

SUSCETIBILIDADE ANTIFÚNGICA DE ISOLADOS CLÍNICOS E AMBIENTAIS DE *Cryptococcus neoformans* E *Cryptococcus gattii*

Silviane Bezerra PINHEIRO¹

Ana Karla Lima FREIRE²

João Vicente Braga de SOUZA²

¹Bolsista Iniciação Científica INPA-PAIC/FAPEAM;

²Orientadores CSAS/INPA.

INTRODUÇÃO

A Criptococose é uma micose sistêmica que apresenta como agentes etiológicos duas espécies de leveduras: *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, as quais pertencem ao filo Basidiomycota. Essa micose apresenta uma infecção primária em nível pulmonar e quando ocorre a fungemia, pode acometer outros órgãos, principalmente o Sistema Nervoso Central desenvolvendo a neurocriptococose

Marziarz e Perfect 2016). As consequências de recaídas da neurocriptococose podem ser irreparáveis levando o indivíduo a óbito o que está frequentemente associado a pacientes imunocomprometidos (Nascimento *et al.* 2016). No Norte do Brasil há limitação de estudos que abordam ocorrência de cepas de *Cryptococcus spp.* resistentes aos antifúngicos utilizados no tratamento dessa micose de importância médica.

O tratamento consiste na utilização de três antifúngicos: Anfotericina B (ANF) da classe dos poliênicos, sendo esta a droga mais eficaz por agir diretamente sob o esterol (ergosterol) da membrana plasmática fúngica desestabilizando-a e gerando morte celular por extravasamento de íons e conteúdo citoplasmático. A ANF é utilizada na primeira fase do tratamento ou fase de indução, porém exibe maior toxicidade que os demais (Bicanic *et al.* 2015). O Fluconazol (FLU) e Itraconazol (ITZ) são triazóis que inibem a síntese do ergosterol, atuam como fungistáticos na fase de consolidação e/ou na última etapa do tratamento chamada de fase de manutenção de acordo com Pappalardo (2009) e Perfect *et al.* (2010).

Ocorre falta de consenso para estabelecer a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de referência dos antifúngicos utilizados na terapêutica, sendo necessário comparar os valores da CIM de referência de leveduras do gênero *Candida*, mas de acordo com a literatura a CIM para leveduras do gênero *Cryptococcus* varia de acordo com o genótipo da espécie, o que não ocorre em *Candida* (Consenso em Criptococose 2008). No Amazonas, existem estudos de isolamento de cepas clínicas e ambientais de *Cryptococcus spp.*, mas estudos voltados para a sensibilidade aos antifúngicos há somente o de Da Silva *et al.* (2012) que avaliaram a suscetibilidade de 40 isolados clínicos de pacientes infectados pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV).

Um modelo de estudo para fornecer dados com perfis de suscetibilidade de *Cryptococcus spp.* frente aos antifúngicos utilizados no tratamento da Criptococose deve ser feito na Região Norte do país. Para gerar esses dados de referência, isolados clínicos e ambientais precisam ser submetidos a testes de suscetibilidade *in vitro* para comparar o desempenho de cada micro-organismo frente aos antifúngicos, pois linhagens clínicas e raramente ambientais estão mostrando resistência às duas classes de antifúngicos convencionais, o que preocupa a comunidade científica (May *et al.* 2016). O teste *in vitro* de microdiluição em caldo feito nessas leveduras é necessário para avaliar a concentração dos antifúngicos que inibem o crescimento do agente, para

assim obter uma CIM de referência para os isolados da nossa região, pois a área de distribuição e o genótipo das linhagens influenciam na CIM e conseqüentemente no tratamento da Criptococose (Chong *et al.* 2010). Assim, esses perfis de suscetibilidade apresentariam a dosagem adequada para o tratamento utilizando o método quantitativo da microdiluição o qual é rápido e prático que pode contribuir para amenizar a falência terapêutica, a qual se conhece atualmente. Assim, as vantagens seriam: conhecer os perfis das cepas da nossa região frente ao tratamento alopático, para somar resultados que possam alcançar a sociedade para diminuir tanto o número de óbitos de pacientes que apresentam constantes reincidências da neurocriptococose como também o tempo de tratamento que é um dos fatores responsáveis por causar a resistência tempo-dependente dos fungos aos fármacos. Frente à limitação de dados disponíveis na literatura com isolados na nossa região visando os benefícios que podem ser promovidos para a sociedade, este trabalho visa avaliar a suscetibilidade antifúngica de isolados clínicos e ambientais de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gatti*.

MATERIAL E MÉTODOS

50 isolados clínicos foram obtidos de material biológico procedente do Laboratório de Micologia da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), que foram cedidos com registros e aprovações do CEP-FMT/AM, com os seguintes processos: n°. 763/2010-FMT-AM e CAAE – 0007.0.114.000-10/2016. Os isolados ambientais foram obtidos a partir de amostras (excretas de aves, madeira em decomposição, solo e água) coletadas em pontos da área urbana de Manaus e na Reserva Florestal Adolpho Ducke. Estes isolados encontram-se criopreservados a -70 °C na Coleção de Fungos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Ambas as amostras, clínicas e ambientais, possuem genótipos conhecidos sendo as espécies de *C. gattii* VGII e as espécies de *C. neoformans* VNI.

De acordo com o protocolo M27-A3 elaborado pela Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008), o inóculo foi preparado previamente com o repique dos isolados para tubos de ágar Sabouraud dextrose que foram cultivados por 48 horas. Em seguida foi feita uma suspensão de células em 5 mL de solução salina estéril (0,85 %) e as mesmas foram quantificadas em câmara de Neubauer utilizando microscópio óptico (Axioskop 40). Foi obtida a quantidade média de leveduras presentes nos campos contados e com este valor foi realizado um cálculo para definição de um volume de inóculo correspondente a uma concentração final de 2×10^3 células/mL, que foi posteriormente transferido para um novo tubo contendo 10 mL de meio RPMI 1640. Em uma microplaca de 96 poços foram adicionados com o auxílio de pipeta multicanal, 100 µL de meio RPMI 1640, 100 µL da solução da droga nos poços da segunda coluna, realizando a diluição seriada a partir de uma concentração 1:1 até os poços da coluna onze, desprezando no fim 100 µL. E por fim, foram adicionados 100 µL do inóculo fúngico, delimitando os poços da primeira coluna da placa para o controle positivo de crescimento (RPMI + Inóculo) e os da última coluna para o controle negativo (apenas RPMI), respectivamente. As microplacas foram incubadas a 35 °C por 48 horas e após este tempo realizou-se a leitura visual da concentração inibitória mínima (CIM), tendo como comparação o tamanho do diâmetro da colônia do controle positivo. A CIM foi estabelecida para as colônias que cresceram com um tamanho menor semelhante a 50 % do crescimento do controle positivo. E foram considerados resistentes aos fármacos os isolados que apresentarem CIM ≥ 32 µg/mL para Fluconazol, CIM ≥ 1 µg/mL para Itraconazol e CIM ≥ 1 ug/mL para Anfotericina B (CLSI, 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os testes de suscetibilidade antifúngica foram realizados com um total de 97 isolados, sendo 47 clínicos e 50 ambientais. Dentre estes, 81,44% eram da espécie *Cryptococcus neoformans* (VNI) e 18,56% da espécie *Cryptococcus gattii* (VGII). Do total de isolados ambientais analisados, nenhuma apresentou resistência aos antifúngicos convencionais. No entanto, quatro cepas clínicas, sendo duas de *C. neoformans* e duas de *C. gattii*, apresentaram resistência aos antifúngicos da classe dos triázóis (Tabela 1). Não foram observadas CIMs indicativas de resistência a Anfotericina B e estas variaram de 0,0313 - 0,25 µg/mL. Nos testes para Fluconazol as CIMs variaram de 0,5 - 64 µg/mL com duas cepas resistentes com CIM de 32 µg/mL e ≥ 64 µg/mL. Quanto aos testes com Itraconazol as CIMs variaram de 0,0313 - 2 µg/mL e foram detectadas três cepas resistentes uma com CIM de 2 µg/mL e duas com CIMs de 1 µg/mL.

Tabela 1. Total de isolados resistentes aos antifúngicos convencionais.

Total de amostras	Resistentes a ANF B	Resistentes a FLU	Resistentes a ITZ
(50) Isolados Ambientais	0	0	0
(50) Isolados Clínicos	0	2	3

Algumas cepas clínicas foram isoladas de pacientes positivos para HIV o que nos mostra que a administração de antirretrovirais (imunossupressores) concomitante ao uso de antifúngicos aumenta a probabilidade de resistência antifúngica da classe dos triázóis, como descrito por Nasri *et al.* (2016). A anfotericina B mostra-se como um ótimo antifúngico com alta eficácia para o tratamento das micoses, desde a década de 50 até os dias de hoje (Butts e Krysan 2012; Jarvis e Harrison 2016). Sua CIM foi baixa tanto para cepas clínicas quanto para ambientais comprovando sua ação fungicida contra *Cryptococcus spp.* como também relatado por Pedroso *et al.* (2006), Soares *et al.* (2008) e Iqbal *et al.* (2010). As CIMs para ITZ foram baixas se compararmos com as CIMs para FLU, mesmo sendo ambos azóis, esse resultado também foi observado no trabalho de Illnait – Zaragoza *et al.* (2010). A espécie *C. gattii* é mais virulenta que a espécie *C. neoformans* (Chen *et al.* 2014) e sua CIM apresentou valores mais altos nesse estudo. Frente ao FLU suas CIMs mostraram altas concentrações (32-64 µg/mL), esses resultados corroboram a achados de estudos feitos na Austrália por Chong *et al.* (2010), em São Paulo por Mendes *et al.* (2010), na Califórnia por Lockhat *et al.* (2012) e na Espanha por Espinell-Ingroff *et al.* (2012) que relataram altos valores de CIM para cepas de *C. gattii* de genótipo VGII frente aos azóis. Em relação à média das CIMs dos isolados, as cepas clínicas mostraram um valor maior (ANF=0,06; FLU=6,30; ITZ=0,17) que os isolados ambientais (ANF=0,04; FLU=1,48; ITZ=0,04).

CONCLUSÃO

De um total de 100 cepas testadas três foram resistentes aos antifúngicos Fluconazol e Itraconazol e as demais foram sensíveis aos fármacos. As cepas clínicas testadas tiveram contato com os quimioterápicos testados o que colaborou para o desenvolvimento de resistência de quatro cepas. Quanto às cepas ambientais, estas não exibiram nenhuma resistência natural aos antifúngicos, o que parece que o contato com o antifúngico ainda mostra ser, em sua maior parte, ideal para disparar vias alternativas que envolvam mecanismos metabólicos e genéticos que viabilizarão essas células a resistirem a um ambiente com altas concentrações desses fármacos.

Portanto, esse *screening* da microdiluição é fundamental para posteriores ensaios *in vivo*, os quais avaliarão variáveis biológicas desde a biotransformação dos fármacos a biodisponibilidade e eficácia *in vivo* dos quimioterápicos testados a partir da microdiluição em caldo deste estudo.

REFERÊNCIAS

- Alves, S.H.; Oliveira, L.T.; Costa, J.M.; Casalli, A.K.; Vainstein, M.H. 2001. In vitro susceptibility to antifungal agents of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolated in Southern of Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 43(5).
- Bicanic, T.; Bottomley, C.; Loyse, A.; Brouwer, A.E.; Muzoora, C.; Taseera, K.; Jackson, A.; Phulusa, J.; Hosseinipour, M.C.; Van der Horst, C.; Limmathurotsakul, D.; White, N.J.; Wilson, D.; Wood, R.; Meintjes, G.; Harrison, T.S.; Jarvis, J.N. 2015. Toxicity of Amphotericin B Deoxycholate-Based Induction Therapy in Patients with HIV-Associated Cryptococcal Meningitis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 12: 7224-7231.
- Butts, A.; Krysan, D.J. 2012. Antifungal drug discovery: something old and something new, *Public Library of Science Pathogens*, 8:1.
- Chen, S.C.A.; Meyer, W.; Sorrel, T.C. 2014. *Cryptococcus gattii* infections, *American Society for Microbiology*, 4: 980-1024.
- Chong, H.S, Dagg, R, Malik, R, Chen, S.; Carter, D. 2010. In Vitro Susceptibility of the Yeast Pathogen *Cryptococcus* to Fluconazole and Other Azoles Varies with Molecular Genotype. *Journal of Clinical Microbiology*, 4115–4120.
- Clinical and Laboratory Standards Intitute (CLSI). 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, 3rd ed. Approved standard. CLSI M27 – A3 (28). *Clinical and Laboratory Standards Institute*, Wayne, PA.
- CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE – 2008. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2008; 41: 524-544.
- Da Silva, B.K.; Freire, A.K.; Bentes, A.S.; Sampaio, I.L.; Santos, L.O.; Santos, M.S.; Souza, J.V. 2012. Characterization of clinical isolates of the *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* species complex from the Amazonas State in Brazil. *Revista Iberoamericana de Micología*, 29: 40– 43.
- Espinel-Ingroff, A.; Aller, A.I.; Canton, E.; Castañón-Olivares, L.R.; Chowdhary, A.; Cordoba, S.; Cuenca-Estrella, M.; Fothergill, A.; Fuller, J.; Govender, N.; Hagen, F.; Illnait-Zaragozi, M.T.; Johnson, E.; Kidd, S.; Lass-Flörl, C.; Lockhart, S.R.; Martins, M.A.; Meis, J.F.; Melhem, M.S.C.; Ostrosky-Zeichner, L.; Pelaez, T.; Pfaller, M.A.; Schell, W.A.; St-Germain, G.; Trilles, L.; Turnidge, J. 2012. *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* Species Complex: An International Study of Wild-Type Susceptibility Endpoint Distributions and Epidemiological Cutoff Values for Fluconazole, Itraconazole, Posaconazole and Voriconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1-25.
- Illnat – Zaragozi, M.T.; Martínez – Marchín, G.F.; Fernández – Adreu, C.M.; Hagen, F.; Boekhout, T.; Klaassen, C.H.W.; Meis, J.F. 2010. Microsatellite typing and susceptibilities of serial *Cryptococcus neoformans* isolates from Cuban patients with recurrent cryptococcal meningitis. *BMC Infectious Diseases*, 10: 3-7.

- Iqbal, N.; DeBess, E.E.; Wohrle, R.; Sun, B.; Nett, R.J.; Ahlquist, A.M.; Chiller, T.; Lockhart, S.R. 2010. Correlation of genotype and *in vitro* susceptibilities of *Cryptococcus gattii* strain from the Pacific Northwest of the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, 48: 539-544.
- Jarvis, J.N.; Harrison, T.S. 2016. Forgotten but not gone: HIV-associated cryptococcal meningitis. *Lancet Infectious Disease*, 16: 1-2.
- Lockhart, S.R.; Iqbal, N.B.; DeBess, C.B.; Marsden-Haug, E.E.; Worhle, N.; Thakur, R.; Harris, J.R. 2012. Epidemiologic cutoff values for triazole drugs in *Cryptococcus gattii*: Correlation of molecular type and *in vitro* susceptibility. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 73:144-148.
- Marziarz, E.K.; Perferc, J.R. 2016. Cryptococcosis, *Infectious Disease Clinics of North America*, 30:179-206.
- May, R.C.; Stone, N.R.H.; Wiesner, D.L.; Bicanic, T.; Nielsen, K. 2016. *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. *Nature*, 14, 106-117.
- Mendes, F.E.S.; Oliveira, L.V.N.; Farias, E.S.; Alvarenga, D.G.; Pinto, M.R.; Taborda, C.P.; Soares, B.M.; Cisapilno, P.S.; Santos, D.A. 2010. Correlation of the *in vitro* antifungal drug susceptibility with the *in vivo* activity of fluconazole in murine model of cerebral infection caused by *Cryptococcus gattii*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 29: 1525-1529.
- Nascimento, E.; Vitali, L.H.; Tonani, L.; Kress, M.R.V.Z.; Takanayangui, O.M.; Martinez, R.; 2016. Refractory and/or Relapsing Cryptococcosis Associated with Acquired Immune Deficiency Syndrome: Clinical Features, Genotype, and Virulence Factors of *Cryptococcus* spp. Isolates, *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 94: 975-981.
- Nasri, H.; Kabanni, S.; Alwan, M.B.; Wang, Y.F.; Rebolledo, P.A.; Kraft, C.S.; Nguyen, M.L.; Anderson, A.M.; Roupahel, N. 2016. Retrospective study of cryptococcal meningitis with elevated minimum inhibitory concentration to fluconazole in immunocompromised patients, *Oxford Journals*, 2:1-5.
- Pappalardo, M.C.S.M. 2009. *Parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos da anfotericina B e fluconazol e sua contribuição no estudo de correlação clínico – laboratorial da criptococose de sistema nervoso central associado à AIDS*. Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. 147p.
- Pedroso, R.S.; Ferreira, J.C.; Candido, R.C. 2006. *In vitro* susceptibility to antifungal agents of environmental *Cryptococcus* spp. isolated in the city of Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 3: 239-243.
- Perfect, J.R.; Dismuskes, W.E.; Dromer, F.; Goldman, D.L.; Graybill, J.R.; Hamill, R.J.; Harrison, T.S.; Larsen, R.A.; Lortholary, O.; Nguyen, M.H.; Pappas, P.G.; Powderly, W.G.; Singh, N.; Sobel, J.D.; Sorrel, T.C. 2010. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: update by the Infectious Disease of America. *Oxford Journals*, 250:10 291-322.
- Soares, B.M.; Santos, D.A.; Kohler, M.A.; César, G.C.; Carvalho, I.R.; Martins, M.A.; Cisalpino, P.S. 2008. Cerebral infection caused by *Cryptococcus gattii*: a case report and antifungal susceptibility test. *Revista Iberoamericano de Micología*, 25: 242-245.
- Souza, L.K.H.; Fernandes, O.F.L.; Kobayashi, C.C.B.A.; Passos, X.S.; Costa, C.S.; Lemos, J.A.; Souza-Júnior, A.H.; Silva, M.R.R. 2005. Antifungal susceptibilities of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* in Goiania city, Goias, Brazil. *Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 5: 253-256.