8	64	128	NR
	600/04	VG II	1	64	128	NR
	34/05	VG II	8	64	128	NR
<i>C. neoformans</i> clínicos (n=25)	5639	VN II	4	16	64	NR
	11503	VN I	16	64	N	NR
	11861	VN I	4	32	64	NR
	12670	VN I	8	32	N	NR
	19353	VN I	8	32	64	NR
	21920	VN I	64	128	256	NR
	21921	VN I	16	64	128	9
	23914	VN I	4	32	128	NR
	32225	VN II	2	16	64	NR
	48354	VN II	8	32	64	NR

Continuação Tabela 7.

Cepas	No. Cepa	Tipo Molecular	CIM (mg/L)	NHF (mg/L)	Nível de Adaptação (mg/L)	Estabilidade (dias)
<i>C. neoformans</i> clínicos (n=25)	51710	VN I	16	32	64	NR
	54676	VN I	64	128	256	9
	55149	VN I	8	32	64	NR
	57697	VN I	2	32	64	NR
	59152	VN I	8	32	64	NR
	63643	VN I	16	32	128	NR
	71321	VN I	16	64	128	NR
	74112	VN II	4	8	64	NR
	76986	VN I	16	64	256	NR
	77155	VN I	2	64	128	9
	77189	VN I	1	16	128	9
	87956	VN I	8	32	64	NR
	89043	VN I	8	64	N	NR
	90930	VN II	2	8	64	NR
	91631	VN I	8	32	64	NR
<i>C. gatti</i> ambientais (n=25)	CFP 70	VG I	16	64	N	NR
	CFP 198	VG I	2	8	16	NR
	CFP 365	VG I	8	64	128	NR
	CFP 367	VG I	16	32	N	NR
	CFP 368	VG I	16	32	N	9
	CFP 422	VG II	32	64	128	9
	CFP 433	VG II	32	128	256	9
	CFP 443	VG II	32	64	128	NR
	CFP 502	VG II	32	64	N	NR
	CFP 503	VG II	16	64	N	NR
	CFP 504	VG II	4	64	128	NR
	CFP 505	VG II	16	32	N	NR
	CFP 506	VG II	16	64	N	NR
	CFP 507	VG II	16	64	N	NR
	CFP 508	VG II	32	64	256	9
	CFP 509	VG II	4	32	64	NR
	CFP 510	VG II	4	32	64	NR
	CFP 511	VG II	8	64	256	NR
	CFP 512	VG II	32	64	128	NR
	CFP 513	VG II	16	64	128	NR
	82 - ICB	VG I	8	32	128	NR
	182 - ICB	VG II	4	16	128	NR
	183 - ICB	VG II	8	32	64	NR

Continuação Tabela 7.

Cepas	No. Cepa	Tipo Molecular	CIM (mg/L)	NHF (mg/L)	Nível de Adaptação (mg/L)	Estabilidade (dias)
<i>C. gattii</i> ambientais (n=25)	184 - ICB	VG II	8	32	64	NR
	2G	VG I	4	32	64	NR
<i>C. neoformans</i> ambientais (n=25)	V272C	VN I	32	64	N	NR
	I271E	VN I	16	64	128	NR
	87291	VN II	2	16	64	NR
	87296	VN I	16	32	64	NR
	87297	VN I	8	32	128	NR
	87298	VN I	4	32	128	NR
	87299	VN I	0,25	16	32	NR
	87301	VN I	8	32	128	NR
	87303	VN I	8	16	128	9
	87305	VN I	8	16	32	NR
	87306	VN I	8	32	64	NR
	87308	VN II	8	16	32	NR
	87309	VN I	4	64	N	NR
	87312	VN I	8	32	N	NR
	87313	VN I	8	16	32	NR
	87314	VN II	0,12	16	N	NR
	87316	VN I	8	16	32	NR
	87318	VN II	8	32	64	NR
	87320	VN II	16	32	64	NR
	87322	VN I	8	32	N	NR
87323	VN I	16	32	N	NR	
87324	VN I	8	32	64	NR	

Continuação Tabela 7.

Cepas	No. Cepa	Tipo Molecular	CIM (mg/L)	NHF (mg/L)	Nível de Adaptação (mg/L)	Estabilidade (dias)
<i>C. neoformans</i> ambientais (n=25)	87325	VN II	16	32	64	NR
	87327	VN I	16	32	64	NR
	87329	VN I	16	32	64	9

NR, não realizado; N, não adaptou

5 DISCUSSÃO

A recidiva em criptococose, muitas vezes observada na fase de manutenção, é um desafio para o controle da doença e pode ser interpretada como resistência clínica ao FCL (Rodriguez-Tudela et al., 2008). Para azóis, a resistência adquirida em cepas de *Cryptococcus* spp., isoladas de pacientes sob terapia com FCL foi, por diversas vezes, relatada e em muitos casos está relacionada à longa exposição ao fármaco. Estes dados corroboram a hipótese de seleção de células resistentes no agente infectante (Fimua, 2002). A resistência *in vitro* aos fármacos, em particular ao FCL, tradicionalmente, é monitorada através da determinação da CIM. Nesse teste, uma suspensão padronizada do isolado é colocada frente a distintas concentrações do fármaco e, ao final do período de incubação, a menor concentração capaz de inibir o desenvolvimento do isolado revelado pela ausência de turbidez no meio de cultura, é indicada com o valor do CIM. Em teoria, se houver um pequeno número de células ainda viáveis na concentração do CIM e, portanto, resistentes esse conjunto não é detectado, pois não está em concentração suficiente para resultar em turbidez significativa. De outro modo, a detecção de outras formas de resistência é de fundamental importância para melhor manejo da infecção.

Desde que, os métodos para acessar a CIM não permitem determinar presença de poucas células resistentes, um método que possibilite separar, quantificar, purificar e analisar o conjunto de células resistentes traria grande contribuição para o desvendamento do arsenal de resistência do isolado em questão. A busca de outros métodos, que visem detecção de resistência microbiana *in vitro* com maior precisão do que aqueles que determinem CIM, segue em ascensão. Nesse contexto, as técnicas de avaliação da heterorresistência são importantes para melhor compreensão dos processos biológicos capazes de aumentar a sobrevivência dos agentes etiológicos no curso da criptococose.

No final do século passado, um grupo coordenado pela Dra. Kwon-Chung do *National Institutes of Health* (NIH), Maryland, Estados Unidos,

descreveu um perfil de resistência em isolados clínicos de *C. neoformans*, distinto de outros descritos para outras cepas (Mondon et al., 1999). O grupo conclui, ainda, que o fenótipo heterogêneo original re-emergia após repiques sucessivos em meios de cultura sem os fármacos, indicando que esse perfil de resistência tinha caráter de reversibilidade (Mondon et al., 1999). O estudo pioneiro revelou que uma única célula de isolados desse grupo produzia uma progenia com ampla gama de CIMs frente ao fluconazol e voriconazol e as subpopulações mais sensíveis desapareciam em repiques sucessivos frente aos fármacos. Essas subpopulações constituíam um grupo homogêneo de células resistentes selecionadas em meio de cultura contendo concentração de FCL maior do que a do CIM, logo após uma primeira exposição ao fármaco (Mondon et al., 1999).

Descobriu-se que o padrão de heterorresistência não é afetado por mudanças de pH ou osmolaridade do meio de cultura, mas é influenciado por temperatura (Mondon et al., 1999). A partir desses achados, foram publicados procedimentos, extremamente, laboriosos para separar tais subpopulações (Sionov et al., 2009; Varma e Kwon-Chung, 2010). Com base nesses protocolos, este estudo adotou as condições do teste que foram respeitadas, em sua íntegra, de modo a validar os resultados obtidos. O uso da cepa-padrão H99, incluída no estudo pioneiro sobre heterorresistência, foi também utilizada e os resultados de CIM e de nível de heterorresistência foram alcançados, de modo sistemático, após pequenos ajustes necessários à validação da técnica (Mondon et al., 1999, Sionov et al., 2009, Varma e Kwon-Chung, 2010).

Na validação da técnica, as dificuldades na prova de NHF foram muitas, destacando-se aquelas relacionadas ao crescimento irregular das colônias no *spot test*, causando atraso na obtenção de resultados reprodutíveis. Outra questão foi relativa ao uso do acessório metálico (*replica plate*) para esse teste. A dispensação homogênea, inócua e no volume exato de suspensão celular na superfície do meio sólido demandou longo tempo de treinamento e, muitas vezes, o uso de pipeta automática multicanal, otimizou a execução dos testes, fornecendo resultados

homogêneos e corretos. Assim sendo, ambas as formas de dispensação podem ser empregadas, sem prejuízo da qualidade do *spot test*. Ainda, nesse teste, a fase de preparo de 4 suspensões para cada cepa, em concentrações distintas (de 10^6 a 10^3 células/mL) ajustadas em câmara de Neubauer, representou uma etapa demorada que diminuiu a eficiência do trabalho. As replicatas demandaram grandes volumes de meio de cultura para preparo de placas e a distribuição dos inóculos nesses recipientes impôs um ritmo de trabalho lento e cuidadoso, tendo em vista, o biorrisco que os agentes da criptococose representam para o manipulador. Diante desses fatos, recomenda-se a implantação do teste de heterorresistência, somente em laboratórios de referência que dispõe de recursos especializados.

A partir da validação do teste, foi iniciado o estudo com grupo de 100 cepas. Para tal, foi planejada inclusão de um grupo grande de cepas, abrangendo as 2 principais espécies causadoras da criptococose e de distintas origens, de modo a verificar a extensão do fenômeno de heterorresistência nesses agentes. A seleção das cepas para o estudo não considerou o perfil de suscetibilidade (CIM) ao FCL, desde que, há certo questionamento sobre o valor desse parâmetro para indicar resistência, pois ainda não há correlação confirmada entre dados *in vitro* de MIC e falha clínica (Rodero et al., 2000; Dannaoui et al., 2006). No entanto, a determinação de CIM foi necessária, neste estudo, como ponto de partida dos ensaios de heterorresistência. O CIM foi investigado por método de microdiluição por que é metodologia de referência para leveduras, de modo geral, e está padronizado para cepas de *Cryptococcus* spp., seja segundo normas norte-americanas CLSI ou européia AFST-EUCAST. O método AFST-EUCAST que recomenda inóculo mais concentrado (10^5 ufc/mL) do que o do CLSI (inóculo de 10^3 ufc/mL) permite maior crescimento e turvação, de modo, a antecipar os resultados. Além disso, o método europeu, obrigatoriamente, prevê uso de leitura automatizada por espectrofotômetro, levando à maior objetividade na leitura, rastreabilidade dos resultados, conferindo maior confiabilidade aos dados e, por esses motivos, foi o

escolhido para o estudo. Alternativos aos métodos de referência existem no mercado métodos comerciais adequados para a determinação de CIM. O método comercial Etest® é mais rápido e oferece maior facilidade de execução, em relação ao método de microdiluição. Porém, há necessidade de aquisição das fitas impregnadas com antifúngicos, enquanto, a microdiluição pode ser preparada no próprio laboratório, aumentando a acessibilidade ao método. Os resultados produzidos por Etest® são equivalentes aos obtidos nos métodos de referência, como confirmado neste estudo que reitera dados anteriores e, portanto, pode ser também usado para avaliar cepas de *Cryptococcus* spp. (Sewell et al, 1994; Matar et al., 2003). Vale ressaltar que, em ambos os métodos, referência ou comercial, ocorreu *trailing* que, para técnicos pouco experientes, podem levar a erros graves de falsa resistência, desde que ocorre crescimento residual, sem significância em concentrações acima do CIM.

Confirmando relatos anteriores com cepas de distintos países, todas as cepas brasileiras deste estudo foram capazes de crescer em concentrações de fluconazol acima do nível da CIM, reiterando a idéia de natureza intrínseca da heterorresistência (Sionov et al., 2009; Varma e Kwon-Chung, 2010). De grande importância para dimensão da extensão do fenômeno, cepas ambientais e clínicas, sejam de *C. neoformans* ou de *C. gattii* foram heterorresistentes ao FCL, assim como indicado em estudos prévios (Sionov et al., 2009, Varma et al., 2010).

Quanto à frequência de células com capacidade de heterorresistência, mensurada por contagem de ufc, verificou-se que nas 100 cepas de *Cryptococcus* spp. a maior ocorrência foi de 14% e a menor de 0,3%. Ou seja, todas as cepas foram heterorresistentes, mas com capacidades distintas, que variaram de alta a baixa, em concordância às taxas (<10%) descritas no único estudo disponível na literatura consultada (Sionov et al., 2009).

A investigação da relação entre resistência determinada por valores de CIM e heterorresistência por NHF, resultou em ausência de correlação estatística ($P < 0,05$) entre valores de CIM e NHF, em ambas as espécies e

independente da origem. Assim, a ausência de correlação entre o valor de CIM e NHF, tanto para *C. gattii* quanto para *C. neoformans*, independente da origem, clínica e ambiental, corroborou dados publicados anteriormente (Sionov et al., 2009; Varma e Kwon-Chung, 2010). Frente a esses achados pode-se sugerir que a determinação de NHF deva ser um teste a ser implementado nos laboratórios de referência como suporte ou alternativo ao teste de CIM para determinar a resistência ao FCL.

A análise de NHF por espécie, permitiu observar que para *C. gattii* a moda foi superior (64 mg/L) à de *C. neoformans* (32 mg/L). Esses dados sugerem que há diferenças entre as duas espécies, mas que de qualquer modo independente das espécies a adaptação é um processo dominante. Importante realçar que, em relação às médias dos valores de NHF, houve maior homogeneidade em resultados de cepas de *C. gattii* em relação às cepas de *C. neoformans*. Em teoria, esse resultado poderia ter implicância clínica desde que seriam necessárias maiores doses de FCL para *C. gattii*. Em relação ao NHF dos tipos moleculares verifica-se que tanto VNI quanto VNII de *C. neoformans*, sejam clínicos ou ambientais, ambos chegaram ao nível máximo de 64 mg/L de NHF, sendo que o número absoluto de cepas de VNI é superior. Assim sendo, a capacidade de gerar subpopulações heterorresistentes é semelhante nos 2 tipos moleculares mais frequentes em todo mundo. Para o grupo de *C. gattii*, de outro modo, não foi possível afirmar se houve diferença entre os tipos moleculares VGI e VGII, pois o número de cepas dentro de cada tipo é muito diferente, o que impediu qualquer cálculo estatístico.

De modo geral, o NHF encontrado para o grupo das 100 cepas foi considerado alto, ainda mais, se for levado em conta o fato que houve valores ≥ 16 mg/L em frequência expressiva (96%) nas cepas clínicas de *C. gattii*, com predominância de 32 mg/L e 64 mg/L. Essa porcentagem de cepa é maior do que aquela descrita (82-95%) por Varma e Kwon-Chung (2010). Em porcentagem um pouco inferior, 92% das cepas de *C. neoformans* de origem clínica, também, mostraram NHF alto (≥ 16 mg/L). Ainda que, em número de cepas distintas em cada grupo, pode-se concluir que as duas

principais espécies de criptococose têm capacidades distintas de resistir *in vitro* a altas concentrações de fluconazol, sendo *C. gattii*, neste trabalho, com maior capacidade.

Quanto à origem das cepas, dentro de cada espécie, o cálculo das médias de NHF para cepas clínicas de *C. neoformans*, mostrou que estas foram, significativamente, maiores (média 43,7mg/L) do que aquelas observadas para cepas ambientais (média 30,7mg/L) dessa espécie. Altos níveis de NHF (≥ 64 mg/L) ocorreram, tanto em cepas clínicas de *C. gattii* (média 58,9mg/L) do que ambientais (média 50,9mg/L) dessa espécie. Ainda que não se tenha informações clínicas sobre tratamento dos pacientes dos quais foram obtidas as cepas, pode-se inferir que esse fato tenha alguma relação com resistência adquirida pós-terapia com FCL. Estudos clínico-laboratoriais devem ser realizados para testar essa hipótese.

Quanto às cepas ambientais de *C. gattii* e *C. neoformans*, do mesmo modo como as clínicas, apresentaram alta capacidade de NHF ≥ 16 mg/L, sendo em *C. neoformans* maior (100%) do que em *C. gattii* (96%). De forma geral, o nível máximo avaliado de NHF (128 mg/L) foi atingido pelo grupo de cepas, independente da origem e espécie, ou seja *C. gattii* clínicos, *C. gattii* ambiental, *C. neoformans* clínicos ou *C. neoformans* ambiental. Se levado em conta o grupo de *C. gattii*, foi encontrado 4% de cepas que resistiram à concentração máxima usada para teste do NHF (128 mg/L), tanto ambientais, quanto clínicas. Interessante é o fato desse grupo de cepas ambientais, provenientes de excretas de animais e restos vegetais contidos em ocos de árvores situadas em zonas urbanas, terem baixa probabilidade de terem sido expostas ao FCL, ou outro triazol, possuírem capacidade de resistir *in vitro* a altos níveis desse fármaco. Talvez por estarem em condições *in vitro* ideais para seu desenvolvimento, sem pressão de competição existente no meio ambiente, a adaptação mais facilmente. Não se sabe se "*in vivo*", frente a fatores e mecanismos do sistema imune isso, também, possa ocorrer em grande número de cepas. Por outro lado, em pacientes imunodeprimidos a reação do hospedeiro é

deficiente e, provavelmente, a cepa infectante não deve apresentar dificuldade em desenvolver heterorresistência.

O estudo de adaptação das cepas a níveis acima do NHF de fluconazol mostrou que a extensa maioria, sendo exceção 5 cepas clínicas de *C. gattii*, 3 cepas clínicas de *C. neoformans*, 8 cepas ambientais de *C. gattii* e 6 cepas de *C. neoformans* ambientais, expressaram capacidade de crescer em altas concentrações em transferências sucessivas. Com valores um pouco acima daqueles observados nas cepas de *C. neoformans*, *C. gattii* demonstrou produção superior de subpopulações adaptáveis a maiores concentrações de fluconazol.

Em relação à origem das cepas, verificou-se maior capacidade adaptativa nas cepas clínicas, em porcentagens semelhantes para *C. neoformans* (88%) e *C. gattii* (80%), do que em cepas ambientais, sendo superior em *C. neoformans* (76%), em relação a *C. gattii* (68%). Esses achados reforçam a possível relevância clínica da capacidade adaptativa do maior agente de criptococose em nosso país, *C. neoformans*. A avaliação do impacto de longas terapias na promoção do processo adaptativo a maiores concentrações de FCL, será possível se forem implementados estudos clínicos.

A base molecular do fenômeno adaptativo de subpopulações de cepas de *C. gattii* em nosso estudo deve ter sido o mesmo fenômeno para *C. neoformans*, relatado de modo inédito por Sionov et al. (2009). Para a espécie *C. neoformans* o mecanismo de adaptação está parcialmente desvendado (Sionov et al., 2010; Ngamskulrunroj et al., 2012a; Ngamskulrunroj et al., 2012b, Sionov et al., 2013). O fenômeno observado em *C. neoformans* como heterorresistência é distinto de muitos outros processos de resistências (Sionov et al., 2009; Sionov et al., 2010; Varma e Kwon-Chung, 2010; Sionov et al., 2013). A dinâmica do mecanismo de heterorresistência é advinda da plasticidade cromossômica induzida por estresse e formação de aneuploidia. Sionov et al. (2010) relataram, pela primeira vez, que na maioria das cepas de *C. neoformans* que apresentaram subpopulações que resistiram a níveis muito altos FCL (≥ 64 mg/L) ocorreu

aneuploidia dos cromossomos Chr4 e Chr1. Ocorre, de fato, duplicação de cromossomos, em particular, cromossomas 1 e 4, como confirmado posteriormente e, ainda outros durante a fase adaptativa (Ngamskulrungraj et al., 2012). Não foram encontrados dados na literatura da relação de aneuploidia do Chr4 e Chr1 e heterorresistência em cepas de *C. gattii*, até a finalização desse volume.

Se for analisada a capacidade de adaptação levando-se em conta o NHF, foi observado que, 4 (16%) dos isolados clínicos de *C. gattii* adaptaram-se a 2 níveis acima do seu NHF, outros 16 (64%) mostraram capacidade de se adaptarem a um nível acima (p.ex., de 64mg/L a 128 mg/L) e os 5 (20%) restantes, de modo surpreendente, não mostraram habilidade de adaptação. Quanto às cepas clínicas de *C. neoformans*, constatou-se que 5 (20%) cepas conseguiram se adaptar a 3 níveis acima do seu NHF (de 8mg/L a 64mg/L; 32 mg/L a 128 mg/L; 64mg/L a 256 mg/L), 6 (24%) cepas conseguiram adaptar a 2 níveis acima, outras 11 (44%) adaptaram-se a um nível acima e 3 cepas (12%) não desenvolveu capacidade de adaptação. Esse comportamento, verificado na mesma proporção de cepas clínicas, tanto de *C. gattii* quanto de *C. neoformans* revela a incapacidade de gerar subpopulações altamente heterorresistentes, em apenas grupos pequenos de cepas clínicas. Isso confirma a necessidade de estudos *in vivo* para correlacionar o efeito clínico e a capacidade adaptativa que é cepa-dependente.

Os ensaios de adaptação aplicado às cepas ambientais, permitiram observar que 13 (52%) de *C. gattii* conseguiram crescer em um nível de concentração acima de seu NHF, 3 cepas (12%) alcançaram 2 níveis acima, 1 cepa (4%) alcançou 3 níveis acima e 8 (32%) não se adaptaram. As cepas ambientais de *C. neoformans* mostraram capacidade de se desenvolver em um nível acima do seu valor de NHF em 14 (56%), em 2 níveis acima do seu valor em 4 (16%), em 3 níveis acima em 1(4%) e em 6 cepas não foi comprovada capacidade adaptativa. Para cepas ambientais, os dados foram concordantes com o único estudo disponível na literatura consultada, demonstrando a facilidade desse grupo de cepas, independente da espécie,

em expressar mecanismos de heterorresistência frente a estímulos externos, neste caso, provenientes da exposição a FCL (Sionov et al., 2009).

As subpopulações, altamente, heterorresistentes foram avaliadas quanto à estabilidade do fenômeno e na verificação do número de transferências necessárias ao retorno do NHF nessas colônias, foi verificado que não menos do que 9 passagens em meio isento de fármaco são requeridas para a involução do fenômeno. Os dois únicos estudos que descrevem esse procedimento também verificaram a manutenção do fenômeno por longos períodos de tempo. De modo surpreendente, prazo de até 45 dias foi comprovado para o retorno da cepa aos níveis basais de heterorresistência (Sionov et al., 2009; Varma e Kwon-Chung, 2010). Para avaliar a estabilidade da heterorresistência ao FCL todas as cepas com NHF ≥ 16 mg/L entre as de *C. gattii* de origem clínica que resistiram a 64 mg/L de fluconazol, ou acima deste valor, foram avaliadas resultando em longa estabilidade do fenômeno. A estabilidade da heterorresistência ao FCL não é exclusiva do gênero *Cryptococcus*. Células de isolados de *C. albicans*, que também apresentam heterorresistência, tornavam-se resistentes *in vitro* ao fármaco após 15 a 20 dias e *in vivo* apenas após 20 dias de exposição ao fármaco. A resistência era instável, em ambos os casos, com recuperação dos fenótipos sensíveis em 100% das células, assim que o fármaco foi removido do meio de cultura (Calvet et al., 1998; Marr et al., 1998). A estabilidade da heterorresistência, avaliada *in vitro*, pode ter implicações graves na clínica médica, devido aos longos tratamentos a que são submetidos pacientes com criptococose do sistema nervoso central associada à aids.

Cryptococcus neoformans e *C. gattii* são patógenos oportunistas adquiridos no meio ambiente, através da inalação de partículas infectantes. No meio ambiente, esses agentes estão expostos aos mais diversos estímulos físicos, químicos e ameaças microbiológicas que induzem alterações adaptativas no genoma para sua sobrevivência. Em nichos naturais, essas espécies demonstram facilidade em se amoldarem a distintas situações decorrentes da interação com agentes predatórios, de

modo a garantir sua preservação e multiplicação. A extensão e mecanismos dessa plasticidade merecem ser mais profundamente investigados, com vistas a detectar pontos críticos que podem ser alvos de controle para manejo da doença criptocócica. A avaliação em cepas clínicas e ambientais desses patógenos do fenômeno de heterorresistência poderá trazer subsídios para alcançar tais objetivos.

6. CONCLUSÕES

- O fenômeno de heterorresistência ao fluconazol ocorreu em todas as cepas, ambientais e clínicas de *C. gattii* e de *C. neoformans*, reiterando a citação da sua natureza intrínseca, levando à suposição de que todas as cepas podem desenvolver resistência adquirida exposicional a esse fármaco; ainda que, apenas baixa porcentagem de células (<14%) de cada cepa demonstrou ter capacidade desse processo, estas tem capacidade de formar cepas homogêneas quanto à heterorresistência;
- A heterorresistência foi cepa-específica, não dependendo da espécie e tipo molecular, mostrando que cada infecção pode ter prognóstico distinto, segundo o perfil de suscetibilidade do agente etiológico; a heterorresistência *in vitro* foi maior em cepas de origem clínica, em relação às de meio ambiente, motivando desenvolvimento de estudos *in vivo* com tais cepas, para dimensionar o impacto no curso da criptococose;
- Subpopulações altamente resistentes, adaptadas a crescer acima do nível de heterorresistência, foram encontradas na maioria dos isolados; o limite analisado no estudo (256 mg/L) é superior à dose sérica máxima de fluconazol, alertando para possíveis implicações terapêuticas;
- A estabilidade do fenômeno de heterorresistência foi alta e independente do valor de NHF, indicando que cepas que suportam altas concentrações de fluconazol, dificilmente retornam ao nível de suscetibilidade original; esse achado poderia explicar as recidivas clínicas da criptococose observadas após suspensão da terapia com fluconazol;

- A suscetibilidade ao fluconazol foi baixa em metade das cepas de origem ambiental, alertando sobre a existência de heterorresistência no meio ambiente;
- O nível de heterorresistência não se relacionou ao valor de CIM de fluconazol, reforçando a existência de mecanismos distintos de resistência ao fármaco; a técnica de avaliação da heterorresistência ao fluconazol mostrou-se eficiente, com boa reprodutibilidade, mas devido à sua complexidade deve ser implantada somente em laboratórios de referência, como um teste complementar ou alternativo ao CIM. Estudos de correlação clínico-laboratoriais deverão determinar um *breakpoint* para o teste.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aller AI , Martin-Mazuelos E, Lozano F, Gomez-Mateos J, Steele-Moore L, Holloway WJ, Gutiérrez MJ, Recio FJ, Espinel-ingroff A. Correlation of fluconazole CIMs with clinical outcome infection. *Antimicrobial Agents Chemother.* 2000; 44 (6): 1544–1548.

AFST-EUCAST - Antifungal susceptibility testing – Europe Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2012. [acesso em 3 de jan de 2015]. Disponível em www.eucast.org.

Baltazar LM, Ribeiro MA. Primeiro isolamento ambiental de *Cryptococcus gattii* no Estado do Espírito Santo. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2008; 41(5): 449-453.

Barry AL, Pfaller MA, Brown SD, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, Knapp C, Rennie RP, Rex JH, Rinaldi MG. Quality control limits for broth microdilution susceptibility tests of ten antifungal agents. *J Clin Microbiol.* 2000; 38(9): 3457-3459.

Brito EOD. Suscetibilidade frente a drogas antifúngicas de cepas de *Cryptococcus neoformans* de origem ambiental e clínica, isoladas no Estado de Minas Gerais. [dissertação]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais),2006.

Byrnes EJ, Bildfell R, Frank SA, Mitchell TG, Marr K, Heitman J. Molecular evidence that the Vancouver Island *Cryptococcus gattii* outbreak has expanded into the UnitedStates Pacific Northwest. *J. Infect. Dis.* 2009; 199(7): 1081-1086.

Calvet HM, Yeaman MR, Filler SG. Reversible Fluconazole Resistance in *Candida albicans*: a Potential In Vitro Model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 1997, 41(3); 535–539.

Chakrabarti A, Jatana M, Kumar P, Chata L, Kaushal A, Padhye AA. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from *Eucalyptus camaldulensis* in India. J. Clin. Microbiol. 1997; 35(12): 3340-3342.

Chen S, Sorrell T, Nimmo G, Speed B, Currie B, Ellis D, Marriott D, Pfeiffer T, Parr D, Byth K and the Australasian Cryptococcal Study Group. Epidemiology and Host- and Variety-Dependent Characteristics of Infection Due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zealand. Clinical Infectious Diseases. 2000; 31: 499–508.

Clinical and laboratory Standards Institute (CLSI). 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard M27-A3, 3.ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

Costa SPSE, Lazéra MS, Santos WRA, Morales BP, Bezerra CCF, Nishikawa MM, Barbosa GG, Trilles L, Nascimento JLM, Wanke B. First isolation of *Cryptococcus gattii* molecular type VGII and *Cryptococcus neoformans* molecular type VNI from environmental sources in the city of Belém, Pará, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2009; 104(4): 662-664.

Datta K, Barlett KH, Baer R, Byrnes E, Galanis E, Heitman J, Hoang L, Leslie MJ, Macdougall L, Magill SS, Morshed MG, Marr KA. Spread of *Cryptococcus gattii* into Pacific Northwest region of the United States. Emerg. Infect. Dis. 2009; 15(8): 1185-1191.

Dannaoui E, Abdul M, Arpin M, 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: 2464-2470.

Dias ALT, Matsumoto FE, Melhem MSC, Silva EG, Auler ME, Siqueira AM, Paula CR. Comparative analysis of Etest and broth microdilution method (AFST-EUCAST) for trends in antifungal drug susceptibility testing of Brazilian *Cryptococcus neoformans* isolates. J. Med. Microbiol. 2006; 55: 1693-1699.

Dixit A, Carrol SF, Qureshi ST. *Cryptococcus gattii*: An emerging cause of fungal disease in North America. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. 2009; 2009: 1-13.

Ellis DH, Pfeiffer TJ. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28(7): 1642-1644.

Fell JW, Boekhout T, Fonseca A, Scorzetti G, Statzell-Tallman A. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2000; 50 (3): 1351-1371.

Ferreira-Paim K, Ferreira TB, Andrade-Silva L, Mora DJ, Springer DJ, Heitman J, Fonseca FM, Matos D, Melhem MSC, Silva-Vergara ML. Phylogenetic Analysis of Phenotypically Characterized *Cryptococcus laurentii* Isolates Reveals High Frequency of Cryptic Species. *PLoS ONE*. 2014; 9(9): 1-16.

Filiú WFO, Wanke B, Agüena SM, Vilela VO, Macedo RCL, Lazéra, M. Avian habitats as sources of *Cryptococcus neoformans* in the city of Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2002; 35(6): 591-595.

Fimua Cryptococcosis Network. European Confederation of Medical Mycology (ECMM) prospective survey of Cryptococcosis: Report from Italy. *Medical Mycology*. 2002; 40:507–517.

Gillece JD, Schupp JM, Balajee SA, Harris J, Pearson T, Yan Y, Keim P, Debess E, Marsden N, Wohrle R, Engelthaler DM, Lockhart SR. Whole genome sequence analysis of *Cryptococcus gattii* from the Pacific Northwest reveals unexpected diversity. *PLoS ONE*. 2011; 6(12): 1-7.

Goulart LS. Genes diferencialmente expressos por *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* durante a infecção de macrófagos. [Tese]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2009

Hagen F, Illnait-zaragozi M-T, Barlett KH, Swinne D, Gerrtsen E, Klaassen CHW, Boekhout T, Meis JF. *In vitro* antifungal susceptibilities and amplified fragment length polymorphism genotyping of a worldwide collection of 350 clinical, veterinary, and environmental *Cryptococcus gattii* isolates. *Antimicrobiol. Agents Chemother.* 2010; 54(12): 5139-5145.

Harris J, Lockhart SR, Chiller T. *Cryptococcus gattii*: where do we go from here?. *Med. Mycol.* 2011b; 1-17.

Harris J, Lockhart SR, Debess E, Marsden-Haug N, Goldoft M, Wohrle R, Lee S, Smelser C, Park B, Chiller T. *Cryptococcus gattii* in the United States: clinical aspects of infection with an emerging pathogen. *Clin. Inf. Dis.* 2011a; 53(12): 1188-1195.

Instituto de metrologia (INMETRO). DOQ-CGCRE-008 – Revisão 04 – Jul/2011. Orientação sobre validação de métodos analíticos. Documento de caráter orientativo. 2011. [acesso em 10 abr 2013]. Disponível em inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_04.pdf.

Khawcharoenporn__T, Apisarnthanarak A, Mundy LM. Non-*neoformans* cryptococcal infections: a systematic review. *Infection.* 2007; 35(2): 51-58.

Kidd SE, Chow Y, Mak S, Bach PJ, Chen H, Hingston AO, Kronstad JW, Barlett KH. Characterization of environmental sources of the human and animal pathogen *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and the Pacific Northwest of the United States. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007; 73(5): 1433-1443.

Kidd SE, Hagen F, Tschaske RL, Huynh M, Barlett KH, Fyfe M, Macdougall L, Boekhout T, Kwon-Chung KJ, Meyer W. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2004; 101(49): 17258-17263.

Klein KR, Hall L, Deml SM, Rysavy JM, Wohlfiel SL, Wengenack NL. Identification of *Cryptococcus gattii* by use of L-Canavanine Glycine Bromothymol Blue medium and DNA sequencing. *J. Clin. Microbiol.* 2009; 47(11): 3669-3672.

Kordossis T, Avlami A, Velegraki A, Stefanou I, Georgakopoulos G, Papalambrou C, Legakis NJ. First report of *Cryptococcus laurentii* meningitis and a fatal case of *Cryptococcus albidus* cryptococemia in AIDS patients.

Kown-Chung KJ, Varma A. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? FEMS Yeast Res. 2006; 6(4): 574-587.

Lester SJ, Malik R, Bartlett KH, Duncan CG. Cryptococcosis: update and emergence of *Cryptococcus gattii*. Vet. Clin. Pathol. 2011; 40(1): 4-17.

Marr KA, Lyons CN, Rustad T, Bowden RA, White TC. Rapid, Transient Fluconazole Resistance in *Candida albicans* Is Associated with Increased mRNA Levels of CDR. Antimicrobial Agents and chemotherapy. 1998, 42(10); 2584–2589.

Marr KA. *Cryptococcus gattii*: the tip of the iceberg. Clin. Inf. Dis. 2011; 53(12): 1196-1198.

Martins LMS, Wanke B, Lazéra MS, Trilles L, Barbosa GG, Macedo RCL, Cavalcanti MAS, Eulálio KS, Castro JAF, Silva AS, Nascimento FF, Gouveia VA, Monte SJH. Genotypes of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* as agents as endemic cryptococcosis in Teresina, Piauí (northeastern Brazil). Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2011; 106(6): 725-730.

Matar MJ, Matar L, Matar VL, Rodriguez JR., Rodriguez E, Rex JH. Correlation between E-Test, disk diffusion, and microdilution methods for antifungal susceptibility testing of fluconazole and voriconazole. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2003; 47(5): 1647–1651.

Matos CS, Andrade AS, Oliveira NS, Barros TF. Microbiological characteristics of clinical isolates of *Cryptococcus* spp. in Bahia, Brazil: molecular types and antifungal susceptibilities. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2012.

Matsumoto MT. Tipagem molecular, perfis de sensibilidade e caracterização de transcritos diferencialmente expressos durante a infecção de

Cryptococcus neoformans. [tese]. Araraquara: Universidade Estadual Paulista; 2006.

Med Mycol. 1998; 36(5): 335-339. Meyer W, Castañeda A, Jackson S, Huynh M, Castañeda E, Iberoamerican Cryptococcal Study Group. Molecular Typing of Ibero American *Cryptococcus neoformans* isolates. Emerg. Inf. Dis. 2003; 9(2): 189-195.

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

Mondon P, Petter R, Amalfitano G, Luzzati R, Concia E, Polacheck I, Kwon-Chung KJ. Heteroresistance to fluconazole and voriconazole in *Cryptococcus neoformans*. Antimicrob Agents Chemother. 1999; 43 (8):1856-1861.

Moretti ML, Resende MR, Lazéra MS, Colombo AL, Shikanai-yasuda MA. Consenso em criptococose – 2008. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2008; 41(5): 524-544.

Ngamskulrungrroj P, Chang Y, Hansen B, Bugge C, Fischer E, Kwon-Chung KJ. Characterization of the Chromosome 4 Genes That Affect Fluconazole-Induced Disomy Formation in *Cryptococcus neoformans*. PLoS One. 2012a; 7(3): e3302.

Ngamskulrungrroj P, Chang Y, Hansen B, Bugge Cliff, Fischer E, Kwon-Chung, KJ. *Cryptococcus neoformans* Yop1, an endoplasmic reticulum curvature-stabilizing protein, participates with Sey1 in influencing fluconazole-induced disomy formation. FEMS Yeast Res. 2012b; 12: 748–754

Nucci M, Queiroz-Telles F, Tobón AM, Restrepo A, Colombo AL. Epidemiology of opportunistic fungal infectious in Latin America. Clin. Inf. Dis. 2010; 51(5): 561-570.

Pappalardo MCSM, Melhem MSC. Cryptococcosis: a review of the brazilian experience for the disease. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo. 2003; 45(6): 299-305.

Pappas PG. Cryptococcal Infections in non-hiv-infected patients. Transactions of the American clinical and climatological association [periódico online] 2013; 124: 61-79.

Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM. Estimation of current global burden of cryptococcal meningitis among person living with HIV/AIDS. 2009; 23: 525-530.

Paschoal RC, Hrata MH, Hirata RC, Melhem MSC, Dias ALT, Paula CR. Neurocryptococcosis: diagnosis by PCR method. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo. 2004; 46(4): 203-207.

Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, Goldman DL, Graybill JR, Hamill RJ, Harrison TS, Larsen RA, Lorthlary O, Nguyen M-H, Pappas PG, Powderly WG, Singh N, Sobel JD, Sorrell TC. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the Infectious Diseases Society of America. Clin. Inf. Dis. 2010; 50: 291-322.

Petrou MA, Shanson DC. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* by the NCCLS microdilution and Etest methods using five defined media. J. Antimicrobiol. Chemoter. 2000; 46(5): 815-818.

Pfaller MA, Castanheira M, Diekema DJ, Messer MA, Moet GJ, Jones RN. Comparison of European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) and Etest methods with the CLSI broth microdilution method for Echinocandin susceptibility testing of *Candida* species. J. Clin. Microbiol. 2010; 48(5): 1592-1599.

Rodero L, Cordoba S, Cahn P, Soria M, Lucarini M, Davel G, et al., Timed-kill curves for *Cryptococcus neoformans* isolated from patients with AIDS. Medical Mycology. 2000-b; 38: 201–207.

Rodriguez-Tudela JL, Alcazar-Fuoli L, Cuesta I, Alastruey-Izquierdo A, Monzon A, Mellado E, Cuenca-Estrella M. Clinical relevance of resistance to antifungals. *Int J Antimicrob Agents*. 2008; 32 (2): 111-113.

Saha DC, Xess I, Biswas A, Bhowmik DM, Padma MV. Detection of *Cryptococcus* by conventional, serological and molecular methods. *J. Med. Microb*. 2009; 58: 1098-1105.

Saha DC, Xess I, Jain N. Evaluation of conventional & serological methods for rapid diagnosis of cryptococcosis. *Indian J. Med. Res*. 2008; 483-488.

Sanguinetti M, Posteraro B, Sorda M, Torelli R, Fiori B, Santangelo R, Delogu G, Fadda G. Role of *AFR1*, an ABC transporter-encoding gene, in the *in vivo* response to fluconazole and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun*. 2006; 74(2): 1352-1359.

Sar B, Monchy D, Vann M, Keo C, Sarthou JL, Buisson Y. Increasing *in vitro* resistance to fluconazole in *Cryptococcus neoformans* Cambodian isolates: April 2000 to March 2002. *J. Antimicrob. Chemother*. 2004; 54(2): 563-565.

Segal BH et al. Defining responses to therapy and study outcomes in clinical trials of invasive fungal diseases: mycoses study group and European organization for research and treatment of cancer consensus criteria. *Clin. Inf. Dis*. 2008; 47(5): 674-683.

Sewell DL, Pfaller MA, Barry AL. Comparison of Broth Macro-dilution, Broth Micro-dilution, and E Test Antifungal Susceptibility Tests for Fluconazole. *Journal of Clinical Microbiology*. 1994; 32(9): 2099-2102.

Sidrim JJC, Rocha MFG. *Micologia Médica à luz de autores contemporâneas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

Silva DC, Martins MA, Szeszs MW, Bonfietti LX, Matos D, Melhem MSC. Susceptibility to antifungal agents and genotypes of Brazilian clinical and environmental *Cryptococcus gattii* strains. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2012; 72: 332 –339.

Sionov E, Chang YC, Garraffo HM, Kwon-Chung KJ. Heteroresistance to Fluconazole in *Cryptococcus neoformans* is intrinsic and associated with virulence. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009; 53(7): 2804-2815.

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): 1-13.

Sionov E, Chang YC, Kwon-Chung JK. Azole Heteroresistance in *Cryptococcus* in Mouse Brain during Fluconazole Treatment Clones with Chromosomal Disomy in the neoformans: Emergence of Resistant. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013; 57(10): 5127-5130.

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

Srikanta D, Santiago-Tirado FH, Doering, TL. *Cryptococcus neoformans*: Historical curiosity to modern pathogen. *Yeast.* 2014; 31(2): 47–60.

Takahara DT. Isolamento e identificação de *Cryptococcus neoformans* a partir de excretas de pombos provenientes de locais públicos e residenciais de Cuiabá e Várzea Grande – MT. [dissertação]. Cuiabá: Universidade Federal de Mato Grosso, 2011.

Varma A, Kwon-Chung KJ. Heteroresistance of *Cryptococcus gattii* to Fluconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010; 54(6): 2303-2311.

Williamson PR. Laccase an melanin in the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *Front. Biosci.* 1997; 2: 99-107.

Xu J, Onyewu C, Yoell HJ, Ali RY, Vilgalys RJ, Mitchell TG. Dynamic and heterogeneous mutations to fluconazole resistance in *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001; 45(2): 420-427.

ANEXOS

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA****Título da Pesquisa:** Heterorresistência ao fluconazol em agente de criptococose**Pesquisador:** MARCIA DE SOUZA CARVALHO MELHEM**Área Temática:****Versão:** 1**CAAE:** 36600414.0.0000.0059**Instituição Proponente:** Instituto Adolfo Lutz**Patrocinador Principal:** Instituto Adolfo Lutz
FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO**DADOS DO PARECER****Número do Parecer:** 880.857**Data da Relatoria:** 16/10/2014**Apresentação do Projeto:**

O projeto visa avaliar o nível de heterorresistência ao fluconazol, do grupo dos triazóis, empregado como terapia de longo prazo na clínica médica em agentes de criptococose, e confirmar se essa ocorrência é uma resposta adaptativa reversível à presença do fármaco. A criptococose é causada por leveduras capsuladas do gênero *Cryptococcus* que abrange duas espécies principais *C. neoformans* e *C. gattii*, sendo que as cepas de *C. gattii* têm alto potencial para desenvolver resistência ao fluconazol in vitro, podendo explicar as falhas terapêuticas e recidivas, observadas em pacientes afetados por esta doença sob tratamento antifúngico. Cepas de *C. gattii* parecem ser mais virulentas, uma vez que infectam mais comumente pacientes imunocompetentes, do que cepas de *C. neoformans*. Interessante é o fato de que subpopulações de células podem ter crescimento variado in vitro frente a determinada concentração de fluconazol definido pelo seu perfil de heterorresistência ao fármaco. Poucos dados norte-americanos demonstram que todas as estirpes ambientais e clínicas testados de *C. gattii* e *C. neoformans* manifestam heterorresistência ao fluconazol. Não há dados disponíveis, segundo literatura consultada, relacionados a isolados de *Cryptococcus* oriundos da América Latina. Para avaliação da heterorresistência serão testadas 50 cepas de *C. gattii* e 50 de *C. neoformans*, sendo a metade de cada grupo cepas clínicas isoladas de LCR de pacientes com meningite criptococcica, e a outra

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90**Bairro:** Cerqueira César**CEP:** 01.246-902**UF:** SP**Município:** SÃO PAULO**Telefone:** (11)3068-2859**Fax:** (11)3085-3505**E-mail:** cepial@ial.sp.gov.br

Continuação do Parecer: 880.857

metade de cepas ambientais, e os resultados obtidos serão comparados entre si. Todas as amostras utilizadas serão provenientes da micoteca do Núcleo de Micologia do Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, sendo que todas foram tipadas molecularmente com cepas-padrão, estas fornecidas por Dr. Wieland Meyer da Universidade de Sidney, Austrália. Inicialmente, a concentração mínima inibitória (MIC) de fluconazol será determinada usando E-test (bioMérieux, Fr) para todas as 100 cepas. O nível de heterorresistência ao fluconazol para cada isolado será determinada utilizando-se suspensões de células de cada cepa, em solução salina estéril, plaqueadas em ágar YPD contendo várias concentrações de fluconazol (4 a 128 mg/L). O padrão de crescimento será lido após 72h de incubação a 30°C. Os isolados serão considerados como, possivelmente, heterorresistente se apenas uma fração da população crescer em placa contendo concentração maior do que a concentração que permite 100% de crescimento de células viáveis.

Os clones heterorresistentes serão isolados e inoculados em ágar YPD contendo concentrações crescentes (ao dobro) de fluconazol (até 256 mg/L). As placas de cada repique serão incubadas a 30°C durante 72 a 96h. Com essa etapa, será analisada a capacidade da subpopulação resistente de cada isolado em se adaptar, de forma gradual, a maiores concentrações de fluconazol. Finalmente, será verificado se a heterorresistência ao fluconazol é transitória e como as cepas tornaram-se suscetíveis depois de serem repicadas em série de placas sem adição de fluconazol.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo primário

- Avaliar o fenômeno de heterorresistência ao fluconazol (FLC) em cepas brasileiras, clínicas e ambientais, de *C. gattii* e *C. neoformans* com vistas, a dar subsídios para estudos clínicos sobre prognóstico de evolução clínica na criptococose de sistema nervoso central.

Objetivos secundários

- Determinar os valores da concentração inibitória mínima (MIC - minimal inhibition concentration) de fluconazol para cepas de *C. gattii* e *C. neoformans* pelo método E-TEST®;
- Validar a heterorresistência ao fluconazol para agentes da criptococose, com vistas à implantação do teste na rotina do Núcleo de Micologia do Instituto Adolfo Lutz (IAL);
- Investigar, qualitativamente e quantitativamente, a ocorrência do fenômeno de heterorresistência ao fluconazol em 100 cepas dos agentes de criptococose;
- Analisar a estabilidade da heterorresistência ao fluconazol das cepas heterorresistentes.

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-902

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3068-2859

Fax: (11)3085-3505

E-mail: cepial@ial.sp.gov.br

Continuação do Parecer: 880.857

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Benefícios

O projeto irá contribuir para promover melhorias no tratamento medicamentoso (fármaco: fluconazol) de pacientes com neurocriptococose.

Riscos

Não haverá risco direto ao participante da pesquisa, uma vez que trata-se de estudo com cepas isoladas e depositadas na instituição, parte delas oriundas de material biológico humano já colhido e analisado para fins diagnósticos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto é de grande importância para o prognóstico e evolução clínica de pacientes com neurocriptococose, pois visa determinar a concentração inibitória mínima de fluconazol pelo método E-TEST para as principais cepas de *Cryptococcus* evidenciados na clínica médica. Todas as análises propostas no projeto serão realizadas "in vitro" não se servindo de participante humano ou de seu material biológico. Desta forma, o projeto promove conhecimentos fundamentais dentro de princípios técnicos adequados ao propósito.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

1. Folha de rosto

A Folha de rosto para pesquisa envolvendo seres humanos foi devidamente preenchida e assinada por Dr. Hélio Hehl Caiaffa Filho, diretor geral do Instituto Adolfo Lutz, instituição proponente, e Marcia de Souza Carvalho Melhem, pesquisadora responsável.

2. TCLE

A solicitação de dispensa do TCLE foi devidamente justificada e aceita devido às características da pesquisa; não há participação direta do participante da pesquisa e também não fará uso de material biológico humano armazenado, utilizando amostras de cepas bacterianas provenientes da micoteca do Instituto Adolfo Lutz.

3. O cronograma do projeto foi apresentado de forma clara e objetiva, com possibilidade de realização das atividades dentro dos prazos propostos.

4. Aprovação quanto ao mérito científico pelo Conselho Técnico Científico do IAL, corroborada pela

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-902

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3068-2859

Fax: (11)3085-3505

E-mail: cepial@ial.sp.gov.br

Continuação do Parecer: 880.857

diretoria geral da instituição.

Documento de acordo, anexado ao protocolo de pesquisa na Plataforma Brasil pelo CEPIAL em 21/11/2014.

Recomendações:

1. Anexar ao protocolo da Plataforma Brasil o documento de ciência de utilização das cepas provenientes da micoteca do Núcleo de Micologia do Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz.
2. As cepas isoladas e identificadas e com relevância científica devem ser depositadas e catalogadas no Núcleo de Coleções de Micro-organismos do Instituto Adolfo Lutz.
3. Rever o item "Haverá retenção de amostras para armazenamento em banco? Sim" em PB Informações básicas do projeto; este item refere-se ao material biológico humano, o qual não será armazenado, e sim poderão ser armazenadas as cepas bacterianas isoladas.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O protocolo de pesquisa está devidamente instruído conforme as diretrizes estabelecidas nas normas de ética em pesquisa e em consonância com a diretriz institucional da política de pesquisa científica no Instituto Adolfo Lutz.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O protocolo de pesquisa foi aprovado do ponto de vista ético à luz da Resolução CNS 466/2012 pelo colegiado do CEPIAL em reunião ordinária de 13 de novembro de 2014.

Em conformidade com a Resolução CNS 466 de 12/12/2012, o pesquisador responsável deverá cumprir o item transcrito integralmente a seguir.

IX - Do pesquisador responsável

XI.1 - A responsabilidade do pesquisador é indelegável e indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais.

XI.2 - Cabe ao pesquisador:

- a) apresentar o protocolo devidamente instruído ao CEP ou à CONEP, aguardando a decisão de aprovação ética, antes de iniciar a pesquisa;
- b) elaborar o Termo de Consentimento Livre e

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-902

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3068-2859

Fax: (11)3085-3505

E-mail: cepial@ial.sp.gov.br

Continuação do Parecer: 880.857

Esclarecido; c) desenvolver o projeto conforme delineado; d) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final; e) apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento; f) manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa; g) encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico integrante do projeto; e h) justificar fundamentadamente, perante o CEP ou a CONEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Os relatórios deverão ser adicionados ao protocolo de pesquisa na Plataforma Brasil para análise do CEPIAL a cada seis meses a partir do início da pesquisa.

SAO PAULO, 21 de Novembro de 2014

Assinado por:
Luz Marina Trujillo
(Coordenador)

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-902

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3068-2859

Fax: (11)3085-3505

E-mail: cepial@ial.sp.gov.br

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Heterorresistência ao fluconazol em agente de criptococose

Pesquisador: MARCIA DE SOUZA CARVALHO MELHEM

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 36600414.0.3001.5262

Instituição Proponente: Instituto Adolfo Lutz

Patrocinador Principal: Instituto Adolfo Lutz
FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 908.837

Data da Relatoria: 07/12/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto aprovado pelo CEP do Instituto Adolfo Lutz/SES em 21/11/2014 - Parecer 880.857.

A criptococose é causada por leveduras capsuladas do gênero *Cryptococcus* que abrange duas espécies principais: *C. neoformans* e *C. gattii*. Alguns estudos indicam que *Cryptococcus*, em particular cepas de *C. gattii*, tem alto potencial para desenvolver resistência a fluconazol *in vitro*, o que poderia explicar as falhas terapêuticas e recidivas, observadas com frequência, em pacientes afetados por esta doença sob tratamento

antifúngico. Cepas de *C. gattii* parecem ser mais virulentas, uma vez que infectam mais comumente pacientes imunocompetentes, do que cepas de *C. neoformans* e estudos com animais corroboram esta idéia. Os triazóis são a maior classe de drogas antifúngicas usadas na clínica médica e fluconazol é empregado como terapia de longo prazo, para manejo dos casos de criptococose associados à AIDS, o que pode levar ao aparecimento de cepas resistentes. Interessante é o fato de que subpopulações de células podem ter crescimento variado *in vitro* frente a determinada concentração de fluconazol definido pelo seu perfil de heterorresistência à droga. Poucos dados norte-americanos demonstram que todas as estirpes ambientais e clínicos testados de *C. gattii* e *C. neoformans* manifestam heterorresistência ao fluconazol. Não há dados

Endereço: Avenida Brasil 4365

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.045-900

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3865-9585

E-mail: cep@ipec.fiocruz.br

Continuação do Parecer: 908.837

disponíveis, segundo literatura consultada, relacionados a isolados de *Cryptococcus orlundos* da América Latina. O objetivo, neste estudo, é investigar o nível de heterorresistência ao fluconazol em agentes de criptococose. O nível de heterorresistência de 50 cepas clínicas de *C. gattii* será comparado ao de 50 cepas clínicas de *C. neoformans*. As amostras são da micoteca do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo e foram, previamente, tipadas molecularmente com cepas-padrão (fornecidas por Dr. Wieland Meyer).

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Estudar o fenômeno de heterorresistência ao fluconazol (FLC) em cepas brasileiras, clínicas e ambientais, de *C. gattii* e *C. neoformans* com vistas, a dar subsídios para estudos clínicos sobre prognóstico de evolução clínica na criptococose de sistema nervoso central.

Objetivos Secundários: Determinar os valores da concentração inibitória mínima (MIC - minimal inhibition concentration) de fluconazol para cepas de *C. gattii* e *C.*

neoformans pelo método E-TEST®; validar a de heterorresistência ao fluconazol para agentes da criptococose, com vistas à implantação do teste na rotina do Núcleo de Micologia do Instituto Adolfo Lutz (IAL); Investigar, qualitativamente e quantitativamente, a ocorrência do fenômeno de heterorresistência ao fluconazol em 100 cepas dos agentes de criptococose e analisar a estabilidade da heterorresistência ao fluconazol das cepas heterorresistentes.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Perda das Cepas da Coleção por contaminação de agentes fúngicos filamentosos.

Benefícios: De acordo com Moretti et al. (2008), a criptococose é uma infecção fúngica sistêmica bastante importante, com mortalidade estimada em 10% nos países desenvolvidos e podendo chegar a 43% nos países em desenvolvimento. O fluconazol, por ser um fármaco, amplamente, utilizado durante o tratamento da doença, é alvo de estudos de resistência. A

A heterorresistência em cepas de *C. gattii* e *C. neoformans* pode ser importante para a melhor orientação terapêutica, assim como, prever possíveis falhas no tratamento e recidivas da doença frente a resultados obtidos em testes de laboratório. Muito tem sido feito, atualmente, para melhor compreensão da evolução da criptococose, doença de grande importância em Saúde Pública, com finalidade de auxiliar no seu controle e tratamento. O Instituto Adolfo Lutz tem como meta melhorar o diagnóstico dessa infecção e fornecer subsídios para a terapia mais adequada. Ao lado de testes de referência para determinação do perfil de suscetibilidade dos agentes etiológicos da criptococose, já executados no Núcleo de Micologia, do Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, a implantação de testes de heterorresistência na rotina

Endereço: Avenida Brasil 4365

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.045-900

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3865-9585

E-mail: cep@ipef.fiocruz.br

INSTITUTO DE PESQUISA
CLÍNICA EVANDRO CHAGAS -
IPEC / FIOCRUZ



Continuação do Parecer: 908.837

laboratorial desta instituição, pode contribuir para maior conhecimento da infecção.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo de heterorresistência pode revelar um novo mecanismo adaptativo para sobrevivência sob pressão de fluconazol e poderá oferecer uma visão útil para o manejo de pacientes sob terapia prolongada com fluconazol.

A Coordenação deste CEP indagou à Dra. Luciana Trilles, com a finalidade de justificar a sua participação como coparticipante, se cepas do INI/Ipec teria sido enviada para o Instituto Adolfo Lutz; Dra. Luciana Trilles respondeu que sim.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A documentação obrigatória foi apresentada em conformidade com a Resolução CNS 466 de 12/12/2012.

Recomendações:

Não há recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências e nem inadequações.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 11 de Dezembro de 2014

Assinado por:
Léa Ferreira Camillo-Coura
(Coordenador)

Endereço: Avenida Brasil 4365

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.045-900

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3865-9585

E-mail: cep@ipec.fiocruz.br