

Suscetibilidade a antifúngicos de variedades de *Cryptococcus neoformans* isoladas de pacientes em hospital universitário

Susceptibility to antifungal agents among *Cryptococcus neoformans* varieties isolated from patients at a university hospital

Paulo Roberto da Silva¹, Rosiley Aparecida de Souza Rabelo¹, Ana Paula Sarreta Terra² e David Nascimento Silva Teixeira²

RESUMO

Este trabalho identificou variedades de *Cryptococcus neoformans* e avaliou a suscetibilidade a antifúngicos pelo protocolo M27-A2 do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* em isolados de 35 pacientes do Hospital Escola da Universidade Federal do Triângulo Mineiro. A variedade *gattii* foi identificada em 11.4% (n^o = 4) dos casos. A concentração inibitória mínima (µg/ml) dos isolados de *Cryptococcus neoformans neoformans* variou de 0,062 - 2,000 (anfotericina B), 0,250 - 8,000 (fluconazol), 0,062 - 1,000 (itraconazol) e 0,125 - 1,000 (cetoconazol). A variedade *gattii* apresentou concentração inibitória mínima de 0,125 - 2,000 (anfotericina B), 0,250 - 16,00 (fluconazol), 0,062 - 1,000 (itraconazol) e 0,125 - 4,000 (cetoconazol). Detectaram-se 2 isolados resistentes ao itraconazol e 2 a anfotericina B (1 isolado de cada variedade por antifúngico). Os dados mostram a importância da determinação da variedade e da concentração inibitória mínima de isolados de *Cryptococcus neoformans* para monitorar o desenvolvimento de resistência e possibilitar uma terapia mais adequada na criptococose.

Palavras-chaves: *Cryptococcus neoformans*. *Cryptococcus gattii*. Suscetibilidade. Agentes antifúngicos. Criptococoses.

ABSTRACT

This study identified *Cryptococcus neoformans* varieties isolated from 35 patients at teaching hospital of the Federal University of the Triângulo Mineiro and evaluated the susceptibility to antifungal agents among these samples using the protocol M27-A2 from the National Committee for Clinical Laboratory Standards. The *gattii* variety was identified in 11.4% of the cases (n = 4). The minimum inhibitory concentration (µg/ml) of *Cryptococcus neoformans neoformans* isolates ranged from 0.062 to 2.000 (amphotericin B), 0.250 to 8.000 (fluconazole), 0.062 to 1.000 (itraconazole) and 0.125 to 1.000 (ketoconazole). The *gattii* variety presented a minimum inhibitory concentration range of 0.125 to 2.000 (amphotericin B), 0.250 to 16.00 (fluconazole), 0.062 to 1.000 (itraconazole) and 0.125 to 4.000 (ketoconazole). Two isolates resistant to itraconazole and two resistant to amphotericin B (one isolate of each variety per antifungal agent) were found. These data show the importance of determining the variety and minimum inhibitory concentration of *Cryptococcus neoformans* isolates, in order to monitor resistance development and enable better treatment for cryptococcosis.

Key-words: *Cryptococcus neoformans*. *Cryptococcus gattii*. Susceptibility. Antifungal agents. Cryptococcosis.

O *Cryptococcus neoformans* é uma levedura ovalada com uma cápsula rica em polissacarídeos sendo normalmente encontrado associado a fezes de aves (*Columba livia*) ou árvores (*Eucalíptus*), e cuja maior proporção de indivíduos afetados são aqueles portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV)¹³. De acordo com a Coordenação Nacional de DST/AIDS do Ministério da Saúde, no período de 1980 a 2002, 6% das infecções oportunistas encontradas em pacientes HIV positivos

foram causadas pelo *Cryptococcus neoformans*¹². Considerando as infecções fúngicas oportunistas que acometem pacientes portadores de HIV no mundo, a criptococose é a segunda mais freqüente¹³.

Segundo diversos estudos^{6 11} o *Cryptococcus neoformans* pode ser classificado em duas variedades de acordo com os seus antígenos polissacarídeos capsulares, o *Cryptococcus neoformans* variedade *neoformans* (sorotipos A, D e AD) e o

1. Disciplina de Microbiologia, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, M.G. 2. Disciplina de Laboratório Clínico, Departamento de Clínica Médica, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, M.G.

Apoio financeiro: FAPEMIG, CNPq, FUNEPU, UFTM.

Endereço para correspondência: Prof. David Nascimento Silva Teixeira. Disc. de Laboratório Clínico/Deptº de Clínica Médica/UFTM. Av. Frei Paulino 30, 38025-180 Uberaba MG.

Tel: 55 34 3318-5542, Fax: 55 34 3336-7015

e-mail: silvateixeira@mednet.com.br

Recebido para publicação em: 04/06/2007

Aceito em: 10/03/2008

Cryptococcus neoformans variedade *gattii* (sorotipos B e C). A variedade *neoformans* é cosmopolita e tem como principal ambiente as fezes de pombos e outras aves¹⁰. Já a variedade *gattii* é encontrada preferencialmente no meio campestre, em regiões tropicais e semitropicais, sendo o primeiro isolamento descrito em 1990 a partir de uma árvore (*Eucalyptus calmadulensis*)⁷. Em indivíduos imunocomprometidos, a principal variedade encontrada como responsável pela criptococose tem sido a *neoformans*, enquanto que nos imunocompetentes ocorre a predominância da variedade *gattii*¹³⁻²⁵. Além disto, existem relatos de uma maior dificuldade e menor resposta terapêutica ao tratamento com antifúngicos nas infecções pela variedade *gattii*¹⁸⁻²⁵. O aparecimento de infecções fúngicas recorrentes e a resistência de determinadas leveduras à terapia usual tem estimulado o uso de testes de suscetibilidade *in vitro* para escolha e acompanhamento da quimioterapia antifúngica mais adequada a cada caso²⁻⁵.

Existem muito poucos trabalhos sobre identificação das variedades de *Cryptococcus neoformans* isoladas na região do Triângulo Mineiro¹⁵. Diante disto, nosso trabalho teve como objetivo avaliar a suscetibilidade *in vitro* a quatro antifúngicos (anfotericina B, fluconazol, cetoconazol e itraconazol) segundo o protocolo M27-A 2002 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), antigo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS)¹⁶, de variedades de *Cryptococcus neoformans* isoladas de pacientes com criptococose, atendidos no Hospital Escola da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (HE-UFTM).

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras biológicas de paciente com criptococose.

Neste trabalho, foram estudadas 35 amostras de *Cryptococcus neoformans* isoladas pelo Serviço de Patologia Clínica da UFTM a partir do líquido cefalorraquidiano (LCR), raspado de lesão (pele), lavado brônquio-alveolar e sangue venoso periférico de pacientes durante o diagnóstico de criptococose. Cepas controle cedidas pela Universidade Federal de Goiás (UFG), previamente identificadas como CBS 132, (sorotipo A, variedade *neoformans*) e ICB 565 (sorotipo B, variedade *gattii*) também foram avaliadas.

Dados clínicos: Os dados dos pacientes tais como idade, sexo, procedência e sorologia para HIV foram obtidos no Serviço de Arquivo Médico (SAME) da UFTM e organizados em bancos de dados. A maioria dos pacientes acometidos de criptococose, 85,7% (nº = 30), foi do sexo masculino, sendo 42,8% (nº = 15) na faixa etária entre trinta e um a quarenta anos. Com relação à sorologia para HIV, 85,7% (nº = 30) dos pacientes tinham sorologia positiva. Em 11,4% (nº = 4) dos casos, encontramos outras causas de imunossupressão identificadas como lipossarcoma (nº = 1), lúpus (nº = 1), transplante renal (nº = 1) diabetes (nº = 1). Apenas um paciente não apresentou fatores predisponentes para a criptococose. Com relação ao tratamento e evolução, 88,6% (nº = 31) dos pacientes utilizaram anfotericina B, com doses variando de 20 a 30mg/kg, sendo que

68% destes (nº = 21) também fizeram uso de fluconazol. O paciente em que foi isolado o *Cryptococcus neoformans* de raspado lesão de couro cabeludo foi tratado somente com o itraconazol e três pacientes foram tratados somente com fluconazol. Dos 35 pacientes diagnosticados com criptococose, 26 (74,2%) foram a óbito. Em relação às formas de manifestação da criptococose, dos 35 pacientes estudados, 30 (85,7%) foram diagnosticados como neurocriptococose, dois pacientes apresentaram criptococose pulmonar, um foi acometido por criptococose cutânea e em dois casos o *Cryptococcus neoformans* foi detectado somente por hemocultura. O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFTM com o número de protocolo 677.

Identificação das variedades de *Cryptococcus neoformans* isoladas. Inicialmente, foi identificada a presença de fungo encapsulado nas amostras biológicas por exame direto em microscopia de luz na presença de tinta da nanquim. Após a identificação as amostras foram cultivadas em ágar Sabouraud dextrose (DIFCO-USA), em estufa a $35 \pm 1^\circ\text{C}$. Colônias sugestivas de *Cryptococcus neoformans* foram repicadas em meio ágar niger e meio de Christensen, para avaliar-se respectivamente a atividade de fenoxidase e uréase, além da realização do teste de assimilação de açúcar inositol. Quando os resultados de todas estas provas eram positivos identificava-se a espécie *Cryptococcus neoformans*⁴⁻²⁶. As variedades de *Cryptococcus neoformans* foram identificadas pelo meio L-canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB)¹¹.

Teste de suscetibilidade a antifúngicos. Foi realizado o teste de microdiluição em caldo utilizando método proposto pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), antigo NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*) segundo protocolo M-27-A2¹⁶ para determinar a concentração inibitória mínima (CIM), visando avaliar o perfil de suscetibilidade das variedades de *Cryptococcus neoformans* aos derivados azólicos: itraconazol, cetoconazol, e fluconazol (Genix-Índia) e ao poliênico anfotericina B (Cristália-Brasil). Todos os testes foram realizados em duplicata.

Controle de qualidade. Uma cepa controle de *Candida parapsilosis*, (ATCC 22019) com CIMs pré-estabelecidas foi testada em cada experimento realizado para a validação dos resultados obtidos para as amostras de *Cryptococcus neoformans*. Também foram utilizadas duas cepas controle de *Cryptococcus neoformans* identificadas como CBS 132, (sorotipo A, variedade *neoformans*) e ICB 565 (sorotipo B, variedade *gattii*). Todas estas cepas foram cedidas pela Universidade Federal de Goiás (UFG) e apresentaram resultados equivalentes aos obtidos pelo nosso estudo quando avaliadas previamente frente aos antifúngicos dos fabricantes que os patentearam. Como o protocolo M27-A2¹⁶ do NCCLS não propôs valores limites de suscetibilidade para o *Cryptococcus neoformans*, foram considerados resistentes os isolados que apresentaram $\text{CIM} \geq 64\text{g/ml}$, para fluconazol, $\text{CIM} \geq 1\text{g/ml}$ para o itraconazol e $\text{CIM} \geq 2\mu\text{g/ml}$ para a anfotericina B conforme sugerido previamente por estudos de outros autores¹⁷⁻¹⁹⁻²²⁻²⁴. Os dados foram apresentados em CIM_{50} e CIM_{90} , que correspondem à concentração de cada antifúngico capaz de inibir 50% ou 90% dos isolados, respectivamente.

RESULTADOS

Suscetibilidade dos isolados aos antifúngicos. Na Tabela 1, são apresentados a CIM₅₀, CIM₉₀ e a variação da CIM para os quatro antifúngicos estudados frente às variedades de *Cryptococcus neoformans* isoladas. Com relação ao cetoconazol, todos os isolados da variedade *neoformans* foram considerados susceptíveis *in vitro* este antifúngico. Os isolados da variedade *gattii* também foram susceptíveis à ação do cetoconazol, porém apresentando valores de CIM₅₀ (0,5µg/mL) e CIM₉₀ (4µg/mL) mais elevados do que os encontrados para a variedade *neoformans*. Os isolados da variedade *neoformans* foram susceptíveis ao fluconazol e dentre as amostras de variedade *gattii*, um dos isolados apresentou um valor mais elevado de CIM (16µg/mL), porém ainda considerado susceptível a este antifúngico. As variedades *gattii* e *neoformans* apresentaram perfis equivalentes de suscetibilidade ao itraconazol, com a maioria dos isolados susceptível a este antifúngico, porém foram encontradas duas amostras resistentes com CIM de 1µg/mL, sendo uma de cada variedade. Em relação à anfotericina B, foram detectados dois isolados resistentes com CIM igual a 2µg/mL, sendo um da variedade *neoformans* e outro da variedade *gattii*. Os resultados de CIM para a cepa controle de *Candida parapsilosis*, (ATCC 22019) utilizado em nossos experimentos foram equivalentes aos valores de referência descritos pelo NCCLS.

Tabela 1 - Suscetibilidade in vitro a antifúngicos de variedades de Cryptococcus neoformans isoladas de pacientes atendidos no Hospital Escola da Universidade Federal do Triângulo Mineiro.

Agente antifúngico e variedade de	Isolados (nº)	CIM (mg/ml)		
		variação	CIM ₅₀	CIM ₉₀
Cryptococcus neoformans				
Anfotericina B				
variedade <i>neoformans</i>	31	0,062 - 2,000	0,250	1,000
variedade <i>gattii</i>	4	0,125 - 2,000	0,125	2,000
Fluconazol				
variedade <i>neoformans</i>	31	0,250 - 8,000	4,000	4,000
variedade <i>gattii</i>	4	0,250 - 16,00	8,000	16,00
Itraconazol				
variedade <i>neoformans</i>	31	0,062 - 1,000	0,125	0,500
variedade <i>gattii</i>	4	0,062 - 1,000	0,062	1,000
Cetoconazol				
variedade <i>neoformans</i>	31	0,125 - 1,000	0,250	0,500
variedade <i>gattii</i>	4	0,125 - 4,000	0,500	4,000

CIM₅₀ e CIM₉₀: representam a concentração de antifúngico capaz de inibir, respectivamente, 50 e 90% dos isolados de *Cryptococcus neoformans*.

Valores máximos de Concentração Inibitória Mínima quanto ao local de isolamento. Quanto ao local de isolamento podemos observar que, em geral, as amostras de *Cryptococcus neoformans* obtidas do líquido apresentaram valores mais elevados de CIM para todos os antifúngicos testados quando comparados com os isolados de sangue, pele e lavado brônquio-alveolar (Tabela 2). A exceção ocorreu para o caso específico da suscetibilidade *in vitro* dos isolados do lavado brônquio-alveolar frente ao fluconazol. Neste caso, as amostras apresentaram valores de CIM elevados, equivalente àqueles encontrados para o líquido.

Tabela 2 - Variação da Concentração Inibitória Mínima quanto ao local de isolamento das amostras de Cryptococcus neoformans.

Agente antifúngico	Variação da CIM (mg/ml)/			
	Local de isolamento do <i>Cryptococcus neoformans</i> (nº de amostras)			
	líquor (nº = 30)	sangue (nº = 2)	lavado brônquio-alveolar (nº = 2)	pele (nº = 1)
Anfotericina B	0,062 - 2,000	0,250 - 0,250	0,125 - 0,125	0,062
Fluconazol	0,250 - 16,00	2,000 - 2,000	2,000 - 8,000	2,00
Itraconazol	0,062 - 1,000	0,125 - 0,125	0,062 - 0,062	0,062
Cetoconazol	0,250 - 4,000	0,250 - 0,250	0,062 - 0,500	0,062

CIM: representa a concentração de antifúngico capaz de inibir *in vitro* o crescimento do respectivo isolado de *Cryptococcus neoformans*.

DISCUSSÃO

No presente trabalho, a maioria dos casos diagnosticados de criptocose no HE-UFTM apresentou a variedade *neoformans* como principal agente etiológico (Tabela 1). Neste aspecto, nossos dados são similares aos estudos feitos em outras regiões que apontam esta variedade como a principal responsável por casos de criptocose em pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA)^{13 25}.

A maioria dos estudos encontrados na literatura mostra que isolados de *Cryptococcus neoformans* apresentam suscetibilidade *in vitro* a diferentes antifúngicos^{9 24}. A resistência de *Cryptococcus neoformans* aos antifúngicos *in vitro* é fenômeno pouco freqüente, embora existam alguns relatos^{20 24}. Neste trabalho, detectamos a presença de isolados clínicos resistentes ao itraconazol e a anfotericina B na região do Triângulo Mineiro. Com relação ao fluconazol, não foram detectados *Cryptococcus neoformans* resistentes a este antifúngico, embora um isolado da variedade *gattii* tenha apresentado uma CIM relativamente elevada (16µg/mL). A terapia de longa duração com o fluconazol na criptocose tem sido descrita como um dos fatores associados ao desenvolvimento de cepas resistentes a este antifúngico^{5 13 17 21}. Dentro deste contexto, o itraconazol tem sido apontado como uma alternativa interessante ao fluconazol, devido à alta suscetibilidade *in vitro* de isolados de *Cryptococcus neoformans* a este antifúngico descrita em estudos anteriores⁹. Diferentemente de outros trabalhos da literatura^{8 9 28} encontramos em nosso estudo dois isolados clínicos resistentes ao itraconazol com CIM de 1µg/mL (um da variedade *neoformans* e outro da *gattii*). Estes resultados sugerem que o uso alternativo do itraconazol ao fluconazol também deve ser avaliado com cautela, pois apesar da atividade *in vitro* do fluconazol ser baixa em alguns estudos, acredita-se que *in vivo* este antifúngico possa atingir níveis plasmáticos mais elevados que o itraconazol¹⁴.

A anfotericina B tem sido freqüentemente utilizada no tratamento inicial da criptocose¹³, sendo que a detecção de cepas de *Cryptococcus neoformans* resistentes a este antifúngico é infreqüente. No entanto, encontramos dois isolados resistentes a anfotericina B em nosso estudo (um da variedade *neoformans* e outro da variedade *gattii*). Nossos dados também mostram que a variedade *gattii* apresenta uma tendência a exibir CIMs um pouco mais elevados do que a variedade *neoformans*, reforçando, em parte, observações anteriores de que esta variedade é de terapia mais difícil e prolongada se comparada a variedade *neoformans*^{25 27}.

Os resultados obtidos também mostraram que os *Cryptococcus neoformans* isolados de liquor apresentaram CIMs mais elevados do que as amostras biológicas coletadas à partir de outros locais. A exceção ocorreu para os isolados de lavado brônquio-alveolar quando testados frente ao fluconazol que apresentaram, neste caso, valores de CIMs equivalentes àqueles encontrados no liquor. O aparecimento de cepas de *Cryptococcus neoformans* resistentes está geralmente associado com infecções crônicas encontradas em indivíduos imunocomprometidos e com neurocriptococose, sendo mais facilmente encontradas, nestes casos, cepas resistentes ou com CIMs elevados nas amostras de liquor rotineiramente utilizadas para o diagnóstico laboratorial destes pacientes^{13,23}. Embora tenham sido isoladas somente duas cepas no lavado brônquio-alveolar, estas apresentaram CIMs mais elevados para fluconazol, devido provavelmente ao seu uso constante por pacientes imunocomprometidos por SIDA, podendo o fungo inicialmente causar uma infecção pulmonar sintomática ou não e posteriormente disseminar-se para as meninges e causar neurocriptococose.

Em conclusão, os dados obtidos mostram que a variedade *neoformans* foi a mais prevalente como causadora de criptococose em pacientes atendidos no Hospital Escola da UFTM. A maioria dos isolados de *Cryptococcus neoformans* apresentou um perfil de suscetibilidade *in vitro*, sendo encontrado apenas dois isolados não-suscetíveis, indicando que a resistência aos antifúngicos convencionais ainda não é um problema significativo. Todavia, a realização de estudos que detectem a variedade e a CIM de isolados de *Cryptococcus neoformans* é importante para se monitorar o aparecimento de novas cepas resistentes.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Prof^a Orionalda de Fátima L. Fernandes e a Prof^a Lúcia K.H. Souza da Universidade Federal de Goiás (UFG) que gentilmente cederam as cepas controle de *Cryptococcus neoformans* e *Candida parapsilosis* utilizadas neste estudo.

REFERÊNCIAS

- Baker DJ, Reboli AC. Images in clinical medicine: Cutaneous cryptococcosis. *New England Journal of Medicine* 336: 998, 1997.
- Calhoun DL, Roberts GD, Galgiani JN, Bennett JE, Feingold DS, Jorgensen J, Kobayashi GS, Shadomy S. Results of survey of antifungal susceptibility tests in the United States and interlaboratory comparison of broth dilution testing of flucytosine and amphotericin. *Bangladesh Journal of Clinical Microbiology* 23: 298-301, 1986.
- Chen S, Sorrell T, Nimmo G, Speed B, Currie B, Ellis D, Marriott D, Pfeiffer T, Parr D, Byth K. 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* 31: 499-508, 2000.
- Christensen WB. Urea decomposition as a means of differentiating Proteus and Paracolon cultures from each other and from salmonella and shigella types. *Journal of Bacteriology* 52: 461-466, 1946.
- Colombo AL, Barchiesi F, Mcgough DA, Rinald MG. Comparison of Etest and National Committee for Clinical Laboratory Standards broth microdilution method for azole antifungal susceptibility testing. *Journal of Clinical Microbiology* 33: 535-540, 1995.
- Diaz MR, Boekhout T, Theelen B, Fell JW. Molecular sequence analyses of the intergenic spacer (IGS) associated with rDNA of the two varieties of the pathogenic yeast, *Cryptococcus neoformans*. *Systematic and Applied Microbiology* 23: 535-545, 2000.
- Ellis DH, Pfeiffer TJ. Ecology, life cycle, and infectious propagule of *Cryptococcus neoformans*. *Lancet* 336: 923-925, 1990.
- Fernandes OEL, Passos XS, Souza LK, Miranda AT, Cerqueira CH, Silva MR. *In vitro* susceptibility characteristics of *Cryptococcus neoformans* varieties from AIDS patients in Goiania. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 98: 839-841, 2003.
- Franzot SP, Hamdan JS, Currie BP, Casadevall A. Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* in Brazil and the United States: evidence for both local genetic differences and a global clonal population structure. *Journal of Clinical Microbiology* 35: 2243-2251, 1997.
- Fromling RA, Bulmer GS. Distribution of *Cryptococcus neoformans* in a natural site. *Infection and Immunity* 31: 560-563, 1981.
- Kwon-Chung KJ, Polacheck I, Bennett JE. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C). *Journal of Clinical Microbiology* 15: 535-537, 1982.
- Ministério da Saúde. Dados e Pesquisa em DST e Aids. Coordenação do programa nacional de DST/Aids. *Boletim Epidemiológico AIDS/Ministério da Saúde*. Brasília, 2002.
- Mitchell TG, Perfect JR. Cryptococcosis in the era of AIDS - 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clinical Microbiology and Infection* 8: 515-548, 1995.
- Moraes EM, Prímola NS, Hamdan JS. Antifungal susceptibility of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* to four antifungal drugs determined by two techniques. *Mycoses* 46:164-168, 2003.
- Moreira TA, Ferreira MS, Ribas RM, Borges AS. Cryptococcosis: clinical epidemiological laboratorial study and fungi varieties in 96 patients. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39: 255-258, 2006.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, 2002.
- Nguyen MH, Yu CY. *In vitro* comparative efficacy of voriconazole and itraconazole against fluconazole-susceptible and resistant *Cryptococcus neoformans* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42: 471-472, 1998.
- Peachey PR, Gubbins PO, Martin RE. The association between cryptococcal variety and immunocompetent and immunocompromised hosts. *Pharmacotherapy* 18: 255-264, 1998.
- Pedroso RS, Ferreira JC, Candido RC. *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* 101: 239-243, 2006.
- Perkins A, Gomez-Lopez, A, Mellado Rodriguez-Tudela EJJ, Cuenca-Estrella M. Rates of antifungal resistance among Spanish clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 56: 1144-1147, 2005.
- Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ, Messer AS, Tendolcar S, Diekema DJ. *In vitro* susceptibilities of clinical isolates of *Candida* species, *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus* species to itraconazole: global survey of 9,359 isolates tested by clinical and laboratory standards institute broth microdilution methods. *Journal of Clinical Microbiology* 43: 3807-3810, 2005.
- Rodriguez-Tudela JL, Berenguer Martiinez-Suarez JJ, Sanchez R. Comparison of a Spectrophotometric Microdilution Method with RPMI-2% Glucose with the National Committee for Clinical Laboratory Standards Reference Microdilution Method M27-P for *in vitro* Susceptibility Testing of Amphotericin B, Flucytosine, and Fluconazole against *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* 40: 1998-2003, 1996.
- 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. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 54: 563-565, 2004.

24. Souza LKH, Fernandes OFI, Kobayashi CCBA, Passos XS, Costa CR, Lemos JA, Souza-Júnior AH, Silva MRR. Antifungal susceptibilities of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* in Goiânia City, Goiás, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 47: 253-256, 2005.
25. Speed B, Dunt D. Clinical and host differences between infections with the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Clinical Infectious Diseases* 21: 28-34, 1995.
26. Staib F, Seibold M, Antweiler E, Fröhlich B, Weber S, Blisse A. The brown colour effect (BCE) of *Cryptococcus neoformans* in the diagnosis, control and epidemiology of *Cryptococcus neoformans* infections in AIDS patients. *Zentralbl für Bakteriologie, Mikrobiologie, und Hygiene Series A*. 266: 167-177, 1987.
27. Trilles L, Fernández-Torres B, Lazéra MS, Wanke B, Guarro J. *In vitro* antifungal susceptibility of *Cryptococcus gattii*. *Journal of Clinical Microbiology* 42: 4815-4817, 2004.