



Universidade Federal do Ceará
Pró- Reitoria de Pesquisa e Pós- Graduação
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas

**Perfil de sensibilidade de cepas de *Coccidioides posadasii*
a associação de drogas antimicrobianas**

Delia Jéssica Astete Medrano

Fortaleza-Ceará

2010

Universidade Federal do Ceará
Pró- Reitoria de Pesquisa e Pós- Graduação
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas

**Perfil de sensibilidade de cepas de *Coccidioides posadasii*
a associação de drogas antimicrobianas**

Delia Jéssica Astete Medrano

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Rossana de Aguiar Cordeiro

Fortaleza-Ceará

2010

Universidade Federal do Ceará
Pró- Reitoria de Pesquisa e Pós- Graduação
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas

Delia Jessica Astete Medrano

Tese apresentada á coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médica, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor pela Universidade Federal do Ceará.

Defesa formal aprovada em 10/09/2010 pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim

Docente da Faculdade de Medicina do Departamento de Patologia e Medicina Legal da
Universidade Federal do Ceará – UFC - Orientador

Prof.^a Dr.^a Nilza Dutra Alves

Professor Adjunto da Universidade Federal Rural do Semi-Árido - UFRSA

Prof. Dr. Zoilo Pires de Camargo

Professor do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia
Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP

Prof.^a Dr.^a Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante

Docente da Faculdade de Medicina do Departamento de Patologia e Medicina Legal da
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias
Universidade Estadual do Ceará – UECE

Dedico este trabalho aos meus pais, Delia Medrano Merino e Segundo Arturo Astete Escalante e irmãos Anita Astete, Miguel Astete e José Astete, por todas as palavras de carinho, amizade e compreensão durante todo este tempo de ausência e saudade.

Ao meu grande companheiro, amigo e confidente Urçuelio Gomes de Oliveira, pelo exemplo de pessoa, além do incentivo para realização deste curso. Sua sabedoria e paciência são admiráveis.

Obrigada a todos vocês pelo incondicional amor!

AGRADECIMENTOS

É com muita satisfação que expresso agradecimentos a inúmeras pessoas que contribuíram para a realização deste projeto.

Ao Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim, pela sua orientação, credibilidade e oportunidade no meu desenvolvimento profissional.

À Prof.^a Dr.^a Rossana de Aguiar Cordeiro, pela sua coorientação, paciência e disponibilidade na execução deste trabalho. Agradeço também seus conhecimentos, idéias e valiosas sugestões.

À Prof.^a Dr.^a Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante e ao Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha, pela ajuda e colaboração.

À Prof.^a Dr.^a Nilza Dutra Alves e o Prof. Dr. Zoilo Pires de Camargo, que aceitaram este convite como membros da banca examinadora e que muito me honram com suas presenças.

À Mestre Silviane Praciano Bandeira, minha gratidão pela ajuda incomparável. Às mestrandas Rita Amanda Chávez de Lima e Juliane Lira Tavares, por sua grande ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

A todos os professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da UFC pela grande ajuda, esforço e desenvolvimento profissional para os alunos.

A Ivone Souza, secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, pela atenção e eficiência.

A todos os que fazem parte da família do Centro Especializado em Micologia Médica da Universidade Federal do Ceará, pela amizade.

Aos técnicos do laboratório, Terezinha de Jesus Santos Rodriguez, Daniel, José Olavo Morais e José Everardo Araújo de Sousa (*in memoriam*), pela ajuda técnica nas etapas deste trabalho.

Aos estatísticos do Departamento de Estatística e Matemática Aplicada da Universidade Federal do Ceará, Prof. André Jalles, Prof. Robson e Prof.^a Ana Maria Souza de Araujo, pelo auxílio na organização e interpretação dos dados estatísticos.

Ao professor João Vianney Campos de Mesquita, da UFC, pela revisão estilística e gramatical deste trabalho.

Em especial à, Dr.^a Vaulice Sales Café, meus agradecimentos sinceros pelo carinho, amizade, confiança, credibilidade e incentivo constante no meu crescimento profissional e pessoal. Serei sempre agradecida.

À FUNCAP e ao CNPq, pelo apoio financeiro ao longo do trabalho.

RESUMO

A coccidioidomicose é uma infecção sistêmica, predominantemente pulmonar, causada pelos fungos dimórficos *Coccidioides immitis* e *C. posadasii*. O Brasil está na relação de países com áreas endêmicas da coccidioidomicose (RESTREPO, 2006), circunscritas às zonas do semiárido da região do Nordeste (COX & MAGEE, 2004). Esse cenário leva a uma investigação maior para novas estratégias inibitórias contra *Coccidioides posadasii*. Baseando-se neste contexto, buscou-se estudar novas estratégias, como avaliar a interação *in vitro* dos principais antifúngicos utilizados no tratamento da coccidioidomicose, analisar o efeito inibitório *in vitro* de drogas antimicrobianas, como o sulfametoxazol com trimetoprim (SMX/TMP) associado ou não com anfotericina B (AMB), bem como avaliar a interação *in vitro* das drogas antituberculose com drogas antifúngicas frente a cepas de *C. posadasii* isoladas no Nordeste brasileiro. O estudo foi conduzido em ensaio de macrodiluição, de acordo com o protocolo descrito no documento M-38A, padronizado pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2002). A interação sinérgica das drogas foi avaliada pelo método do *Checkerboard*. Este estudo mostrou que as oito combinações entre duas drogas antifúngicas testadas como anfotericina B com derivados azólicos e voriconazol com derivados azólicos e caspofungina respectivamente apresentaram efeito inibitório *in vitro* frente aos isolados de *C. posadasii*; porém apenas uma combinação voriconazol com anfotericina B exibiu interação sinérgica, cuja concentração inibitória mínima (CIM) foi reduzida em 15 vezes, quando se comparou com a CIM da droga testada isoladamente. O SMX/TMP mostrou efeito inibitório *in vitro* com frente a cepas de *C. posadasii*, entretanto, houve diminuição da CIM da AMB em cerca de 5,85 vezes quando associado à SMX/TMP. Com relação às 24 combinações entre drogas antifúngicas com drogas antituberculose testadas todas apresentaram efeito inibitório *in vitro* frente aos isolados de *C. posadasii*. Das 24 combinações, foram observadas interações sinérgicas em 16 associações, das quais anfotericina B com rifampicina; itraconazol com rifampicina ou etambutol ou pirazinamida; fluconazol com etambutol e voriconazol com etambutol foram reduzidas as CIMs em dez vezes, ao se comparar com a CIMs da droga testada isoladamente. Futuros estudos em modelos animais são necessários para confirmar a utilidade destas combinações. Este trabalho é fonte de apoio para novas investigações de combinações que resultem em interações sinérgicas, bem como para determinar a correlação de resultados *in vivo*.

ABSTRACT

The coccidioidomycosis is a systemic infection, predominantly lung caused by dimorphic fungi *Coccidioides immitis* and *C. posadasii*. Brazil is among the countries with endemic areas of coccidioidomycosis, confined to the semiarid areas of Northeast Brazil. This scenario leads to a larger investigation into new strategies for an injunction against *C. posadasii*. Based on this context, the purpose of this study was to investigate new strategies, to evaluate the *in vitro* interaction of the major antifungal agents used in the treatment of coccidioidomycosis, analyze the inhibitory effect *in vitro* antimicrobial drugs, such as sulfamethoxazole and trimethoprim (SMX / TMP) associated or not with amphotericin B (AMB) and evaluate the *in vitro* interaction of antituberculosis drugs with antifungal drugs against *C. posadasii* strains isolated in northeastern Brazil. The study was conducted in test macrodilution according to the protocol described in document M-38A, standardized by the *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2002). The synergistic interaction of the drugs was evaluated by the *Checkerboard* method. This study showed that the eight combinations of two antifungal drugs such as amphotericin B with azole derivatives and voriconazole with derivative azole and caspofungin, respectively showed inhibitory effect *in vitro* against the isolates of *C. posadasii*, but only a combination of voriconazole with amphotericin B showed synergistic interaction, whose minimum inhibitory concentration (MIC) was reduced by 15 times when compared with the MIC of the drug tested alone. SMX/TMP had an inhibitory effect *in vitro* against strains of *C. posadasii*, however, decreased the MIC of AMB at 5,85 times when associated with SMX / TMP. Regarding the 24 combinations of antifungal drugs with antituberculosis drugs tested showed any inhibitory effect *in vitro* against the isolates of *C. posadasii*. Of the 24 combinations, synergistic interactions were observed in 16 associations, of which, amphotericin B with rifampicin, itraconazole or rifampicin with ethambutol or pyrazinamide, ethambutol with fluconazole and voriconazole with ethambutol MICs were reduced ten-fold when compared with the MICs of drugs tested in isolation. Future studies in animal models are needed to confirm the usefulness of these combinations. This work is a source of support for new investigations of combinations that result in synergistic interactions, as well as to determine the correlation of results *in vivo*.

SUMÁRIO

	Página
1	INTRODUÇÃO..... 01
1.1	Aspectos históricos da coccidioidomicose..... 01
1.2	O gênero <i>Coccidioides</i> 05
1.3	Patogenias e formas clínicas..... 08
1.4	Epidemiologia da coccidioidomicose..... 11
1.5	Diagnóstico..... 14
1.6	Tratamento..... 19
1.7	Novas estratégias..... 26
1.7.1	Drogas com potencial antifúngico..... 27
1.8	Métodos de estudo da atividade antifúngica <i>in vitro</i> 33
2	JUSTIFICATIVA..... 38
3	PERGUNTAS DE PARTIDA..... 40
4	HIPÓTESE..... 40
5	OBJETIVOS..... 41
5.1	Objetivo geral..... 41
5.1.1	Objetivos específicos..... 41
6	METODOLOGIA..... 42
6.1	Cepas fúngicas..... 43
6.2	Teste de sensibilidade <i>in vitro</i> 46
6.2.1	Meio utilizado..... 46
6.2.2	Preparação do inóculo..... 46
6.2.3	Antimicrobianos..... 47
6.2.4	Procedimento..... 49
6.3	Interação <i>in vitro</i> das drogas..... 51
6.3.1	Combinação das drogas..... 54
6.4	Análise estatística..... 55
7	RESULTADOS..... 58
7.1	Atividade <i>in vitro</i> de drogas antimicrobianas testadas isoladamente..... 58
7.1.1	Concentração fungicida mínima (CFM)..... 58
7.2	Interação <i>in vitro</i> de drogas antimicrobianas..... 61
8	DISCUSSÃO..... 71
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 82
	ANEXO I – Banco de Dados..... 106

ANEXO II – Meios de cultura.....	140
ANEXOIII - Publicações.....	146

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Aspecto da caatinga arbórea.....	6
2	Morfologia de <i>Coccidioides</i> spp. A - forma saprofítica B - forma parasitária.....	7
3	Distribuição de cepas de <i>Coccidioides immitis</i> e <i>C. posadasii</i> no Continente Americano.....	12
4	Mapas mostrando a ocorrência de coccidioidomicose no Brasil. A doença é limitada na região Nordeste, com áreas endêmicas nos Estados de Maranhão (MA), Piauí (PI), Ceará (CE) e Bahia (BA).....	14
5	Diagnóstico micológico do gênero <i>Coccidioides</i> . A - esférula madura contendo em seu interior numerosos endósporos.....	15
6	Corte histológico evidenciando esférula de <i>Coccidioides</i> spp. contendo em seu interior numerosos endósporos.....	16
7	Diagnóstico micológico do gênero <i>Coccidioides</i> aspecto macromorfológico de colônia em ágar-Sabouraud, mostrando colônias algodonosas de coloração branca após sete dias de incubação.....	17
8	Diagnóstico micológico do gênero <i>Coccidioides</i> . aspecto micromorfológico da cultura filamentosa, mostrando artroconídios intercalados por células disjuntoras.....	17
9	Estrutura química da anfotericina B.....	21
10	Estrutura química do cetoconazol, itraconazol e fluconazol.....	23
11	Modificações estruturais no fluconazol que originam o voriconazol.....	24
12	Estrutura química da caspofungina.....	25

13	Mecanismo de ação de drogas não antifúngicas sobre a célula fúngica.....	28
14	Estruturas químicas A - sulfametoxazol; B - trimetoprim.....	29
15	Estruturas químicas das principais drogas antituberculose utilizadas no tratamento da tuberculose.....	32
16	Sala de nível de biossegurança 3- Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM) da Universidade Federal do Ceará (UFC).....	42
17	Aspecto macromorfológico das cepas de <i>C. posadasii</i> estocadas na micoteca do CEMM.....	44
18	Preparação do inóculo. A - suspensão contendo solução salina estéril e artroconídios e hifas. B - Suspensão diluída em 1:10 com o meio RPMI 1640 contendo artroconídios e hifas.....	47
19	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do fluconazol frente a cepas de <i>C. posadasii</i>	51
20	Efeito da combinação de drogas antifúngicas em valores do índice da concentração inibitória mínima fracionada (FICI) frente a cepas de <i>Coccidioides posadasii in vitro</i>	63
21	Efeito da combinação de drogas antifúngicas em valores da média geométrica da concentração inibitória mínima (CIM).....	64
22	FICI para cada combinação de antimicrobianos testados frente a cepas de <i>C. posadasii</i>	69
23	Efeito da combinação de antimicrobianos em valores da média geométrica da concentração inibitória mínima (CIM).....	70

LISTA DE QUADROS

Quadro		Página
1	Resumo de algumas estratégias terapêuticas empregadas no tratamento da coccidioidomicose.....	20
2	Concentração inibitória mínima de drogas antifúngicas testadas isoladamente nas cepas de <i>Coccidioides posadasii</i>	34
3	Lista das cepas de <i>Coccidioides posadasii</i> estocadas na micoteca do CEMM.....	45
4	Concentrações de cada antimicrobiano testado nas cepas de <i>C. posadasii</i>	49
5	Concentrações testadas nas combinações dos antifúngicos ($\mu\text{g/mL}$).....	52
6	Concentrações testadas nas combinações entre drogas antituberculose (mg/mL) e drogas antifúngicas ($\mu\text{g/mL}$) frente a cepas de <i>C. posadasii</i>	53

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Concentração inibitória mínima (CIMs), anfotericina B (AMB), cetoconazol (KTC), itraconazol (ITC), fluconazol (FLC), voriconazol (VRZ) e caspofungina (CAS), frente a 18 cepas de <i>C. posadasii</i>	59
2	Concentração inibitória mínima (CIMs) da rifampicina (RIF), isoniazida (INH), etambutol (ETB) e pirazinamida (PZA) frente a 15 cepas de <i>C. posadasii</i>	60
3	Concentração inibitória mínima (CIMs), índice da concentração inibitória mínima fracionada (FICI) e efeito de interação para combinação das drogas antifúngicas ($\mu\text{g/mL}$) nas cepas de <i>Coccidioides posadasii in vitro</i>	62
4	Concentração inibitória mínima (CIM) de sulfametoxazol com trimetoprim ($\mu\text{g/mL}$) associado ou não a anfotericina B ($\mu\text{g/mL}$) frente a 18 cepas de <i>C. posadasii</i>	66
5	CIMs, FICI e efeito de interação <i>in vitro</i> da combinação entre drogas antifúngicas ($\mu\text{g/mL}$) e drogas antituberculose (mg/mL) frente a cepas de <i>C. posadasii</i>	68

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

AMB	Anfotericina B
CAS	Caspofungina
CEMM	Centro Especializado em Micologia Médica
CIM	Concentração inibitória mínima
CFM	Concentração fungicida mínima
CLSI	<i>Clinical and laboratory Standards Institute</i>
DMSO	Dimetil sulfóxido
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
ETB	Etambutol
FLC	Fluconazol
FICI	<i>Fractional inhibitory concentration index</i>
FIC	<i>Fractional inhibitory concentration</i>
IL	<i>Interleukin</i>
ITC	Itraconazol
INH	Isoniazida
KTC	Cetoconazol
PZA	Pirazinamida
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
RIF	Rifampicina
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
UFC/mL	Unidade formadoras de colônias por mililitro
VRZ	Voriconazol

1 INTRODUÇÃO

A coccidioidomicose é uma doença crônica com comprometimento pulmonar, que acomete o homem e alguns animais domésticos, além de roedores silvestres (WANKE, 2005). A doença é causada pelos fungos dimórficos endêmicos *Coccidioides immitis* e *C. posadasii*, sendo adquirida após inalação de poeira contaminada com artroconídios, formados por esses organismos durante a fase filamentosa (FISHER et al., 2002a; SAUBOLLE et al., 2007). O Brasil está na relação de países com áreas endêmicas da coccidioidomicose (RESTREPO, 2006), circunscritas às zonas do semiárido da região do Nordeste (COX & MAGEE, 2004). Esse cenário leva a uma investigação de novas alternativas terapêuticas com a finalidade de ampliar o espectro de ação de cada droga, reduzir a dose dos antifúngicos e o tempo de tratamento, assim como evitar o surgimento de resistência e potencializar a ação dos fármacos.

No Brasil, trata-se de um agravo inusitado, cujos casos não são notificados de forma compulsória ao setor de vigilância epidemiológica (RESTREPO, 2006; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008). Portanto, segundo o Ministério da Saúde (2008), torna-se imperativo que esta micose sistêmica entre no diagnóstico diferencial de agravos com quadros clínicos semelhantes, uma vez que a coccidioidomicose apresenta sinais e sintomas inespecíficos, podendo simular quadros de tuberculose (CASTAÑEDA-GODOY & LANIADO-LABORIN, 2002) que é endêmica no Brasil e viroses respiratórias.

1.1 Aspectos históricos da coccidioidomicose

Existem quatro relatos independentes na literatura que registram os casos de coccidioidomicose.

O primeiro caso aconteceu em 1888. O estudante de Medicina Alejandro Posadas atendia no Hospital Universitário de Buenos Aires, ao paciente Domingo Ezcurra, de 32 anos de idade, procedente da região da Pampa Central do nordeste da Argentina, e membro da cavalaria montada. A consulta era motivada pela presença de lesões progressivas na pele (rosto e membros), de um ano de evolução e que estavam acompanhadas de perda de peso,

aumento dos gânglios linfáticos periféricos e de problemas pulmonares (NEGRONI, 2008). Com um possível diagnóstico clínico de micose fungóides (caracterizada por tumorações na pele), Alejandro Posadas e Robert Wernicke examinaram ao microscópio a biopsia das lesões e observou a presença de células esféricas de tamanhos diversos, com membrana externa aparentemente dupla e conteúdo granular. Pensaram que, provavelmente, se tratava de um protozoário capaz de provocar tumores e nomearam o microrganismo de *Psororpermia* e as estruturas observadas de esporângios (ODDS, 2003a; COX & MAGEE, 2004). Domingo Ezcurra faleceu cinco anos mais tarde, em decorrência de complicações da forma disseminada da coccidioidomicose (ODDS, 2003a). Nos anos seguintes, Alejandro Posadas dedicou o seu trabalho de doutoramento à descrição completa do caso e necropsia do paciente, e levou a cabo numerosos e valiosos estudos experimentais com este microrganismo (HIRSCHMANN, 2007).

O segundo caso conhecido da doença aconteceu em 1893, esta vez no Hospital da cidade de San Francisco, Califórnia, Estados Unidos. O Dr. Ellingwood examinava o paciente João Furtado-Silveira, emigrante procedente das Ilhas Açores, mas que havia emigrado para o Vale de San Joaquim, na Califórnia (ODDS, 2003a), onde se dedicava à agricultura. O paciente apresentava múltiplas lesões na pele, de tipo tumoral e progressivo, com cinco anos de evolução, além de lesões oculares e nasais. Furtado faleceu anos mais tarde em decorrência de complicações da forma disseminada da coccidioidomicose (NEGRONI, 2008). A biopsia das lesões foi examinada por Rixford, do *Cooper Medical College*, e Gilchrist, da *John Hopkins University*, os quais evidenciaram a presença de microrganismos similares ao protozoário descrito por Alejandro Posadas (COX & MAGEE, 2004; HIRSCHMANN, 2007). Microscopicamente, as células eram arredondadas, de paredes grossas e de tamanho variado, as quais foram denominadas de esférulas e o conteúdo interno de endósporos (ODDS, 2003a). O microrganismo mostrou-se semelhante aos organismos à classe Sporozoa, gênero *Coccidia*. Posteriormente, o protozoólogo Stiles denominou o microrganismo de *Coccidioides immitis* (ODDS, 2003a).

O terceiro caso aconteceu em 1900. Ophüls e Moffit descobriram a natureza fúngica do agente etiológico da coccidioidomicose, quando observaram que os cultivos de material de autopsia procedentes de outro caso fatal, decorrente do mesmo microrganismo, apresentavam formação de micélio fúngico em cultivos e que, ao ser inoculado em cobaias, produziam lesões nas quais se evidenciavam as mesmas esférulas presentes nos tecidos dos

pacientes (NEGRONI, 2008). Ophüls e Moffit observaram a morfologia do microrganismo em cultivos à temperatura ambiente, notando microscopicamente formas retangulares cujo número aumentava com o envelhecimento celular. Posteriormente, os pesquisadores relacionaram essas estruturas de artroconídios (COX & MAGEE, 2004). A variação entre os aspectos do microrganismo no tecido e no cultivo revelou a existência de duas formas diferentes para o mesmo microrganismo, fenômeno denominado dimorfismo. Observações em microscópio revelaram a presença das estruturas parasitárias já conhecidas e ausência de micélio fúngico (COX & MAGEE, 2004). Em 1905, Ophüls descreveu detalhadamente a natureza dimórfica do fungo *Coccidioides immitis*, baseado em experimentos *in vitro* e *in vivo* (WANKE et al., 1999).

O quarto caso aconteceu em 1931. Àquela época a coccidioidomicose era conhecida apenas em sua forma disseminada como doença rara e sempre fatal, e era denominada granuloma coccidióidico (COX & MAGEE, 2004; NEGRONI, 2008). Não obstante, este conceito mudaria, com o quadro clínico exibido por Harol Chope, um estudante de Medicina que realizava pesquisa sobre coccidioidomicose no laboratório do professor Ernest Dickson. Harol Chope abriu acidentalmente uma placa de petri contendo o fungo na sua forma filamentosa, que tinha vários meses de incubação. Após nove dias, Chope apresentou quadro de pneumonia com dor pleurítica, febre, tosse, hemoptise e perda de peso (COX & MAGEE, 2004). Depois de um mês de evolução da doença, o estudante apresentou nódulos eritematosos nos membros inferiores. O diagnóstico de granuloma coccidióidico foi estabelecido após visualização de esférulas em amostras de escarro. Apesar do prognóstico, Chope apresentou melhora clínica e completa remissão dos sinais e sintomas da doença. Foi assim que, com este acontecimento, se abriu margem do conhecimento do espectro, das manifestações clínicas desta micose, desde uma doença grave e fatal, até uma infecção benigna e autolimitada (HIRSCHMANN, 2007).

Após esses quatro acontecimentos importantes para a definição da coccidioidomicose, surgiram outros casos da doença. Em 1937, Dickson apresentou, além do caso do Chope, quatro outros casos da forma benigna da doença, caracterizada por sintomas pulmonares agudos e eritema nodoso. O quadro apresentado por Chope foi denominado febre do vale e o termo coccidioidomicose foi então proposto por Dickson para todas as formas infecciosas causada por *Coccidioides immitis* (COX & MAGEE, 2004). Atualmente a doença possui inúmeras denominações relacionadas com o local em que é adquirida, como: febre do

vale, febre de San Joaquin, febre do deserto, febre da Califórnia, ou com manifestações clínicas que apresenta, por exemplo, reumatismo do deserto e granuloma coccidióidico (RESTREPO, 2006).

A importância do estudo da coccidioidomicose aumentou durante as décadas de 1930 e 1940; na década de 1930, com o fluxo de imigrantes do meio-oeste que chegaram ao Vale de San Joaquin – Califórnia, Estados Unidos, para escapar da seca e procurar emprego agrícola; e na década de 1940, com a entrada de milhares de militares no deserto para formação de tropas durante a Segunda Guerra Mundial. Estes fatos influenciaram a realização de vários estudos sobre o agente etiológico da coccidioidomicose (HIRSCHMANN, 2007).

Graças a estudos posteriores realizados por Smith et al. (1946), que efetuaram testes intradérmicos com um produto derivado de cultivos do fungo na sua forma micelial (coccidioidina), restou demonstrado que a infecção subclínica, em residentes de áreas endêmicas, era muito mais frequente do que se pensava, em razão do grande número de pessoas que tinha reação ao produto. Uma década mais tarde, demonstrar-se-ia que mais da metade da população do Valle de San Joaquín apresentava reatividade aos antígenos do fungo (RESTREPO, 2006).

Até o final da década de 1970, o Brasil era considerado área indene para a coccidioidomicose. O primeiro caso da doença no país foi descrito por Gomes et al. (1978), em paciente natural de Pirapiranga, região do semiárido do Estado da Bahia. Um ano depois, Vianna et al. (1979) descreveram o segundo caso autóctone da doença em paciente originário da cidade de Floriano, no Estado do Piauí. Após 18 anos, a doença foi novamente relatada, por Kuhl et al. (1996), em caso ocorrido em 1989, acometendo paciente provindo do Município de Jaguaribara, no Estado do Ceará. A fim de avaliar o índice de reatividade a antígenos do fungo naquele Município, Diogenes et al. (1995) realizaram inquérito epidemiológico com esferulina em 87 moradores da localidade de Poço Comprido (Jaguaribara, Ceará). O estudo demonstrou índice de reatividade ao antígeno de aproximadamente 12%, sugerindo, assim, a existência de coccidioidomicose- infecção no Estado do Ceará.

Desde 1978, cerca de 96 casos da doença foram notificados, procedentes dos Estado do Maranhão, Piauí, Ceará e Bahia (WANKE et al, 1999, 2005; SIDRIM et al., 1997; CORDEIRO et al., 2010) Ceará – 19 casos (FECHINE, 2005; CORDEIRO et al., 2010), Piauí – 69 casos, Maranhão – 6 casos e Bahia – 2 casos (EULÁLIO, 2006). O primeiro surto epidêmico de coccidioidomicose ocorreu em 1991, no Município de Oeiras, Estado do Piauí, onde três indivíduos e oito cães apresentaram quadro respiratório agudo após participarem de uma caçada a tatus (WANKE, 1994). Posteriormente, Sidrim et al. (1997) e Silva et al. (1997) relataram o segundo surto epidêmico de coccidioidomicose no Brasil, ocorrido no Município de Aiuaba, região sudoeste do Estado do Ceará, onde quatro homens e dois cães apresentaram a forma pulmonar da doença após caça a tatus.

1.2 O gênero *Coccidioides*

Até 2002, a literatura reconhecia a existência do *C. immitis* como o único agente etiológico da coccidioidomicose. Após este ano, Fisher et al. propuseram a existência de duas espécies distintas, *C. posadasii* e *C. immitis*, baseado nas análises moleculares com marcadores do tipo microssatélites, capazes de diferenciar estas duas espécies com precisão. O gênero *Coccidioides* é constituído por duas espécies *C. immitis* e *C. posadasii*, os quais são fungos dimórficos térmicos endêmicos, e indistinguíveis por meio de análises morfológicas (COX & MAGEE, 2004). Tais espécies estão agrupadas na família Onygenaceae, a qual também compreende os patógenos dimórficos *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum* e *Blastomyces dermatitidis* (BAGAGLI et al., 2006). Existem várias estratégias laboratoriais que permitem diferenciar as espécies de *C. immitis* e *C. posadasii*, temos assim, a análise de polimorfismos de microssatélites (FISHER et al. 2002a, 2000b), a reação de PCR (UMEYAMA et al., 2006) e a técnica de TaqMan Real-Time PCR proposta Sheff et al. (2010).

As espécies do gênero *Coccidioides* são fungos geofílicos, cujo habitat primário corresponde a ambientes semiáridos e desérticos, com temperatura média acima de 30°C, e solos com elevada salinidade e pH alcalino (COX & MAGEE, 2004) (Figura 1-A).

Habitualmente o gênero *Coccidioides* cresce numa profundidade entre 5 e 30 cm da superfície do solo.

No Brasil, a maioria dos casos notificados da doença teve como vínculo epidemiológico o hábito de escavar tocas de tatus (Figura 1-B) das espécies *Dasyus novemcinctus* (WANKE et al., 1999; EULÁLIO, 2001; DA COSTA et al., 2001). Amostras do solo coletadas próximo às tocas desses animais, no Município de Solonópole, Estado do Ceará, forneceram culturas de *C. posadasii* (CORDEIRO, 2006d).

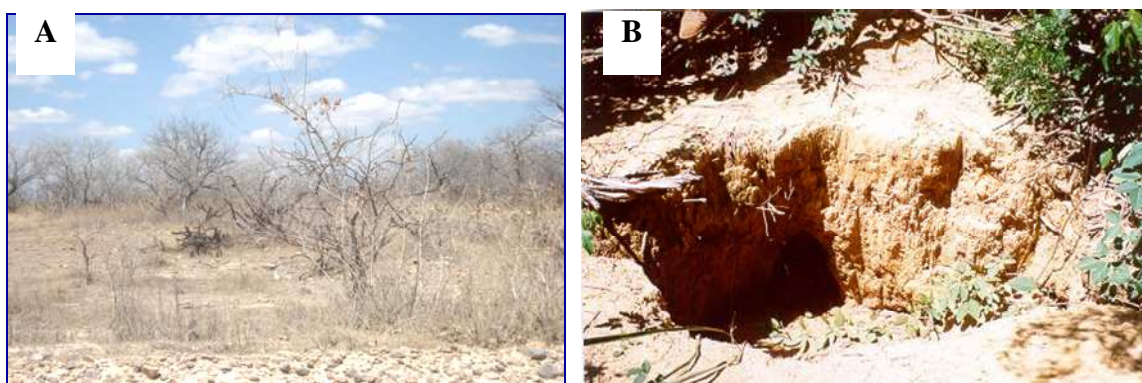
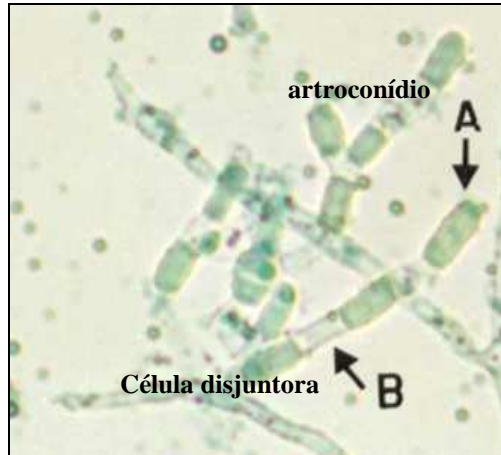


Figura 1. A- Aspecto da caatinga arbórea; B- Toca do tatu. Foto cedida pelo CEMM

O gênero *Coccidioides* apresenta duas fases, a saprofítica e a parasitária. A fase saprofítica (Figura 2- A) é a forma infectante e filamentosa do ciclo biológico deste fungo, na qual são formadas hifas hialinas que originam artroconídios intercalados por células desprovidas de material citoplasmático, denominadas disjuntoras (COX & MAGEE, 2004). Os artroconídios apresentam, em suas extremidades, restos de parede celular de células adjacentes (células disjuntoras), responsáveis por sua fácil veiculação aérea (PAIXÃO et al., 2004). Em razão destas características, a forma de transmissão é adquirida após inalação de poeira contaminada com artroconídios, formados por esses organismos durante a fase infecciosa (FISHER et al., 2001; 2002a).

A



7

B



Figura 2. Morfologia de *Coccidioides* spp. **A**- forma saprofítica **B**- forma parasitária. Fonte: Foto cedida pelo CEMM.

Já a fase parasitária (Figura 2- B), os artroconídios inalados se alojam nos pulmões, sofrem mudanças morfológicas e evoluem para esférulas num período de 120 horas; 12 a 24 horas depois se rompem e liberam mais de 800 endósporos nos tecidos circundantes; cada um com o potencial de se converter em uma nova esférula (BIALEK et al., 2004).

3 Patogenia e formas clínicas

O gênero *Coccidioides* é o agente fúngico mais virulento conhecido. Aparentemente, não existe predileção por sexo, raça e idade em humanos e animais no que diz respeito à doença primária, mas esses fatores diferem no tocante à evolução da doença (RESTREPO, 2006). A porta de entrada da coccidioidomicose no organismo é o trato respiratório (GALGANI et al., 2005). Após serem inalados pelo hospedeiro suscetível, os artroconídios atingem os pulmões onde crescem e são revertidos para esférulas com endósporos no seu interior, com a subsequente formação de granulomas epitelióides (SIDRIM & OLIVEIRA, 1999; PAIXÃO et al., 2004).

Um dos mecanismos de virulência do fungo decorre de uma glicoproteína da parede (SOWgp) nos endósporos, a qual é indispensável para o reconhecimento do sistema imunitário, e para a opsonização destas proteínas com anticorpos específicos. O fungo expressa também uma metaloproteinase (MEP1) que digere a glicoproteína na superfície dos endósporos, para evitar que sejam reconhecidas pelo sistema imunitário, sugerindo que a MEP1 desempenha um papel determinante na patogenicidade do gênero *Coccidioides* e contribui, assim, para a capacidade do patógeno de persistir no seu hospedeiro. A amônia produzida enzimaticamente pela urease das esférulas durante o ciclo parasitário de *C. posadasii* contribui para a exacerbação da infecção e aumenta sua virulência (MOROYOQUI & FIGUEROA, 2008). A presença de melanina é um importante fator de virulência, a qual tem sido evidenciado em artroconídios, esférulas e endósporos de *Coccidioides posadasii* (NOSANCHUK et al., 2007).

Quando inalados os artroconídios, estes se alojam nos alvéolos pulmonares e estimulam a primeira linha de defesa, que são os polimorfonucleares e macrófagos. A resposta inicial desenvolvida pelas estruturas infectantes do *Coccidioides* caracteriza-se por um influxo de polimorfonucleares, os quais produzem substâncias quimiotáticas como: interferon (IFN), [interleucinas](#) (IL) e fator de necrose tumoral (TNF), que desencadeiam o processo inflamatório e provocam maior resposta frente ao microorganismo; paralelamente, também se ativa o sistema de complemento (MOROYOQUI & FIGUEROA, 2008; MURTHY & BLAIR, 2009). Na fase de esférula a resposta inflamatória caracteriza-se por

uma infiltração mononuclear, a qual se mantém durante todo o processo infeccioso, podendo formar granulomas (CHILLER et al., 2003).

Os polimorfonucleares produzem substâncias quimiotáticas como: interferons (IFN), interleucinas (IL) e fator de necrose tumoral (TNF), que desencadeiam o processo inflamatório e provocam maior resposta ante o microorganismo; paralelamente, também se ativa o sistema de complemento (MOROYOQUI & FIGUEROA, 2008). Os macrófagos fagocitam os artroconídios, mas não podem provocar lise até que sejam ativados ou sensibilizados pelos linfócitos TH1, o que sucederá posteriormente, quando, depois de acudir ao chamado do polimorfonuclear e todas suas substâncias quimiotáticas, se encontram com os macrófagos e os convertam em células apresentadoras, mantendo assim o controle da infecção; os linfócitos TH1, por sua vez, ativarão aos linfócitos TH2, que ativaram a resposta humoral através da IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 que são fundamentais para combater o fungo na sua fase parasitária (SAUBOLLE et al., 2006; PARISH & BLAIR, 2008), no entanto, os linfócitos TH2 induzem uma baixa regulação das funções dos linfócitos TH1, aumentando assim a susceptibilidade da infecção por *Coccidioides* spp. (COX & MAGEE, 2004). Outras células que são ativadas pelas substâncias quimiotáticas são os eosinófilos e os mastócitos que liberam histamina e IgE em grandes quantidades.

Clinicamente, a coccidioidomicose se define como uma doença crônica, caquetizante, com anorexia progressiva e comprometimento pulmonar. Algumas vezes, pode haver disseminação para diversos outros órgãos e sítios. Ao exame físico geral, os sinais e sintomas são inespecíficos, podendo simular quadros de viroses respiratórias e tuberculose (GALGANI et al., 2005). O espectro de manifestações clínicas da coccidioidomicose é bastante amplo. Classicamente, existem quatro formas básicas da doença, a saber: forma assintomática, pulmonar aguda, pulmonar crônica, disseminada e cutânea primária (GALGANI et al., 1993, 2005).

A coccidioidomicose se define como uma doença crônica, caquetizante, com anorexia progressiva e comprometimento pulmonar. Algumas vezes, pode haver disseminação para diversos outros órgãos e sítios. Ao exame físico geral, os sinais e sintomas são inespecíficos, podendo simular quadros de viroses respiratórias e tuberculose (SIDRIM & OLIVEIRA, 1999). O espectro de manifestações clínicas da coccidioidomicose é bastante

amplo, podendo se manifestar como coccidioidomicose-infecção e coccidioidomicose-doença. A coccidioidomicose-infecção, se caracteriza por ser assintomática, correspondendo até 60% dos casos em indivíduos imunocompetentes, quase sempre de natureza benigna e resolução espontânea, o que dificulta o reconhecimento da infecção primária, sendo detectada apenas por testes sorológicos (SMITH et al., 1946; GALGIANI et al., 1993, 2005). A coccidioidomicose-doença, se manifesta com sintomas e sinais clínicos, e estímulo antigênico suficiente para despertar a produção de anticorpos circulantes (LACAZ et al., 1959), classicamente, existem quatro formas básicas da doença, a saber: forma pulmonar aguda, pulmonar crônica, disseminada e cutânea primária (GALGIANI et al., 1993, 2000, 2005).

A forma pulmonar aguda - a apresentação mais frequente acomete as vias respiratórias, simulando desde estados transitórios, como resfriados ou gripes, a quadros pneumônicos radiologicamente indistintos de pneumonia bacteriana (COX & MAGEE, 2004). Nos Estados Unidos, coccidioidomicose é considerada uma causa comum de pneumonia adquirida na comunidade (PAC), embora ainda subdiagnosticada (VALDIVIA et al., 2006). A infecção pulmonar progressiva apresenta semelhanças clínicas, radiográficas e histopatológicas com várias manifestações respiratórias agudas ou crônicas, como, por exemplo, a tuberculose pulmonar na fase aguda, devendo, portanto, ser estabelecido diagnóstico diferencial (CASTAÑEDA-GODOY & LANIADO-LABORIN, 2002).

Forma pulmonar crônica – aproximadamente 5% dos pacientes com pneumonia primária evolui a partir de primoinfecção cujos sintomas não regrediram após dois meses. Pode apresentar-se como: lesões nodulares ou cavitárias, doença pulmonar fibrocavitária ou disseminação miliar pulmonar, com manifestações clínicas e radiológicas inespecíficas (DE DEUS, 2009). Pela sua evolução crônica progressiva, constitui importante diagnóstico diferencial com a tuberculose pulmonar (STEVENS, 1995; CASTAÑEDA-GODOY & LANIADO-LABORIN, 2002).

A forma disseminada – pode ocorrer entre 1 a 5% dos indivíduos infectados com as espécies de *Coccidioides* (COX & MAGEE, 2004; CRUM et al., 2004; CRUM-CIANFLONE et al., 2006). A forma disseminada da doença continua a ser uma das manifestações graves entre os hospedeiros imunocomprometidos (GALGIANI et al., 1995, 1999; AQUILAR et al., 2001; BLAIR et al., 2008; FISHER et al., 2010; PFALLER & DIEKEMA, 2010); assumindo papel importante após o surgimento da AIDS (STEVEN, 1995). Sugere

a propagação hematogênica e ou/ linfática das espécies de *Coccidioides* para além do parênquima pulmonar. Clinicamente caracteriza-se por lesões pulmonares, além do comprometimento de vários órgãos, como articulações, nódulos linfáticos, olhos, sistema urogenital, pele, ossos, sistema nervoso central e coração (JOHNSON & EINSTEIN, 2006; RESTREPO, 2006).

Já a forma cutânea primária - ocorre após inoculação traumática de estruturas fúngicas e está associada a acidentes de laboratório (COX & MAGEE, 2004). Manifestações dermatológicas incluem pápulas, nódulos e placas verrucosas que podem evoluir para a formação de úlceras e abscessos (MOROYOQUI & FIGUEROA, 2008; NOOR et al., 2008). Em decorrência da diversidade clínica das lesões, a coccidioidomicose cutânea pode ser confundida com várias outras enfermidades e, desta forma, a confirmação laboratorial, mediante cultura e/ ou exame histopatológico das lesões, se faz necessária (AVILES-SALAS et al., 2007).

Com relação aos fatores de risco, a atividade ao ar livre é o principal fator de risco ocupacional, como ações laborais ou recreativas que levem ao revolvimento do solo, como caça a tatus e jardinagem, os quais podem colaborar para contrair a infecção (KIRKLAND & FIERER, 1996; SIDRIM & OLIVEIRA, 1999). Assim também a infecção pode ser adquirida fora das áreas endêmicas, via transporte de material contaminado, ou ser uma doença oportunista, principalmente em pacientes portadores de HIV, onde a disseminação da doença constitui sua maior complicação (SAUBOLLE et al., 2007). Outras formas de transmissão deste fungo ocorrem durante a fase trans-placentária e, quando ocorre, pode haver mortalidade neonatal (JOHNSON et al., 2008). O período de incubação é de uma a quatro semanas. Não é doença contagiosa de indivíduo a indivíduo (SAUBOLLE et al., 2007).

1.4 Epidemiologia da coccidioidomicose

A coccidioidomicose é uma doença endêmica restrita ao “Novo Mundo”. Estudos revelam que a coccidioidomicose ocorre em áreas limitadas do Continente Americano, entre 40°N 120°W no norte da Califórnia e 40°S 40°W no sul da Argentina (HECTOR et al., 2005; WANKE, 2005; RESTREPO, 2006). Com relação à distribuição das

espécies, *Coccidioides immitis* é localizada principalmente à região da Califórnia, enquanto *C. posadasii* possui distribuição ampla, sendo encontrada no sudoeste dos Estados Unidos, América Central e do Sul (RESTREPO, 2006) (Figura 3).



Figura 3. Distribuição de cepas de *Coccidioides immitis* e *C. posadasii* no Continente Americano. Fonte: Figura traduzida de FISHER et al., 2001.

Até 1992, a literatura reconhecia a existência de áreas endêmicas da doença em nove países: Estados Unidos, México, Honduras, Guatemala, Colômbia, Venezuela, Bolívia, Paraguai e Argentina. Apenas em 1998 o Brasil foi incluído na relação internacional de países com áreas endêmicas da doença, com zonas circunscritas ao semiárido da região do Nordeste brasileiro (WANKE et al., 1999; EULÁLIO et al., 2001), compartilhando características climáticas com as demais regiões endêmicas para a doença no mundo (WANKE et al., 1999).

A coccidioidomicose possui maior incidência nos Estados Unidos, onde se estimam 100.000 casos anuais, sendo endêmica na Califórnia e Arizona. Nos últimos 15 anos, a incidência de infecções por *Coccidioides* no Arizona aumentou de cerca de 12 novos casos por 100.000 habitantes em 1995 para 58,2 novos casos por 100.000 habitantes em 2005 (PARISH & BLAIR, 2008). Este aumento seria possivelmente em razão do número de pessoas que se deslocam em áreas endêmicas, a crescente população de imunodeprimidos e a construção em áreas anteriormente desérticas (CASTAÑÓN-OLIVARES et al., 2004; PARISH & BLAIR, 2008). Focos endêmicos também são encontrados no México, Honduras, El Salvador, Guatemala, Argentina, (LANIADO-LABORIN, 2005; MOROYOQUI & FIGUEROA, 2008), Paraguai, Venezuela, Colômbia, Bolívia, e Brasil (RESTREPO, 2006; BAPTISTA-ROSAS et al., 2007).

Aqui no Brasil, cerca de 96 casos da doença foram notificados, procedentes dos Estado do Maranhão, Piauí, Ceará e Bahia (WANKE et al, 1999, 2005; SIDRIM et al., 1997; CORDEIRO et al., 2010). No Ceará, desde então, foram descritos 19 casos da doença (CORDEIRO et al., 2010), em pacientes oriundos dos Municípios de Aiuaba (1995), Independência (1999), Boa Viagem (2001), Solonópole (2001, 2003), Catunda (2002), Santa Quitéria (2002, 2003), Arneiroz (2004), Ibiapina (2005), (FECHINE, 2005) e, recentemente, nos Municípios de Sobral (2006), Jaguaribe (2007) e, Parambu (2007) (TOGASHI et al., 2009; CORDEIRO et al., 2010) (Figura 4), incluindo um caso de coccidioidomicose disseminada (BRILHANTE et al., 2008).

Recentemente, Cordeiro et al. (2009) realizaram um inquérito sorológico com antígeno comercial de *Coccidioides posadasii* pela técnica de imunodifusão (ID) em 229 voluntários no Nordeste do Brasil. O estudo demonstrou índice de reatividade ao antígeno em 15 indivíduos sem diagnóstico clínico da doença e dois indivíduos em tratamento para coccidioidomicose. Os dados destes estudos sugerem a importância da realização de levantamentos epidemiológicos para coccidioidomicose, a fim de compreender a prevalência desta doença no Brasil (CORDEIRO ET AL., 2009). Casos da coccidioidomicose no Nordeste brasileiro, tem sido relatado por diversos autores como Martins et al. (1997); Moraes et al. (1998); Silva et al. (1999); Veras, (2003); Fechine, (2005); Cordeiro et al. (2006a, 2009, 2010).

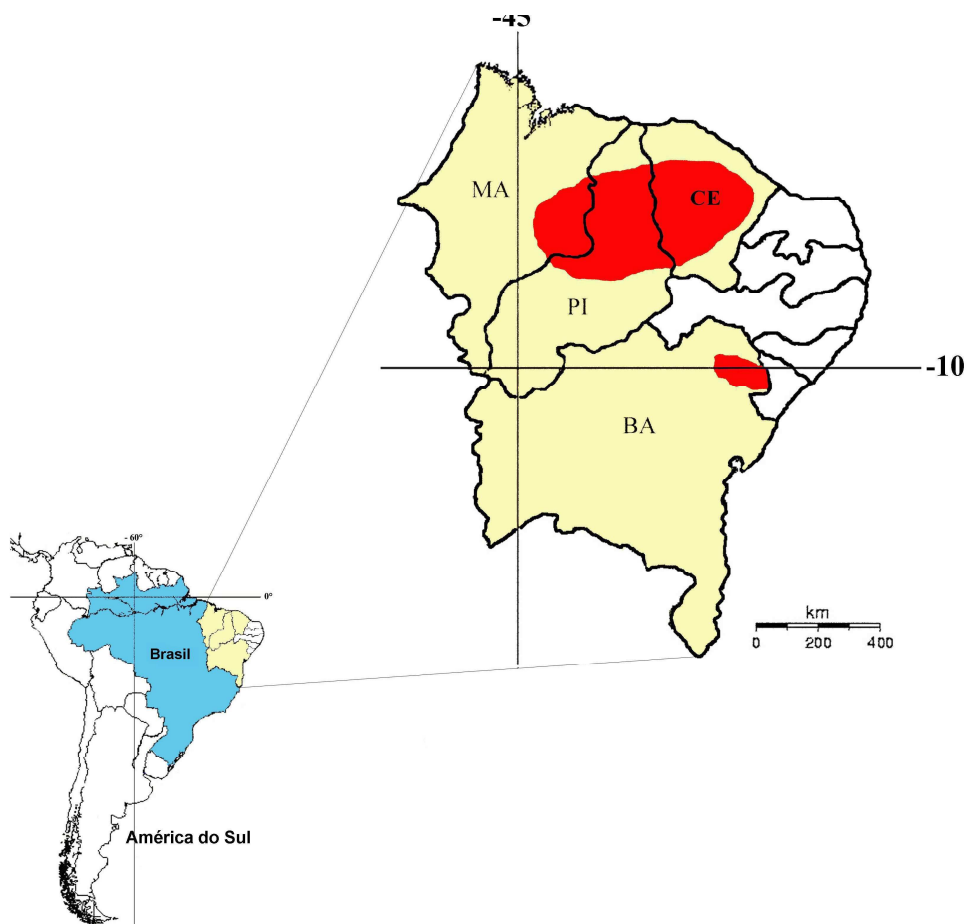


Figura 4. Mapas mostrando a ocorrência de coccidioidomicose no Brasil. A doença é limitada na região Nordeste, com áreas endêmicas nos Estados de Maranhão (MA), Piauí (PI), Ceará (CE) e Bahia (BA). Fonte: CORDEIRO, Tese (Doutorado em Ciências Médicas). Universidade Federal do Ceará, 2006d.

1.5 Diagnóstico

O diagnóstico da coccidioidomicose é realizado por meio da junção dos dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. Este último é imprescindível para o diagnóstico definitivo, baseado em técnicas micológicas, histopatológicas, moleculares e imunológicas (BLAIR et al., 2006; SAUBOLLE et al., 2007).

O exame direto consiste na visualização de amostras clínicas em preparações do tipo lâmina-lamínula visualizados na microscopia óptica. Ao exame direto, as espécies de *Coccidioides* apresentam-se na forma de esférulas, medindo entre 10 e 80µm de diâmetro, contendo em seu interior numerosos endósporos de 2 a 5µm de diâmetro, limitados por uma parede espessa (Figura 5). A visualização destas estruturas é patognomônica da infecção (STEVENS, 1995).

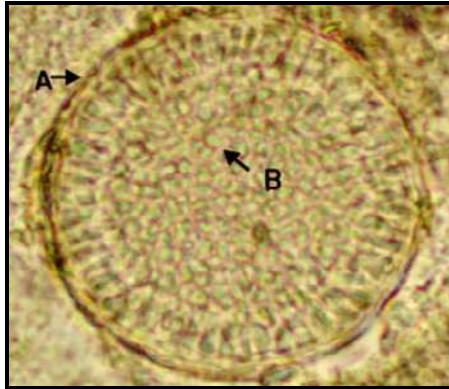


Figura 5. Diagnóstico micológico do gênero *Coccidioides*. **A-** esférula madura contendo em seu interior numerosos endósporos (**B**). Fonte: Foto cedida pelo CEMM, 2010.

A pesquisa do *Coccidioides* pode ser realizada em secreções respiratórias, tais como escarro e lavado broncoalveolar, líquido cefalorraquidiano, aspirados de lesões ósseo-articulares, líquido pleural, além de biopsias de pele e tecido pulmonar (GALGIANI, 1993). A exploração microscópica do escarro é positiva em 10% dos casos (CATANZARO, 2004). No caso de suspeita clínica, e de não obter uma amostra clínica de escarro adequada, são necessários outros materiais, como lavado broncoalveolar ou escovado brônquico (SUTTON, 2007).

O exame direto realizado com hidróxido de potássio (KOH) é um método rápido e facilmente disponível. A coloração da prata de Grocott - metanamina é a mais sensível para identificar fungos em preparações histopatológicas, no entanto pode ser difícil observar e diferenciar endósporos dentro de esférulas e confundir com muco e grânulos de glicogênio. Outras colorações histológicas usadas são a coloração fluorescente de calcofluor white (CaF), a coloração ácida de Shiff, Hematoxilina – Eosina (Figura 6), coloração de Giemsa e Papanicolau (MOROYUQUI & NAVARRO, 2008).

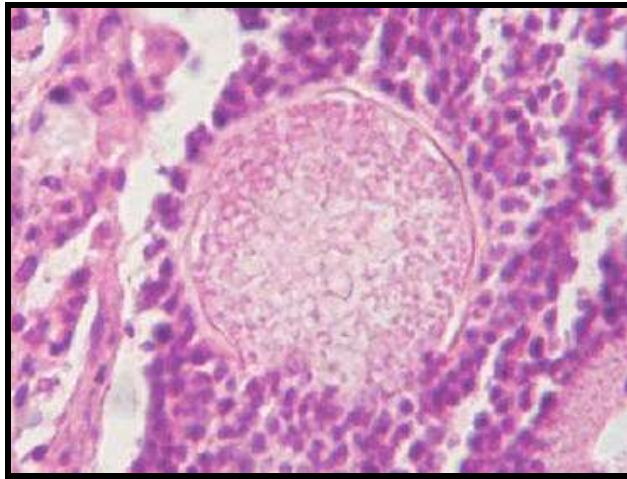


Figura 6. Corte histológico evidenciando esférula de *Coccidioides* spp. contendo em seu interior numerosos endósporos. Fonte: NEGRONI, R. 2008.

O cultivo do microrganismo continua sendo padrão ouro para o diagnóstico laboratorial definitivo das doenças infecciosas, porém é uma prática evitada, quando se trata de *Coccidioides*, em razão do risco inerente à manipulação de culturas do fungo. O diagnóstico micológico da coccidioidomicose está restrito a laboratórios com nível de contenção biológica 3 (COX & MAGEE, 2004; SUTTON, 2007).

Quando os espécimes clínicos são semeados em ágar-Sabouraud e incubados a temperatura de 25°C, as espécies de *Coccidioides* apresentam um desenvolvimento, após sete a dez dias de incubação (PAIXÃO et al., 2004). As colônias são brancas e algodonosas (Figura 7). O pigmento do reverso da colônia pode variar entre branco e creme (COX & MAGEE, 2004).

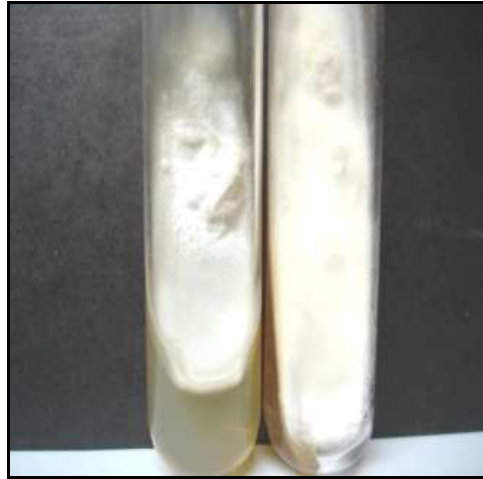


Figura 7. Diagnóstico micológico do gênero *Coccidioides* aspecto macromorfológico de colônia em ágar-Sabouraud, mostrando colônias algodonasas de coloração branca após sete dias de incubação. Fonte: Foto cedida pelo CEMM , 2010.

O aspecto micromorfológico desse fungo, na forma filamentosa, caracteriza-se pela presença de hifas hialinas septadas, nas quais são produzidos artroconídios de 2,5 a 4 μ m de largura por 3 a 6 μ m de comprimento que são descritos como “forma de barril” de parede celular espessa intercalado por células disjuntoras (Figura 8) (SAUBOLLE et al., 2007; JOHNSON et al., 2008).

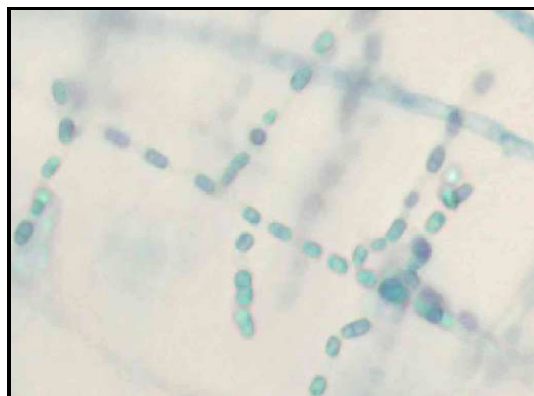


Figura 8. Diagnóstico micológico do gênero *Coccidioides*. aspecto micromorfológico da cultura filamentosa, mostrando artroconídios intercalados por células disjuntoras. Fonte: Foto cedida pelo CEMM, 2010.

Tradicionalmente, a confirmação do diagnóstico laboratorial da coccidioidomicose era realizada pela reversão da forma filamentosa para a parasitária do fungo, a qual pode ser realizada em animais de laboratório ou em meio de cultura de reversão (PAIXÃO et al., 2004). Com relação aos meios de cultura, a forma parasitária é difícil de ser obtida *in vitro* porque a reversão filamentosa para a forma leveduriforme, que classicamente é norteadada apenas pelo fator temperatura, é um pouco mais complicada, pois, além da temperatura, outros fatores, como a aeração, devem ser considerados. Pode-se utilizar o meio de cultura líquido de Converse, modificado por Levine, que contém uma mistura de sais, glicose. Outro meio de cultura recomendado é o meio sintético RPMI 1640 e do detergente N-tamol, a qual foi proposta por Petkus et al. (1985) para conversão do *Coccidioides*.]

A detecção molecular pelo método da reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma importante ferramenta complementar ao diagnóstico em centros de referência nos EUA (BIALEK et al., 2004). Uma vantagem adicional dessa abordagem é a possibilidade de realizar testes diretamente de amostras clínicas, como mostrado por Cordeiro et al. (2007), os quais mostraram que a técnica de PCR é um excelente método de diagnóstico rápido e específico da coccidioidomicose em amostra de escarro. O diagnóstico molecular, por sua vez, embora envolva menor risco biológico, ainda possui aplicação limitada pelo seu custo elevado (ASSI et al., 2006; BINNICKER et al., 2007; TINTELNOT et al., 2007).

Com relação aos testes sorológicos, em razão da periculosidade do fungo, os testes sorológicos são ferramentas complementares que auxiliam o diagnóstico da doença (PAPPAGIANIS, 2001; WHEAT, 2007), além do seu valor diagnóstico, podem revelar informações importantes sobre a epidemiologia da doença em uma dada região (DICAUDO, 2006; AMPEL et al., 2009). As técnicas imunológicas como, a técnica de imunodifusão em gel, contraímunoelctroforese, fixação do complemento, aglutinação em latex e ELISA (SAUBOLLE et al., 2007; DURKIN et al., 2008; CORDEIRO et al., 2009) possuem diferentes níveis de sensibilidade e especificidade e a sua implementação em laboratórios de rotina clínica é dependente, ainda, do custo dos reagentes, exequibilidade e reprodutibilidade das técnicas (CORDEIRO, 2006d), porém a imunodifusão dupla é mais prática, rápida e de menor custo (SAUBOLLE et al., 2007). No Brasil, o diagnóstico imunológico da coccidioidomicose tradicionalmente é realizado mediante a técnica de imunodifusão radial dupla, utilizando o antígeno comercial (*Immy Immunodiagnosics*, EUA), extraído de cepas norte-americanas de espécies de *Coccidioides*. No Ceará, desde 2006, o Centro Especializado

em Micologia Médica (CEMM), centro de referência em micologia médica no estado, vem utilizando antígeno próprio, oriundo de cepas locais de *C. posadasii*, extraído por Cordeiro et al. (2009, 2010), o qual tem apresentado resultados satisfatórios no imunodiagnóstico como mostrado por Brilhante et al. (2008), que evidenciaram a reatividade deste antígeno frente a anticorpos presentes no líquido pericárdico e soro de paciente com quadro de coccidioidomicose extrapulmonar.

1.6 Tratamento

O tratamento da coccidioidomicose depende da forma clínica apresentada (DICAUDO, 2006). As principais drogas antifúngicas utilizadas são a anfotericina B e alguns derivados azólicos tais como cetoconazol, itraconazol e fluconazol (GALGIANI et al., 2000, 2005; DICAUDO, 2006). O Ministério da Saúde, (2008) recomenda o tratamento com anfotericina B, 1 a 3g, dose total, seguido por fluconazol, 400mg/dia, por 6 a 12 meses ou itraconazol, 300mg/dia, pelo mesmo período, sendo o fluconazol especialmente indicado nas formas que comprometem o sistema nervoso central, em razão da excelente difusão cerebral.

O critério de cura da coccidioidomicose é clínico, agregado à negatificação do exame micológico. Porém a existência das diversas formas clínicas e do curso imprevisível da coccidioidomicose dificultam a indicação de esquemas terapêuticos específicos para cada situação (STEVENS, 1995; CHILLER et al., 2003), originando assim controvérsias sobre o tratamento adequado (GALGIANI et al., 2000, 2005). Diante deste problema, atualmente não existe um consenso quanto a abordagem terapêutica da coccidioidomicose, porém o quadro 1 resume algumas condutas terapêuticas sugeridas por alguns autores.

Quadro 1 - Resumo de algumas estratégias terapêuticas empregadas no tratamento da

A presença de micose.	Indicações especiais	Tratamento
INFECCÃO RESPIRATÓRIA PRIMÁRIA	Paciente imunocompetente, risco de disseminação ausente.	-Observação (GALGIANI et al., 2005). -Fluconazol (400mg/dia) ou itraconazol (200mg/dia), 3-6 meses (DERESINSKI, 2001).
	Paciente imunossuprimido (AIDS), transplantado, alta dose de corticosteróides, ou receptor de inibidores de (TNF), <i>diabetes mellitus</i> ou preexistência de doença cardiovascular	-Azóis de 200-400mg/dia, 3-6 meses (GALGIANI et al., 2005).
	Durante a gravidez (3º semestre de gestação) ou imediatamente após o parto	-Anfotericina B (0,5-0,7mg/kg/dia) (GALGIANI et al., 2005). -Anfotericina B ou fluconazol, várias semanas (GALGIANI et al., 2005).
	Pneumonia difusa	-Caspofungina (inicialmente 70mg/dia e em seguida 50mg/dia) e fluconazol 400mg/dia (PARK et al., 2006). -Anfotericina B, substituição de um dos azóis após melhora clínica, tratamento pelo menos de um ano (DERESINSKI, 2001).
PNEUMONIA CRÔNICA	Sintomática	-Fluconazol (400mg/dia) ou itraconazol (200mg/dia) pelo menos um ano ou ressecção cirúrgica (GALGIANI et al., 2005; DERESINSKI, 2001).
INFECCÃO DISSEMINADA	Não meníngea	-Fluconazol ou itraconazol (400mg/dia) (GALGIANI et al., 2005). -Posaconazol (400mg/dia) duas vezes diárias (GALGIANI et al., 2005; WOLLINA et al., 2009). -Itraconazol (HOMANS & SPENCER, 2010) -Voriconazol (200mg/dia), pelo resto da vida (PRABHU et al., 2004). -Posaconazol (400mg/dia) até 6 meses (CATANZARO et al., 2007). -Posaconazol (400mg/dia), até 6 meses (CATANZARO et al., 2007).
	Evolução rápida e/ou infecção em lugares críticos tais como a coluna vertebral	-Anfotericina B (0,5- 0,7mg/kg/dia) (GALGIANI et al., 2005).
	Durante a gestação (3º semestre gestacional) ou pós-parto	-Fluconazol ou itraconazol (400mg/dia) Anfotericina B (CRUM & BALLON- LANDA, 2006).
	Receptor de transplante renal	-Caspofungina (50mg/dia) por 1 mês seguidamente fluconazol (200mg/dia) por 6 meses (ANTONY, 2004).
	Meningite	-Fluconazol (\geq 400mg/dia), pelo resto da vida (GALGIANI et al., 2005). -Fluconazol (\geq 400mg/dia) ou itraconazol (\geq 200mg/dia duas vezes diariamente). Terapia por resto da vida pode ser requerida (DERESINSKI, 2001). -Anfotericina B (3mg/kg/dia) e voriconazol (200mg/dia) por 16 meses, seguidamente voriconazol (200mg/dia), pelo resto da vida (ANTONY et al., 2006). -Dosagens progressivas de voriconazol; tratamento mais de 2 anos (CORTEZ et al., 2003). -Voriconazol (400mg duas vezes diariamente) por 30 meses, seguidamente terapia pelo resto da vida com 200mg duas vezes diariamente (PROIA & TENORIO, 2004).

Os derivados azólicos (Figura 10) são drogas que possuem amplo espectro de atividade antifúngica. O mecanismo de ação destas drogas reside na inibição das enzimas oxidativas associadas ao citocromo P450 (CYP3A4 e CYP2C9) nas células fúngicas. Nessas células, os azólicos interferem com a biossíntese do ergosterol, inibindo a enzima responsável pela demetilação do lanosterol em ergosterol, a lanosterol 14- α - demetilase. Este fenômeno origina um acúmulo de precursores, ocorrendo também uma depleção do ergosterol. Esta interferência causa anomalias na permeabilidade da membrana fúngica (CATALÁN & MONTEJO, 2006).

O cetoconazol ainda está no mercado, mas é uma droga com certa toxicidade, podendo interferir na esteroidogênese humana e, de forma rara, causar hepatite fulminante. Cetoconazol, na dose de 200 a 600mg/ dia, tem sido usado nos casos de coccidioidomicose disseminada, no entanto, essas doses, parece suprimirem, porém não erradica *Coccidioides immitis* e *C. posadasii* (CATANZARO et al., 1982). Esta droga é recomendado para o tratamento de formas crônicas de coccidioidomicose (GALGIANI et al., 2000).

O fluconazol, na dose de 400mg/dia, podendo chegar a 1200mg/dia, é utilizado com resultados satisfatórios, mas tem apresentado grande incidência de recidiva. O fluconazol é facilmente administrado por via endovenosa, tem excelente biodisponibilidade, alcançando boas concentrações em diferentes fluídos orgânicos, inclusive no líquido cefalorraquiano além de possuir discreta interação medicamentosa. Essas características fazem do fluconazol a droga de escolha para o tratamento da meningite coccidióidica (DERESINSKI, 2001; GALGIANI et al., 2005).

O itraconazol, na dose de 400 - 600mg/dia tem apresentado resultados um pouco superiores que o fluconazol nas formas disseminadas da coccidioidomicose sem envolvimento do sistema nervoso central e com menor taxa de recidiva (GALGIANI et al., 2005). O itraconazol é claramente melhor tolerado do que o cetoconazol. Ensaio iniciais demonstraram alta taxa de resposta e menor recaída com o itraconazol em relação ao cetoconazol. Na dose inicial de 100 - 200mg duas vezes ao dia, tornou-se a droga de escolha no tratamento da coccidioidomicose (GALGIANI et al., 2005).

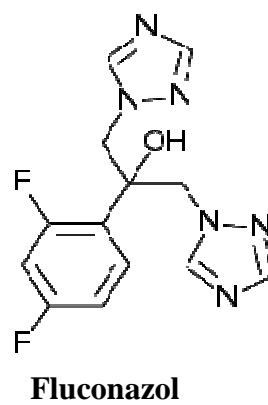
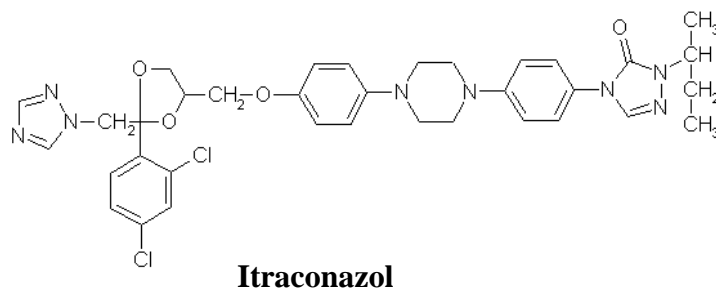
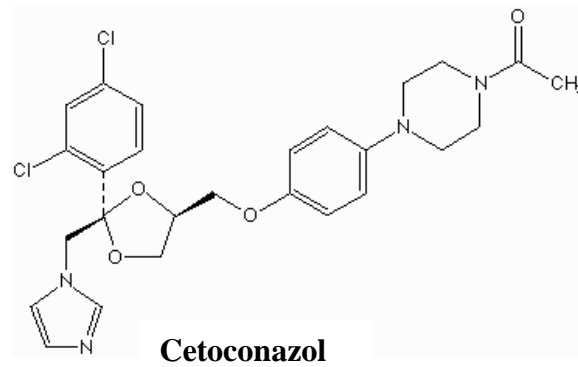


Figura 10. Estrutura química do cetoconazol, itraconazol e fluconazol. Fonte: CATALÁN, & MONTEJO, 2006.

Atualmente, observam-se os triazólicos de segunda geração: voriconazol, posaconazol e ravuconazol. Os novos compostos resultam de modificações moleculares de fluconazol e itraconazol. (CORTEZ et al., 2003). O voriconazol é resultante de modificações na estrutura química do fluconazol (Figura 11). Seu uso foi aprovado nos Estados Unidos em maio de 2002 pelo FDA (*Food and Drug Administration*), e, no Brasil, em julho do mesmo ano pela ANVISA, 2002. O espectro antifúngico foi ampliado pela introdução de um grupo α -metila na estrutura do fluconazol e a substituição de um anel triazol por uma estrutura 4-fluoropirimidina (BERGOLD & GEORGIADIS, 2004; PIGATTO et al., 2009). Exibe atividade antifúngica contra várias espécies, incluindo *Aspergillus fumigatus*, *Candida* spp., *Scedosporium apiospermum*, *Cryptococcus neoformans*, *Coccidioides immitis* e *C. posadasii*, *Blastomyces dermatitidis* e *Histoplasma capsulatum* (MULDREW et al., 2005; CATALÁN & MONTEJO, 2006; MEHTA et al., 2008).

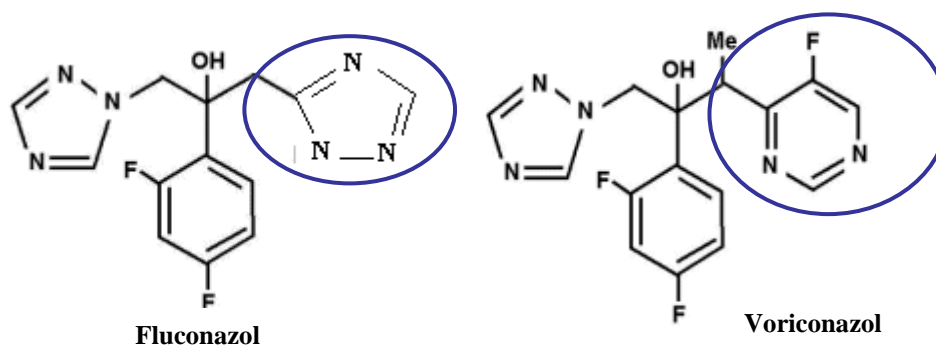


Figura 11. Modificações estruturais no fluconazol que originam o voriconazol. Fonte: CATALÁN, & MONTEJO, 2006, com modificações.

O posaconazol é uma molécula que evoluiu do itraconazol é uma droga triazólico de 2ª geração de espectro superior, inclusive se comparado ao voriconazol. O posaconazol é ativo contra uma ampla variedade de fungos, como, *Cryptococcus* spp., *Blastomyces* spp., *Histoplasma* spp., *Coccidioides immitis* e *C. posadasii*, *Fusarium* spp. (GONZÁLEZ et al., 2002; ANSTEAD et al., 2005; WOLLINA et al., 2009).

Quanto ao ravuconazol, esta droga tem estrutura semelhante à do fluconazol mas apresenta um grupamento 4-tiazolil benzonitrila ao invés do anel triazólico do fluconazol. Apresenta espectro de ação semelhante ao do voriconazol e do posaconazol (BERGOLD & GEORGIADIS, 2004; GONZÁLEZ, 2009).

A caspofungina (Figura 12) é um composto inibidor não competitivo de β -(1,3) glucana sintase, enzima responsável pela síntese da 1,3- β -glucano, polissacarídeo da parede da maioria dos fungos patógenos responsável pela rigidez da parede celular, assim como da integridade osmótica, crescimento e divisão da célula (PIGATTO et al., 2009). A caspofungina possui boa atividade *in vitro* frente às cepas de *Candida* spp. e *Aspergillus* spp., porém seu espectro de ação inclui também outras espécies fúngicas, tais como: *Paecilomyces variotii*, *Scedosporium apiospermum*, *Blastomyces dermatididis*, *Coccidioides immitis* e *C. posadasii* e *Histoplasma capsulatum* (BERGOLD & GEORGIADIS, 2004).

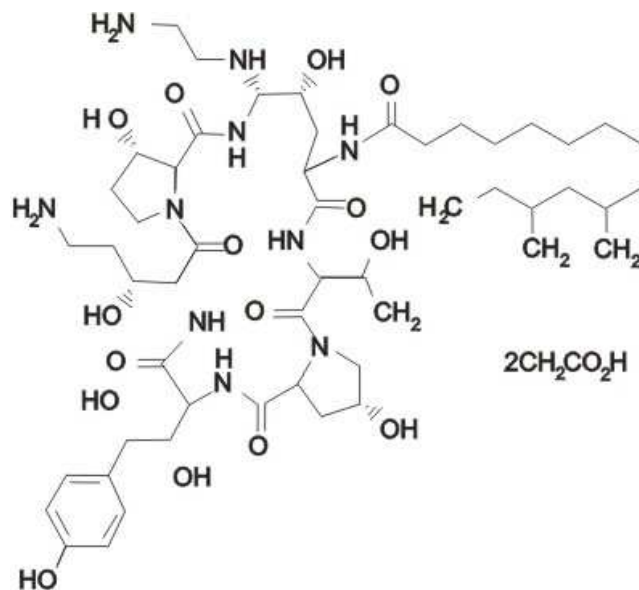


Figura 12. Estrutura química da caspofungina. Fonte: CATALÁN, & MONTEJO, 2006.

Na atualidade apenas está autorizada para o uso clínico a caspofungina, estando a micafungina e a anidulafungina em fase de pesquisa. A caspofungina é um derivado semissintético da pneumocandina B, produto natural de *Glarea lozoyensis*, é um hexapeptídeo

cíclico, pertencente a uma nova classe de compostos antifúngicos. Diversos estudos mostram que a droga exibe potente atividade *in vitro* contra cepas de *Candida* spp. resistentes a anfotericina B e fluconazol, *Aspergillus* spp. e fungos dimórficos (GONZÁLEZ et al., 2001,²⁶ Em estudo com coccidioidomicose experimental causada por *C. immitis*, González et al. (2001) provaram que a droga possui excelente ação terapêutica, a qual foi corroborado por Antony, (2004) no tratamento de um paciente transplantado com quadro de coccidioidomicose disseminada.

No entanto relatos de casos de falhas ao tratamento e recidivas têm sido descritos (OLDFIELD & BONE, 1997; ANSTEAD et al., 2005; CHENG-YI et al., 2005; STEVENS et al., 2007; KRIESEL et al., 2008), em razão da anfotericina B apresentar toxicidade elevada e ter aplicação complicada, embora tenha ação rápida, mas poucos doentes suportam uma dose superior aos 2g, necessária à cura dos quadros de coccidioidomicose (GALGANI et al., 2005). Já os derivados azólicos tem sido um importante aporte para a gestão da doença, mas as drogas atualmente disponíveis exigem uma terapia a longo prazo para as respostas do tratamento, inclusive por causa da grande tendência à recidiva, alguns autores recomendam o uso de azólicos em esquemas supressivos por toda a vida (PRABHU et al., 2004; PROIA & TENÓRIO, 2004; GALGANI et al., 2005). A coccidioidomicose é uma das micoses mais refratárias ao tratamento, o que em parte justifica a busca de novas substâncias antifúngicas.

1.7 Novas estratégias

O uso da combinação de antifúngicos tem como finalidade conseguir certos benefícios, como: ampliar o espectro de ação de cada droga, reduzir a dose dos antifúngicos e o tempo de tratamento, assim como evitar o surgimento de resistência e potencializar a ação dos fármacos (sinergismo) (RONALD & TALLARIDA, 2001). Dentre as combinações já documentadas, estão os derivados azólicos com poliênicos, bem como equinocandinas com azólicos ou poliênicos, as quais têm apresentado interação sinérgica *in vitro* e *in vivo* perante várias espécies fúngicas como: *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus*; *Fusarium* spp. e

Rhizopus sp. (ARIKAN et al., 2002; SIONOV et al., 2006; BALLESTER et al., 2008; CHIRCH et al., 2008; CÓRDOBA et al., 2008; SERENA et al., 2008).

No caso da coccidioomicose, estudos tem mostrado a eficácia da combinação de antifúngicos *in vivo*. González et al. (2007), mostrou a eficácia da combinação de caspofungina com anfotericina B em murinos com coccidioomicose experimental. Assim mesmo, Park et al., (2006) mostrou a eficácia da caspofungina com fluconazol no tratamento de paciente com quadro de coccidioomicose disseminada pulmonar e Antony et al. (2006, 27) obtiveram resultados satisfatórios na combinação de voriconazol com anfotericina B em paciente com meningite coccidióidica.

1.7.1 Drogas com potencial antifúngico

Novas estratégias são desenvolvidas com a descoberta do 2º uso de drogas antimicrobianas assim com o uso de outras drogas, como, drogas imunossupresoras, drogas antipsicóticas, inibidores da bomba de próton, agentes antiarrítmicos e antineoplásicos, as quais mostram potencial antifúngico e resultados promissores frente a várias espécies fúngicas (AFELTRA & VERWEIJ, 2003) (Figura 13). O motivo de tais descobertas decorre possivelmente do fato de que as drogas utilizadas no tratamento de outras doenças podem atingir tanto as células humanas como as fúngicas, uma vez que ambas as células são eucarióticas e existem sítios análogos de ligação a essas drogas presentes em ambas as células eucarióticas (AFELTRA & VERWEIJ, 2003). Outras novas drogas com potencial antifúngico continuam surgindo com resultados promissores, González et al. (2009) mostraram que o isavuconazol, droga triazólica, apresenta efeito inibitório *in vitro* frente a cepas de *C. posadasii*. Outras drogas como Ambruticin S vem apresentando resultados promissores *in vitro* frente a cepas de *C. posadasii* (SHUBITZ et al., 2006).

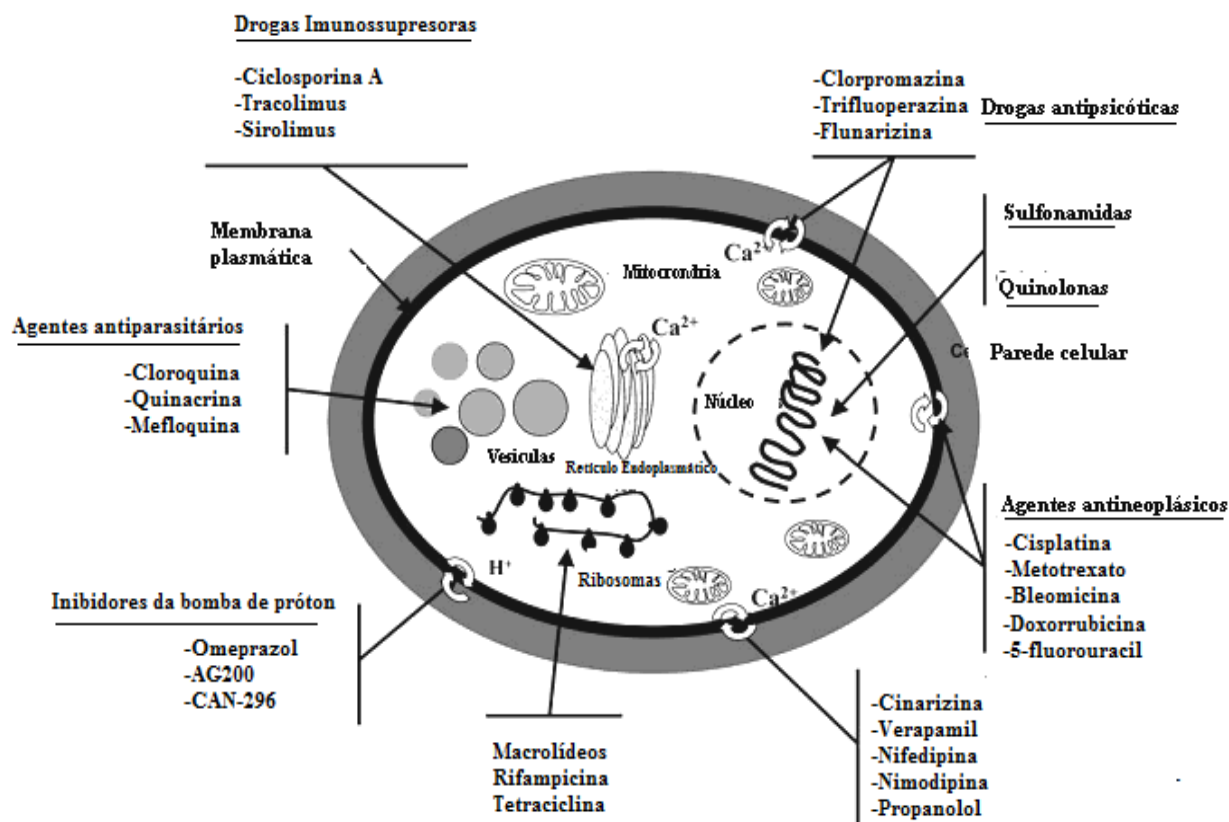


Figura 13. Mecanismo de ação de drogas não antifúngicas sobre a célula fúngica. Fonte: AFELTRA & VERWEIJ, 2003.

Com relação a experiências com outros fungos dimórficos, sulfametoxazol com trimetoprim, apresenta efeito inibitório *in vitro* (STEVENS & VO, 1982; AFELTRA et al., 2003; HAHN et al., 2003) e *in vivo* (PANIAGO et al., 2003; VISBAL et al., 2005; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006) frente a cepas de *Paracoccidioides brasiliensis* (RESTREPO & ARANGO, 1980; STEVENS & VO, 1982). No Brasil, atualmente o sulfametoxazol com trimetoprim é indicado como uma das estratégias terapêuticas no

tratamento da paracoccidiodomicose (PANIAGO et al., 2003; VISBAL et al., 2005). Além de ser de baixo custo, traz vantagens farmacodinâmicas (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

O sulfametoxazol (Figura 14-A) é uma sulfonamida, análogo estrutural do ácido *p*-aminobenzóico (PABA) e inibe de forma competitiva uma enzima bacteriana, a diidropteroato sintetase, que é responsável pela incorporação do PABA ao ácido diidrofólico (ácido fólico) (MASTERS et al., 2003; GOODMAN & GILMAN, 2006; TAVARES, 2007). Dessa forma, bloqueia a síntese do ácido diidrofólico e diminui a quantidade de ácido tetraidrofólico metabolicamente ativo (cofator na síntese de purinas, timidina e DNA). As bactérias, ao contrário de células eucarióticas, não utilizam ácido fólico pré-formado e necessitam sintetizá-lo a partir do PABA. A trimetoprima (Figura 14-B) é uma base lipofílica fraca, com ação bacteriostática, estruturalmente relacionada com a pirimetamina. Une-se reversivelmente à enzima bacteriana diidrofolato redutase, inibindo-a (GOODMAN & GILMAN, 2006; TAVARES, 2007). Exerce seu efeito num estado da biossíntese do folato imediatamente posterior ao estado em que atua o sulfametoxazol, ocorrendo assim uma ação sinérgica entre ambos (GOODMAN & GILMAN, 2006; TAVARES, 2007). Sulfametoxazol com trimetoprim agem sinergicamente, bloqueando duas enzimas que catalisam estágios sucessivos na biossíntese do ácido fólico no microorganismo (NAVARRO-MARTÍNEZ et al., 2006a, 2006b).

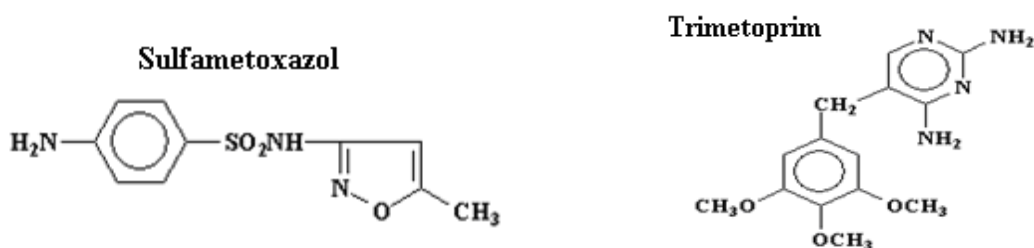


Figura 14. Estruturas químicas **A**- sulfametoxazol; **B**- trimetoprim. Fonte: GOODMAN & GILMAN, 2006.

‘ Drogas antituberculose, como rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol, utilizadas no tratamento de quadros de tuberculose apresentam resultados promissores *in vitro* frente às cepas de *C. posadasii* (CORDEIRO et al., 2006c). Segundo Cordeiro et al. (2006c), o efeito inibitório *in vitro* das drogas antituberculose frente às cepas de *C. posadasii*, seja provavelmente devido à existência de sítios análogos de ligação a essas drogas presentes na mitocôndria de cepas de *C. posadasii*.

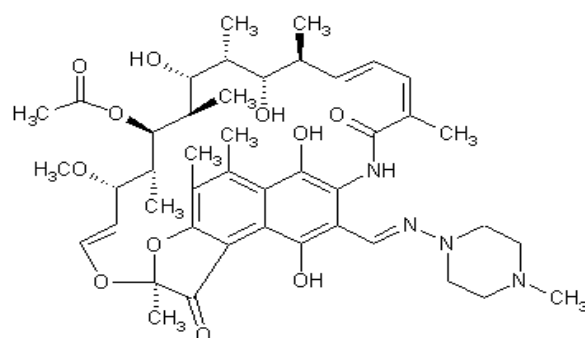
A rifampicina (Figura 15) é um derivado semissintético da rifamicina B, complexo macrocíclico produzido pelo *Streptomyces mediterranei* desenvolvido em 1965, cujo mecanismo de ação consiste em inibir a biossíntese do RNA bacteriano. Estes antibióticos exercem sua atividade antibacteriana inibindo a síntese protéica em todos os seus estágios, impedindo assim a formação do RNA mensageiro, RNA ribossomal e RNA de transporte. Esta ação resulta de sua ligação à subunidade beta da RNA-polimerase, formando complexos firmes e irreversíveis com a enzima e impedindo suas atividades (ZHANG et al., 2003; TAVARES, 2007).

A síntese do RNA de mitocôndrias das células de mamíferos não é inibida pelas concentrações habitualmente utilizadas da rifampicina, em virtude da relativa incapacidade deste antibiótico agir sobre as RNA - polimerase de mamíferos (TAVARES, 2007). Alguns fungos, como o *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, *Paracoccidioides brasiliensis* e espécies de *Candida* podem ser alvo da ação da rifampicina, especialmente quando associado com a anfotericina B (TAVARES, 2007). Esta combinação apresenta ineração *in vitro* ante cepas de *Coccidioides immitis* (RIFKIND & HYLAND, 1974; HUPPERT et al., 1976). Rifampicina é um potente indutor do citocromo hepático e intestinal P- 450 (CYP) 3A4 sistema enzimático, assim como algumas drogas proteínas transportadoras, como a P- glicoproteína (TAVARES, 2007).

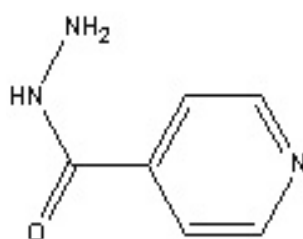
A isoniazida (Figura 15) é a hidrazida do ácido isonicotínico, que é o pilar fundamental na quimioterapia da tuberculose. Em 1945, demonstrou-se que a nicotinamida possuía ação tuberculostática e foi em 1952 que surgiu a isoniazida. Na verdade, trata-se de um fármaco antibacteriano que inibe a síntese do ácido micólico, componente essencial da parede celular da micobactéria (DU TOIT et al., 2006).

O etambutol (Figura 15) inibe a enzima arabinosil transferase micobacteriana envolvida na polimerização do D-arabinofuranose para arabinoglicano, componente essencial da parede celular (DU TOIT et al., 2006).

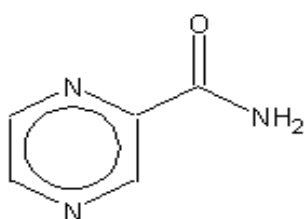
A pirazinamida (Figura 15) é uma pirazina sintética análoga da nicotinamida que surgiu em 1970. Seu mecanismo de ação ocorre com a atuação da enzima pirazinamidase que converte esta droga em ácido pirazanóico ativo, a qual inibe a síntese do ácido (ZHANG et al., 2003).



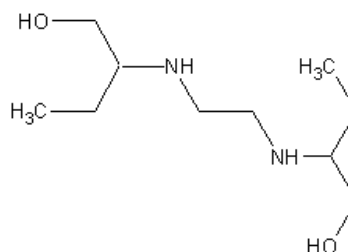
Rifampicina



Isoniazida



Pirazinamida



Etambutol

Figura 15. Estruturas químicas das principais drogas antituberculose utilizadas no tratamento da tuberculose. Fonte: DU TOIT et al., 2006.

1.8 Métodos de estudo da atividade antifúngica *in vitro*

Os testes de sensibilidade *in vitro* aos antifúngicos são realizados para avaliar o seu potencial terapêutico, comprovar a sensibilidade do fungo isolado frente aos antifúngicos e ter controle da terapia antifúngica (COLOMBO & ALVES, 2004; SCHREIBER, 2007), com respaldo de organizações especializadas como: *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) e *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), importantes órgãos internacionais que padronizam e controlam a realização de testes de sensibilidade.

O princípio destes testes é expor um inóculo definido do microrganismo em estudo a conhecidas concentrações da droga a serem testadas em condições que suportem o crescimento do microrganismo e pouco ou nada interfiram com a atuação da droga, e observar se o crescimento fúngico é minimizado ou não. A leitura final dos testes da diluição permite identificar a concentração inibitória mínima da droga, que inibe o crescimento do microrganismo em estudo (COLOMBO & ALVES, 2004). A concentração inibitória mínima dos antifúngicos é definida como a concentração mínima da droga, resultando em 80% (ou 50%, em alguns casos) de inibição do crescimento fúngico em relação ao controle (sem uso de medicamentos) (MUKHERJEE et al., 2005).

Em 2002, foi publicado o documento M38-A (CLSI, 2002), que se destina à realização de testes com fungos filamentosos causadores de infecções invasivas, tais como *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Rhizopus* spp. e *Pseudallescheria boydii* (CLSI, 2002); porém é usado com sucesso, em estudo envolvendo fungos dimórficos em fase filamentosa, tais como *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides* spp., *Histoplasma capsulatum* e *Sporotrix sckenckii* (NAKAI et al., 2003; CORDEIRO et al., 2006b, 2006c; RAMANI & CHATURVEDI, 2007). Em 2008 foi publicado o documento definitivo M38-A2 (CLSI, 2008).

O teste de sensibilidade das cepas de *Coccidioides posadasii* frente às drogas antifúngicas é determinado mediante o teste de diluição em caldo padronizado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2002), por meio do protocolo M38-A. Diversos

autores relatam, de forma cada vez mais frequente, dados sobre o perfil de sensibilidade às drogas utilizadas para o tratamento da coccidioidomicose (NAKAI et al., 2003; GALGIANI et al., 2000; 2005). Anfotericina B, cetoconazol, itraconazol e fluconazol e outras drogas, como voriconazol, posaconazol e caspofungina, apresentam atividade *in vitro* (CORDEIRO et al., 2006b; RAMANI & CHATURVEDI, 2007) e *in vivo* (HSUE et al., 2004; PROIA & TENORIO, 2004; GONZALEZ et al., 2007; STEVENS et al., 2007) frente as espécies de *Coccidioides*. O quadro 2 resume a CIM de drogas antifúngicas frente as espécies de *Coccidioides* determinadas por alguns autores.

Quadro 2. Concentração inibitória mínima de drogas antifúngicas testadas isoladamente frente a cepas de *Coccidioides posadasii* e *C. immitis*.

Concentração inibitória Mínima (µg/mL) – Média Geométrica									
AMB	KTC	FLC	ITC	VRZ	POS	ISC	RVC	CAS	Referência
0,34	-	28,6	-	-	-	-	-	17,4	González et al (2001)
0,25	-	4	0,12	-	-	-	-	-	Nakai (2003)
0,11	0,22	4,44	0,15	0,12	-	-	-	22,62	Cordeiro et al (2006b)
0,08	0,04	5,7	0,08	0,04	0,04	-	-	0,8	Ramani & Chaturvedi (2007)
0,125	0,15	6,25	0,5	0,12		-	-	32	Brilhante et al (2008)*
0,25	-	>64	>8	>8	2	-	-	-	Kriesel et al (2008)*
0,05	-	8,77	0,14	0,19	0,18	0,28	0,26	-	González (2009)

*CIM – valores obtidos de uma única amostra. **AMB** - anfotericina B; **KTC** - cetoconazol; **FLC** - fluconazol; **ITC** - itraconazol; **VRZ** - voriconazol; **POS** - posaconazol; **ISC** - isavuconazol; **RVC** - ravuconazol; **CAS** – caspofungina.

Para avaliar a atividade dos antifúngicos, há métodos padronizados, como o M38-A para fungos filamentosos, porém não se dispõe de um método de referência para o estudo da ação combinada dos antifúngicos. A concentração inibitória mínima (CIM) de diferentes drogas em combinação pode ser determinada usando os seguintes métodos: método de *Checkerboard*, o método da cinética de morte (do inglês *time-kill*), ou E-test (do inglês *Epsilon Meter Strip Test*) (WHITE et al., 1996). Embora este último método tenha demonstrado

boa correlação com os métodos standardizados, o método de *Checkerboard* é o mais utilizado na maioria de estudos publicados (ODDS, 2003b).

Este método determina a percentagem de inibição do crescimento de células fúngicas, na presença da combinação de drogas. O percentual de inibição é calculado em relação ao controle do crescimento nos tubos que contêm apenas células fúngicas e nenhuma droga antifúngica (O'SHAUGHNESSY et al., 2006).

O método de *Checkerboard* é relativamente simples de executar. O nome de ensaio se refere à posição dos tubos ou poços na forma de “xadrez”, onde existem múltiplas diluições dos antimicrobianos em concentrações superiores ou inferiores à CIM de cada um deles ante o microrganismo em estudo. O método de *Checkerboard* com base na determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de antifúngicos em combinação é muitas vezes seguido por uma análise mais aprofundada, não paramétrica, utilizando o índice de concentração inibitória fracionada (FICI), ou a resposta do modelo de superfície totalmente paramétrico (RSM) (MELETIADIS et al., 2007).

O índice de concentração inibitória fracionária (do inglês: *Fractional Inhibitory Concentration Index* - FICI) é o teste o mais utilizado (MUKHERJEE et al., 2005). O método do *Checkerboard* é utilizado para determinar a concentração inibitória fracionária (FIC) da combinação de antifúngicos para cada teste isolado (JONHSON et al., 2004). As interações das drogas são classificadas em base ao índice de concentração inibitória fracionária (FICI). O FICI é o somatório dos FICs para cada droga; o FIC é definido como a CIM de cada droga, quando usado em combinação, dividido pela CIM de cada droga, quando testado isoladamente. Para cada teste isolado, a soma das concentrações inibitórias fracionadas (Σ FIC) é calculada com a seguinte equação:

$$\Sigma FIC = FIC_{C1} + FIC_{C2} = \frac{C_{C1}}{CIM_{C1}} + \frac{C_{C2}}{CIM_{C2}}$$

Onde, CIM_{C1} , é a CIM da droga 1 testado isoladamente; CIM_{C2} , é a CIM da droga 2 testada isoladamente, C_{C1} , - é o CIM da droga 1 testado em combinação; C_{C2} - é o CIM da droga 2 testado em combinação.

E para triple combinação, a soma da concentração inibitória fracionada (ΣFIC) é calculada com a seguinte equação:

$$\Sigma FIC = FIC_{C1} + FIC_{C2} + FIC_{C3} = \frac{C_{C1}}{CIM_{C1}} + \frac{C_{C2}}{CIM_{C2}} + \frac{C_{C3}}{CIM_{C3}}$$

onde, CIM_{C1} , CIM_{C2} , CIM_{C3} são as CIMs da droga C_1 , C_2 , C_3 isolada (O' SHAUGHNESSY et al., 2006).

Por motivos de uniformização de interpretação, Odds, (2003b) propôs os seguintes intervalos: $FICI \leq 0,5$ deveria ser considerado como sinérgico, $0,5 < FICI \leq 4,0$ como indiferente e $FICI > 4,0$ como antagonismo.

Sinergismo - é o resultado quando duas drogas em combinação são significativamente melhor do que a resposta de cada um delas utilizada separadamente (MUKHERJEE et al., 2005).

Indiferente - é o resultado com duas em combinação é igual ao obtido apenas com aquela droga que é mais eficaz (MUKHERJEE et al., 2005).

Antagonismo - é o resultado com duas em combinação são significativamente pior do que a resposta de cada um delas utilizada separadamente (MUKHERJEE et al., 2005).

2. JUSTIFICATIVA

O Brasil está na relação de países com áreas endêmicas da coccidioidomicose (RESTREPO, 2006), circunscritas às zonas do semiárido da região do Nordeste (COX & MAGEE, 2004). Esse cenário leva a uma investigação maior para novas estratégias inibitórias contra *Coccidioides posadasii* com a finalidade de ampliar o espectro de ação das drogas, reduzir a dose dos antifúngicos e tempo de tratamento, assim como evitar o surgimento de resistência e potencializar a ação dos fármacos.

Novas opções de tratamento têm sido propostas para os quadros de coccidioidomicose. A combinação de drogas antifúngicas (ANTONY et al., 2006; O'SHAUGHNESSY et al., 2006), é uma opção que está adquirindo importância como terapêutica alternativa nos casos de pacientes com micoses sistêmicas graves não responsivos a monoterapia antifúngica habitual (GALGIANI, 2000). No entanto, a principal preocupação, especialmente na clínica, tem sido avaliar se existe antagonismo entre estes agentes utilizados em combinação (MUKHERJEE et al., 2005). Baseado neste contexto seria necessário avaliar a interação *in vitro* entre drogas antifúngicas frente a *C. posadasii*, uma vez que a introdução de novos agentes antifúngicos com diferentes mecanismos de ação torna possível o uso da combinação de drogas antifúngicas (ANTONY et al., 2006; O'SHAUGHNESSY et al., 2006).

Outras estratégias com evidências científicas promissoras envolvendo drogas antibacterianas têm sido investigadas por vários autores, frente a diversas espécies fúngicas. O sulfametoxazol com trimetoprim tem apresentado efeito inibitório *in vitro* frente a outras espécies fúngicas (STEVENS et al., 1982; AFELTRA et al., 2002a, 2002b, 2003). No Brasil o sulfametoxazol com trimetoprim vêm sendo indicado como alternativa eficaz no tratamento de micoses profundas como a paracoccidioidomicose, além de arcar os custos dos pacientes (PANIAGO et al., 2003; VISBAL et al., 2005). Baseados na similaridade filogenética entre os *Paracoccidioides brasiliensis* e *Coccidioides immitis* e *C. posadasii* (BAGAGLI et al., 2006; COX & MAGEE, 2004) seria necessário avaliar a inibição do sulfametoxazol com trimetoprim frente a *C. posadasii*.

Baseados nos estudos realizados por Cordeiro et al. (2006c) os quais demonstraram que as drogas antituberculose, como rifampicina, isoniazida e etambutol,

utilizadas no tratamento da tuberculose pulmonar, apresentaram efeito inibitório *in vitro* frente a *C. posadasii*, provavelmente devido à existência de sítios análogos de ligação a essas drogas presentes na mitocôndria de *C. posadasii*, seria necessário, então, estudar se o efeito inibitório *in vitro* dessas drogas antituberculose pode ser reforçado pela associação com as drogas antifúngicas.

3. PERGUNTAS DE PARTIDA

- 1 Existe interação sinérgica *in vitro* entre os principais antifúngicos utilizados no tratamento da coccidioidomicose, frente a *C. posadasii* ?
- 2 Qual é o efeito do sulfametoxazol / trimetoprim no crescimento de *C. posadasii in vitro*?
- 3 Existe interação sinérgica *in vitro* entre drogas antituberculose com drogas antifúngicas, frente a *C. posadasii* ?

4. HIPÓTESES CONSIDERADAS

1. Combinações de drogas antifúngicas atuam sinergicamente *in vitro* frente aos isolados de *C. posadasii* uma vez que poliênicos, azólicos e equinocandinas possuem diferentes mecanismos de ação.
2. Baseados na similaridade filogenética entre os gêneros de *Paracoccidioides* e *Coccidioides*, sulfametoxazol / trimetoprim deve inibir o crescimento de *C. posadasii*.
3. Combinações entre drogas antifúngicas e drogas antituberculose atuam sinergicamente *in vitro*, frente aos isolados de *C. posadasii*.

5. OBJETIVOS DO ESTUDO

5.1 Objetivo geral

Determinar o perfil de sensibilidade *in vitro* de drogas antimicrobianas testadas isoladamente e em combinação com antifúngicos frente a cepas de *C. posadasii* isoladas no Nordeste brasileiro

5.1.1 Objetivos específicos

- 1 Avaliar a interação *in vitro* de oito combinações de drogas antifúngicas, formadas anfotericina B, derivados azólicos e caspofungina frente aos isolados de *C. posadasii*.
- 2 Determinar o efeito inibitório *in vitro* do sulfametoxazol / trimetoprim frente aos isolados de *C. posadasii*, bem como avaliar a interação *in vitro* do sulfametoxazol / trimetoprim com anfotericina B.
- 3 Avaliar a interação *in vitro* de 24 combinações formadas por rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol com anfotericina B, derivados azólicos e caspofungina frente a cepas de *C. posadasii*.

6 METODOLOGIA

Todos os procedimentos desta pesquisa foram desenvolvidos dentro de cabine de segurança biológica classe II-B2 no laboratório de nível de biossegurança 3 do Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM) da Universidade Federal do Ceará (UFC) (Figura 16).



Fonte: CEMM



Fonte: CEMM



Fonte: CEMM

Figura 16. Sala de nível de biossegurança 3- Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM) da Universidade Federal do Ceará (UFC)

6.1 Cepas fúngicas

Para o desenvolvimento das fases deste trabalho, foram utilizadas 18 cepas de *Coccidioides posadasii*, sendo 15 de origem clínica, isoladas de escarro ou lavado broncoalveolar, e três de origem ambiental, isoladas de solo. Das 18 cepas fúngicas, 17 eram oriundas dos municípios do Estado do Ceará, apenas uma era procedente do Estado da Bahia. Os procedimentos de identificação de cada cepa fúngica incluiu análise micológica (CORDEIRO et al., 2006a) e a identificação por técnicas de PCR, como descrito por Bialek et al. (2004) e Umeyama et al. (2006).

Todas as 18 cepas fúngicas de *C. posadasii* foram utilizadas para realizar os testes da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de cada droga antifúngica isolada e em combinação, bem como para avaliar a atividade *in vitro* do sulfametoxazol com trimetoprim, em conjunto com anfotericina B. Já para os testes de interação *in vitro* de drogas antituberculose isoladas e em combinação com drogas antifúngicas, foram utilizadas 15 das 18 cepas fúngicas de *C. posadasii* analisadas.

Dez das 18 cepas de *Coccidioides posadasii* possuíam valores conhecidos da CIM de cada droga antifúngica e antituberculose, determinados previamente por Cordeiro et al. (2006b, 2006c). Neste trabalho, a CIM de cada droga foi novamente determinada, com a finalidade de reproduzir os dados obtidos nesse estudo, assim como comparar com os resultados obtidos nesta pesquisa.

As cepas-teste estão estocadas na micoteca do Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM) da Universidade Federal do Ceará, em ágar- batata acrescido de dimetil sulfóxido (DMSO) a 10% a -20°C. As cepas de *C. posadasii* foram previamente subcultivadas em tubos com ágar-batata e incubadas por sete a dez dias a 25°C para avaliar a viabilidade e purificação das cepas (Figura 17). O número das amostras, origem geográfica, o ano de isolamento e a identificação dos procedimentos de todas as cepas fúngicas são descritos no quadro 3

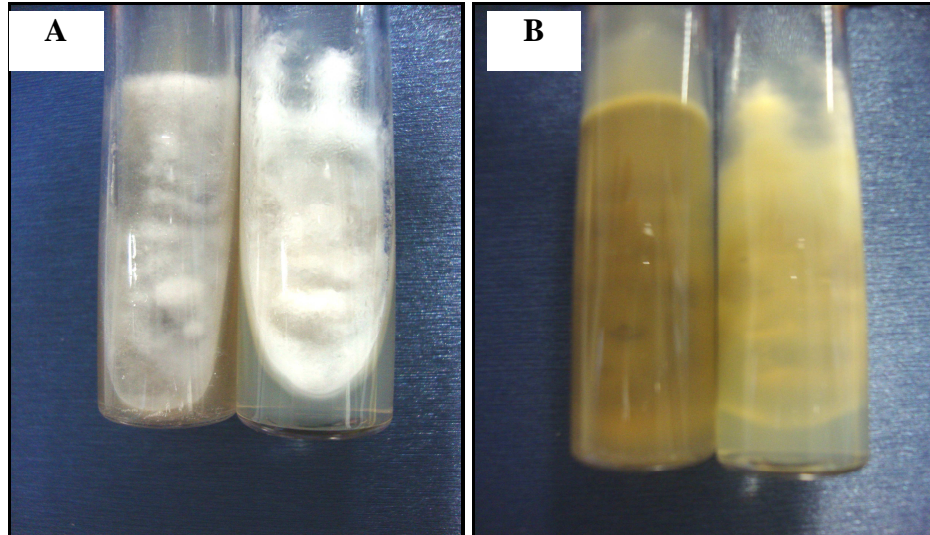


Figura 17. Aspecto macromorfológico das cepas de *C. posadasii* estocadas na micoteca do CEMM. **A-** As colônias caracterizam-se por uma textura algodosa, com tonalidade branca. **B-** O reverso da colônia pode apresentar com o passar do tempo (após 10 dias de incubação) diferentes matizes de marrom.

Quadro 3. Lista das cepas de *Coccidioides posadasii* estocadas na micoteca do CEMM.

Nº de Coleção	Amostra	Origem geográfica	Ano do isolamento
CEMM 01-6-085	Escarro	Santa Quitéria 4°19'S 40°09'W	2002
CEMM 01-6-087	Lavado Broncoalveolar	Catunda 4°38'S 40°12'W	2002
CEMM 01-6-088	Lavado Broncoalveolar	Santa Quitéria- 4°19'55"S 40°09'24"W	2003
CEMM 01-6-089	Lavado Broncoalveolar	Solonópole 5°44'S 39°00'24'W	2001
CEMM 01-6-090	Solo (Tatu)	Solonópole 5°44'S 39°00'24'W	2004
CEMM 01-6-091	Solo (Tatu)	Solonópole 5°44'S 39°00'24'W	2004
CEMM 01-6-092	Solo (Tatu)	Solonópole 5°44'S 39°00'24'W	2004
CEMM 01-6-101	Lavado Broncoalveolar	Solonópole 5°44'S 39°00'24'W	2003
CEMM 01-6-102	Lavado Broncoalveolar	Arneiroz 6°19'S 40°09'W	2004
CEMM 01-6-103	Escarro	Aiuaba 6°34'S 40°07'W	2005
CEMM-05-2-063	Líquido Pericárdico	Ibiapina 3°55'S 40°53'W	2005
CEMM-05-2-064	Lavado Broncoalveolar	Sobral 3°41'S 40°20'W	2006
CEMM 05-2-065	Lavado Broncoalveolar	Sobral 3°41'S 40°20'W	2006
CEMM-05-2-066	Lavado Broncoalveolar	Sobral 3°41'S 40°20'W	2006
CEMM-05-2-067	Lavado Broncoalveolar	Jaguaribe 5°53'S 38°37'W	2007
CEMM-05-2-068	Lavado Broncoalveolar	Jaguaribe 5°53'S 38°37'W	2007
CEMM-05-2-069	Lavado Broncoalveolar	Bahia	2006
CEMM-05-2-070	Escarro	Parambú 6°12'S 40°41'W	2007

6.2 Teste de sensibilidade *in vitro*

O ensaio de macrodiluição em caldo para o teste de sensibilidade aos antifúngicos foi realizado de acordo ao documento M38-A, do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2002). Foram incluídas em cada ensaio como controle de qualidade *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida krusei* ATCC 6258.

6.2.1 Meio utilizado

Foi utilizado o meio líquido RPMI 1640 (*Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA*) com L-glutamina 2,0 g/L de glicose sem bicarbonato de sódio e tamponado a pH 7,0 com 0,165M MOPS (ácido 2-[N- morfolino] - propanoossulfônico) (*Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA*). Este meio foi diluído em água destilada esterilizada (46,5g/L), filtrada em Millipore 0,2µm (*Corning Incorporated Costar, Corning, NY, EUA*), e conservado a 4°C. Este meio, após sua confecção, foi utilizado por até três semanas.

Para a atividade *in vitro* do sulfametoxazol com trimetoprim, foram testados dois meios de cultura, o primeiro foi o meio líquido RPMI 1640 como descrito por Yekutieli et al. (2004) e Navarro-Martínez et al. (2006), e o segundo foi o meio líquido YNB (*Yeast Nitrogen Base*) (DIFCO™ - BD) como recomendado por Afeltra et al. (2002a) e Hanafy et al. (2007). O meio YNB foi preparado de acordo com as instruções do fabricante. Detalhes sobre a composição química dos meios estão mostrados no Anexo II.

6.2.2 Preparação do inóculo

Para a preparação do inóculo, foram colocados 2mL de solução salina estéril em cada tubo com a cultura fúngica no meio de ágar-Sabouraud após 7 dias de incubação a 35°C e, com auxílio de alça microbiológica, foram realizadas raspagens da superfície do micélio, a fim de obter uma suspensão livre de fragmentos do meio de cultura. As suspensões foram transferidas para tubos estéreis e, em seguida, deixadas em repouso a 28°C por 5 min (Figura 18-A); o sobrenadante foi homogeneizado e lido a 530nm e ajustado a

uma transmitância de 95%. A suspensão contendo artroconídios e hifas foi diluído 1:10 com o meio RPMI 1640 para obter um inóculo de 1×10^3 a 5×10^3 UFC/mL (Figura 18-B) (CORDEIRO et al., 2006b, 2006c).

A**B**

Figura 18. Preparação do inóculo. **A-** suspensão contendo solução salina estéril e artroconídios e hifas. **B-** Suspensão diluída em 1:10 com o meio RPMI 1640 contendo artroconídios e hifas.

6.2.3 Antimicrobianos

Soluções estoque de anfotericina B (AMB) (Sigma Chemical Corporation, USA), cetoconazol (KTC), itraconazol (ITC) (Janssen Pharmaceutica, Belgium) e voriconazol (VRZ) (Pfizer Pharmaceuticals, USA) foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO); fluconazol (FLC) (Pfizer Pharmaceuticals, USA), e caspofungina (CAS) (Merck

Sharp & Dohme, Brazil) foram preparados em água destilada e estocados a -80°C até uso (CORDEIRO et al., 2006b). Soluções-padrão de rifampicina (RIF), isoniazida (INH), pirazinamida (PZA) e etambutol (ETB) (Ministério da Saúde, Brasil) foram preparadas em DMSO. Todas as soluções foram armazenadas a temperatura de -80°C até o momento do uso (CORDEIRO et al., 2006c).

As soluções-estoque de cada antimicrobiano foram diluídas com meio tamponado RPMI 1640. As diluições do sulfametoxazol com trimetoprim foram feitas diretamente no meio RPMI 1640 conforme descrito por Yekutiél et al. (2004), diluídos também em meio *Yeast Nitrogen Base* (YNB), conforme recomendado por Afeltra et al. (2002a).

Para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de cada droga antimicrobiana, as concentrações testadas para as drogas antifúngicas e drogas antituberculose foram conforme descrito por Cordeiro et al. (2006b, 2006c). As concentrações testadas para o sulfametoxazol com trimetoprim ocorreram conforme descrito por Yekutiél et al. (2004) (Quadro 4).

Quadro 4. Concentrações de cada antimicrobiano testado frente a cepas de *C. posadasii*.

Antimicrobiano	Concentração inicial	Concentração final
AMB	0,007µg/mL	4,0µg/mL
KTC	0,009µg/mL	5,0µg/mL
ITC	0,015µg/mL	8,0µg/mL
FLC	0,048µg/mL	25,0µg/mL
VRZ	0,031µg/mL	4,0µg/mL
CAS	0,25µg/mL	128µg/mL
SMX / TMP	250 / 50µg/mL	4000 / 800µg/mL
RIF	0,016mg/mL	8,5mg/mL
INH	0,015mg/mL	8,0mg/mL
PZA	0,048mg/mL	25,0mg/mL
ETB	0,039mg/mL	20,0mg/mL

SMX /TMP - sulfametoxazol com trimetoprim; **AMB** - anfotericina B; **KTC** - cetoconazol; **ITC** - itraconazol; **FLC** - fluconazol; **VRZ** - voriconazol; **CAS** - caspofungina; **RIF** - rifampicina; **INH**- isoniazida; **PZA** - pirazinamida; **ETB** - etambutol.

6.2.4 Procedimento

Foram distribuídos 100µL de meio RPMI estéril em uma série formada por tubos de ensaio com tampas de rosca; ao primeiro tubo da série foram adicionados 100µL da droga - teste recém diluída e, em seguida, homogeneizadas as soluções por meio de aspiração com pipeta automática; seguidamente, foram realizadas diluições seriadas em escala 1:2; após homogeneização, foram desprezados 100µL da solução contida no último tubo. Após este procedimento, foram adicionados 900µL da suspensão contendo o inóculo fúngico em cada tubo da série e incubados a 35°C.

As leituras da concentração inibitória mínima (CIM) foram realizadas com 48 horas de incubação, verificando-se a redução macroscópica do crescimento fúngico. Os tubos

foram correlacionados com o padrão de crescimento do tubo-controle (sem droga antifúngica). Os resultados foram lidos visualmente, como recomendado pelo método M38-A do CLSI para drogas antifúngicas. Leituras adicionais foram desenvolvidas após quatro e sete dias de incubação (NAKAI, 2003). Os resultados foram avaliados mediante análise qualitativa (Figura 19). A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida conforme apresentado na seqüência.

-anfotericina B - menor concentração da droga capaz de reduzir 100% do crescimento fúngico (CLSI, 2002);

-derivados azólicos - menor concentração da droga que causa redução de 80% no crescimento fúngico, quando comparado àquele do tubo- controle livre da droga (NAKAI, 2003);

-caspofungina - menor concentração da droga que causa redução de 80% no crescimento fúngico, quando comparado àquele do tubo- controle livre da droga (GONZÁLEZ et al., 2001);

-sulfametoxazol com trimetoprim – como sulfametoxazol com trimetoprim é uma combinação antimetabólica com efeitos microbiostáticos, temos definido arbitrariamente seu CIM como a menor concentração da droga que causou 80% de inibição do crescimento fúngico visível, comparado àquele do tubo- controle livre da droga (HAHN et al., 2003)

-drogas antituberculose - menor concentração da droga que causa redução de 80% no crescimento fúngico, quando comparado àquele do tubo-controle livre da droga (CORDEIRO et al., 2006c).

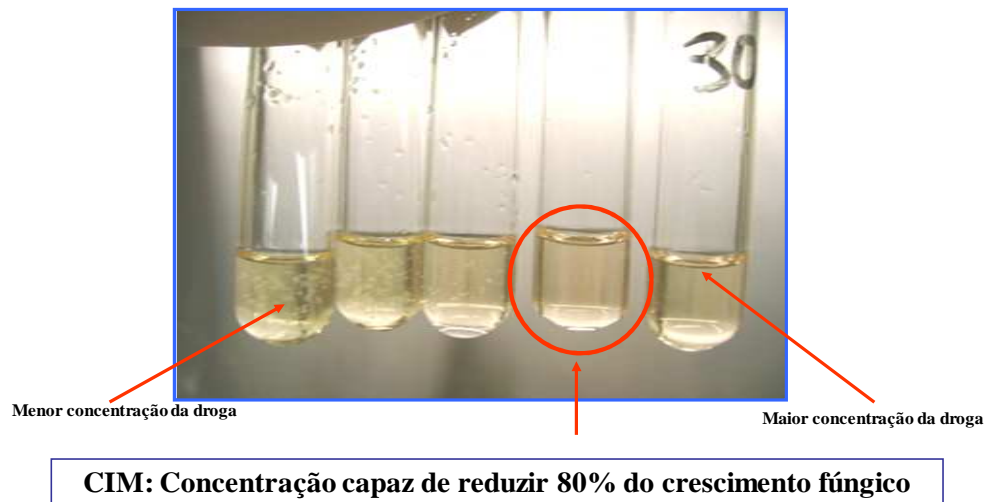


Figura 19. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do fluconazol frente a cepas de *C. posadasii*.

6.3 Interação *in vitro* das drogas

Após a definição da concentração inibitória mínima (CIM) para cada droga antifúngica isolada, as amostras foram testadas contra oito combinações formadas por drogas antifúngicas, seguindo a mesma metodologia descrita por Cordeiro et al. (2006b) (ver quadro 5).

Quadro 5. Concentrações testadas nas combinações dos antifúngicos ($\mu\text{g/mL}$).

Combinação de antifúngicos		Concentração inicial		Concentração final	
Antifúngico ₁	Antifúngico ₂				
AMB	ITC	0,006	0,009	0,116	0,153
AMB	FLC	0,006	0,390	0,116	6,25
AMB	KTC	0,006	0,013	0,116	0,22
AMB	VRZ	0,006	0,007	0,116	0,125
VRZ	KTC	0,007	0,013	0,125	0,22
VRZ	ITC	0,007	0,009	0,125	0,153
VRZ	FLC	0,007	0,390	0,125	6,25
VRZ	CAS	0,007	2,00	0,125	32,00

AMB - anfotericina B; **KTC** - cetoconazol; **FLC** - fluconazol; **ITC** - itraconazol; **VRZ** - voriconazol; **CAS** – caspofungina.

Com relação ao sulfametoxazol com trimetoprim (SMX / TMP), após a definição da CIM para o SMX / TMP, as amostras foram testadas frente a combinação do SMX / TMP com anfotericina B. A combinação foi formada nas seguintes concentrações de cada droga: anfotericina B, 0,007 a 0,116 $\mu\text{g/mL}$ e SMX / TMP, 125 / 25 a 2000/400 $\mu\text{g/mL}$.

Após a definição da concentração inibitória mínima (CIM) para cada droga antituberculose avaliada isolada, as amostras foram testadas frente 24 combinações formadas por drogas antifúngicas e drogas antituberculose, seguindo a mesma metodologia descrita por Cordeiro et al. (2006c) (ver quadro 6).

Quadro 6. Concentrações testadas nas combinações entre drogas antifúngicas ($\mu\text{g/mL}$) e drogas antituberculose (mg/mL) frente a cepas de *C. posadasii*.

Combinação de drogas		Concentração inicial		Concentração final	
Antifúngico	Antituberculose				
AMB	RIF	0,007	0,141	0,116	2,27
AMB	INH	0,007	0,015	0,116	0,25
AMB	PZA	0,007	0,048	0,116	12,5
AMB	ETB	0,007	0,038	0,116	0,62
KTC	RIF	0,013	0,141	0,22	2,27
KTC	INH	0,013	0,015	0,22	0,25
KTC	PZA	0,013	0,048	0,22	12,5
KTC	ETB	0,013	0,038	0,22	0,62
ITC	RIF	0,009	0,141	0,153	2,27
ITC	INH	0,009	0,015	0,153	0,25
ITC	PZA	0,009	0,048	0,153	12,5
ITC	ETB	0,009	0,038	0,153	0,62
FLC	RIF	0,277	0,141	4,44	2,27
FLC	INH	0,277	0,015	4,44	0,25
FLC	PZA	0,277	0,048	4,44	12,5
FLC	ETB	0,277	0,038	4,44	0,62
VRZ	RIF	0,007	0,141	0,125	2,27
VRZ	INH	0,007	0,015	0,125	0,25
VRZ	PZA	0,007	0,048	0,125	12,5
VRZ	ETB	0,007	0,038	0,125	0,62
CAS	RIF	2,0	0,141	32,0	2,27
CAS	INH	2,0	0,015	32,0	0,25
CAS	PZA	2,0	0,048	32,0	12,5
CAS	ETB	2,0	0,038	32,0	0,62

AMB - anfotericina B; **KTC** - cetoconazol; **FLC** - fluconazol; **ITC** - itraconazol; **VRZ** - voriconazol; **CAS** - caspofungina; **RIF** - rifampicina; **INH** - isoniazida; **ETB** - etambutol; **PZA** - pirazinamida.

6.3.1 Combinação de drogas

A interação sinérgica das drogas foi avaliada pelo método do *Checkerboard*. O ponto de corte da concentração inibitória mínima (CIM) foi determinado após 48h de incubação a 35°C. Leituras adicionais foram desenvolvidas após quatro e sete dias de incubação (NAKAI, 2003). Os resultados foram avaliados mediante análise qualitativa. A concentração inibitória mínima (CIM) das drogas antimicrobianas em combinação foi definida como a menor concentração da associação das drogas que cause 80% de inibição visível do crescimento fúngico, quando comparado àquele do tubo-controle livre das drogas.

Em base ao índice da concentração inibitória fracionada (do inglês *Fractional Inhibitory Concentration Index* – FICI), as interações das drogas foram classificadas como sinérgicas, indiferentes ou antagônicas (ODDS, 2003b). O FICI é definido como a soma dos FICs de cada droga; o FIC é definido como a CIM de cada droga, quando usado em combinação dividida pelo CIM de cada droga, quando usado isolado.

Para cada cepa isolada, a soma da concentração inibitória fracionada (Σ FIC) foi calculada com a seguinte equação:

$$\Sigma\text{FIC} = \text{FIC}_{C1} + \text{FIC}_{C2} = \frac{C_{C1}}{\text{CIM}_{C1}} + \frac{C_{C2}}{\text{CIM}_{C2}}$$

onde, CIM_{C1} , CIM_{C2} são as CIMs de cada droga sozinha, e C_{C1} , C_{C2} são a concentração de drogas em combinação respectivamente (ODDS, 2003b). A interação foi definida como: $\text{FICI} \leq 0,5$ deveria ser considerado como sinérgico, $0,5 < \text{FICI} \leq 4,0$ como indiferente e $\text{FICI} > 4,0$ como antagonismo (ODDS, 2003b).

Para determinar a concentração fungicida mínima (CFM), foi retirada alíquota de 200µl do tubo que continha as drogas antimicrobianas e a cepa fúngica, e que apresentou completa inibição do crescimento fúngico, esta alíquota foi semeada em tubo contendo ágar-Sabouraud dextrose e incubada a 30°C por 7, 15 e 30 dias. Foi considerada CFM a menor concentração da droga que impediu crescimento visível do subcultivo.

6.4 Análises estatísticas

O estudo foi realizado utilizando-se análise descritiva variável. O Teste U de Mann-Whitney foi utilizado para análise das combinações sinérgicas. Os resultados foram expressos em média, e o valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

7 RESULTADOS

7.1 Atividade *in vitro* de drogas antimicrobianas testadas isoladamente

Todas as cepas de *C. posadasii* foram sensíveis às drogas antifúngicas avaliadas, após 48 horas de incubação. As médias geométricas das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) para cada droga antifúngica foram às seguintes: AMB, 0,11 µg/mL; KTC, 0,11 µg/mL; ITC, 0,15 µg/mL; FLC, 5,15 µg/mL; VRZ, 0,14 µg/mL; e CAS, 26,39 µg/mL. A tabela 1 mostra a CIMs da anfotericina B, cetoconazol, itraconazol, fluconazol, voriconazol e caspofungina, frente a 18 cepas de *C. posadasii*. Não foram observados valores crescentes da CIM, após quatro e sete dias de incubação.

Todas as cepas de *C. posadasii* foram sensíveis às drogas antituberculose avaliadas, após 48 horas de incubação. As médias geométricas das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) para cada droga antifúngica foram às seguintes: RIF, 2,273 mg/mL; INH, 0,25 mg/mL, e ETB, 0,62 mg/mL. Apenas PZA não inibiu as cepas de *C. posadasii in vitro*. A tabela 2 mostra a CIMs da rifampicina, isoniazida e etambutol, frente a 15 cepas de *C. posadasii*.

7.1.1 Concentração fungicida Mínima (CFM)

No que concerne à concentração fungicida mínima (CFM), as drogas antifúngicas e drogas antituberculose testadas isoladamente apresentaram atividade fungicida frente a todas as cepas de *C. posadasii*.

Tabela 1. Concentração inibitória mínima (CIMs), anfotericina B (AMB), cetoconazol (KTC), itraconazol (ITC), fluconazol (FLC), voriconazol (VRZ) e caspofungina (CAS), frente a 18 cepas de *C. posadasii*.

Nº de coleção	CIM ($\mu\text{g/mL}$)					
	AMB	KTC	ITC	FLC	VRZ	CAS
CEMM 01-6-085	0,125	0,156	0,125	3,125	0,125	32
CEMM 01-6-087	0,125	0,156	0,125	3,125	0,125	16
CEMM 01-6-088	0,125	0,156	0,125	3,125	0,125	16
CEMM 01-6-089	0,125	0,078	0,125	3,125	0,125	32
CEMM 01-6-090	0,125	0,039	0,25	6,25	0,125	32
CEMM 01-6-091	0,125	0,156	0,125	3,125	0,125	16
CEMM 01-6-092	0,125	0,078	0,125	6,25	0,125	16
CEMM 01-6-101	0,0625	0,078	0,125	6,25	0,125	32
CEMM 01-6-102	0,125	0,156	0,125	6,25	0,125	16
CEMM 01-6-103	0,125	0,156	0,5	6,25	0,125	32
CEMM 05-2-063	0,125	0,078	0,125	6,25	0,125	32
CEMM 05-2-064	0,125	0,156	0,5	6,25	0,125	32
CEMM 05-2-065	0,125	0,078	0,25	6,25	0,25	32
CEMM 05-2-066	0,125	0,156	0,125	6,25	0,125	32
CEMM 05-2-067	0,125	0,078	0,125	6,25	0,125	32
CEMM 05-2-068	0,0625	0,156	0,125	6,25	0,125	32
CEMM 05-2-069	0,125	0,078	0,125	6,25	0,25	32
CEMM 05-2-070	0,0625	0,156	0,25	6,25	0,25	32
Média Geométrica	0,111	0,110	0,151	5,15	0,140	26,39

Tabela 2. Concentração inibitória mínima (CIMs) da rifampicina (RIF), isoniazida (INH), etambutol (ETB) e pirazinamida (PZA) frente a 15 cepas de *C. posadasii*.

Nº de coleção	CIM (mg/mL)			
	RIF	INH	ETB	PZA
CEMM 01-6-085	2,12	<0,25	<0,62	>25
CEMM 01-6-087	2,12	<0,25	<0,62	>25
CEMM 01-6-088	4,25	<0,25	<0,62	>25
CEMM 01-6-089	4,25	<0,25	<0,62	>25
CEMM 01-6-090	2,12	<0,25	<0,62	>25
CEMM 01-6-091	4,25	<0,25	<0,62	>25
CEMM 01-6-092	1,06	<0,25	<0,62	>25
CEMM 01-6-101	2,12	<0,25	<0,62	>25
CEMM 01-6-102	2,12	<0,25	<0,62	>25
CEMM 01-6-103	1,060	<0,25	<0,62	>25
CEMM 05-2-063	2,273	<0,25	<0,62	>25
CEMM 05-2-064	2,273	<0,25	<0,62	>25
CEMM 05-2-065	2,273	<0,25	<0,62	>25
CEMM 05-2-066	2,273	<0,25	<0,62	>25
CEMM 05-2-069	2,273	<0,25	<0,62	>25
Média Geométrica	2,273	<0,25	<0,62	>25

7.3 Interação *in vitro* de drogas antimicrobianas

Todas as combinações de drogas antifúngicas testadas inibiram o crescimento *in vitro* das 18 cepas de *C. posadasii*, no entanto, foi observada interação sinérgica apenas para voriconazol com anfotericina B (Figura 20), resultado revelado pelos valores do índice da concentração inibitória fracionada (FICI), que são menores nessas duas drogas (Tabela 3). Quando a concentração inibitória mínima (CIM) de cada droga, em combinação, foi comparada com CIM de cada droga isoladamente, detectou-se que a combinação de voriconazol com anfotericina B levou a uma redução de 15 vezes da CIM quando combinada em relação à CIM isolada (Figura 21). Combinações indiferentes foram formadas pela anfotericina B com cetoconazol ou itraconazol ou fluconazol e pela associação entre voriconazol com cetoconazol ou itraconazol ou fluconazol ou caspofungina. Antagonismo entre as drogas testadas não foi observado.

No que concerne à concentração fungicida mínima (CFM), a combinação do voriconazol com anfotericina B apresentou atividade fungicida frente a todas as cepas de *C. posadasii*. As demais combinações analisadas não apresentaram atividade fungicida.

Tabela 3. Concentração inibitória mínima (CIMs), índice da concentração inibitória mínima fracionada (FICI) e efeito de interação para combinação das drogas antifúngicas ($\mu\text{g/mL}$) frente a cepas de *Coccidioides posadasii* *in vitro*.

Combinação	Intervalo da CIM (combinação)		CIM (Média geométrica) (combinação)		FICI	Resultado	Nº de amostras mostrando sinergismo
	Antifúngico ₁	Antifúngico ₂	Antifúngico ₁	Antifúngico ₂			
AMB + KTC	0,014 - 0,058	0,027 - 0,11	0,034	0,068	0,584 - 1,642	Indiferente	0 / 18
AMB + ITC	0,029 - 0,058	0,038 - 0,076	0,043	0,057	0,308 - 1,543	Indiferente	2 / 18
AMB + FLC	0,029 - 0,058	1,562 - 3,125	0,056	3,038	0,716 - 1,464	Indiferente	0 / 18
AMB + VRZ	0,006	0,007	0,006	0,007	0,076 - 0,152	Sinergismo	18 / 18
VRZ + KTC	0,015 - 0,062	0,027 - 0,11	0,040	0,071	0,476 - 1,906	Indiferente	1 / 18
VRZ + ITC	0,031 - 0,062	0,038 - 0,076	0,058	0,071	0,552 - 1,104	Indiferente	0 / 18
VRZ + FLC	0,062 - 0,125	3,125 - 6,250	0,069	3,472	0,748 - 2,00	Indiferente	0 / 18
VRZ + CAS	0,031 - 0,062	8,00 - 16,00	0,056	14,666	0,498 - 1,496	Indiferente	1 / 18

AMB - anfotericina B; **KTC** - cetoconazol; **ITC** - itraconazol; **FLC** - fluconazol; **VRZ** - voriconazol; **CAS** - caspofungina

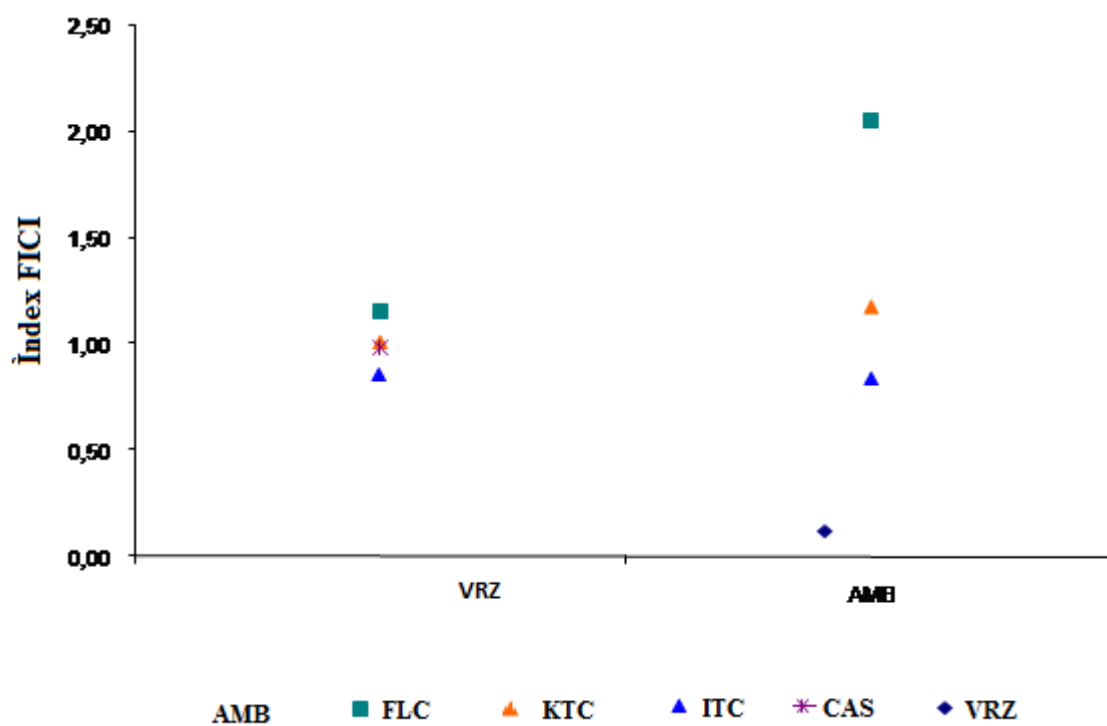
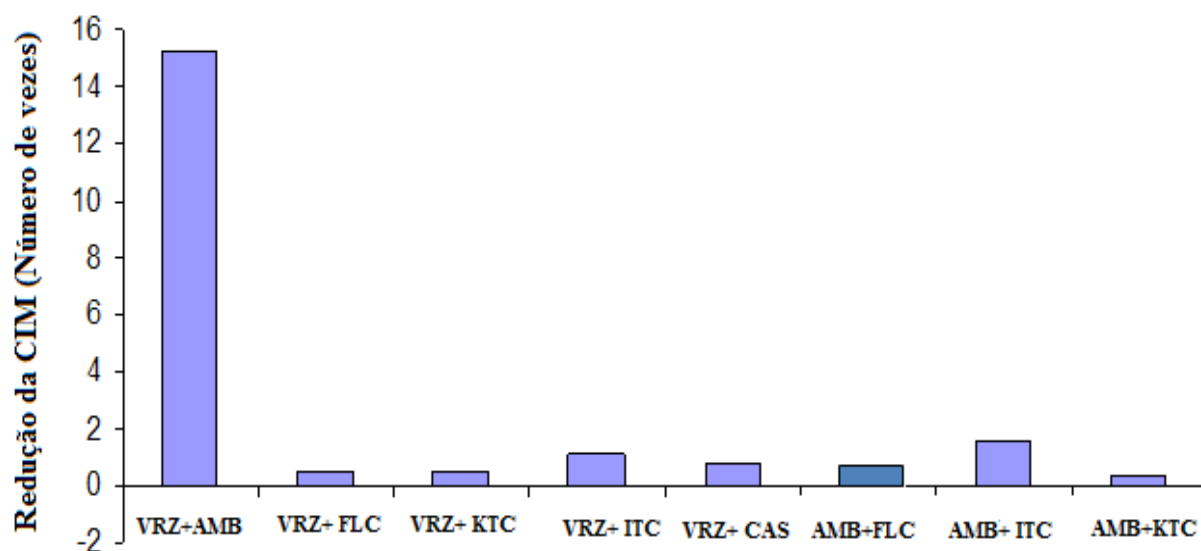


Figura 20. Efeito da combinação de drogas antifúngicas em valores do índice da concentração inibitória mínima fracionada (FICI) frente a cepas de *Coccidioides posadasii* *in vitro*.



AMB - anfotericina B; **KTC** - cetoconazol; **ITC** - itraconazol; **FLC** - fluconazol; **VRZ** - voriconazol; **CAS** - caspofungina

Figura 21. Efeito da combinação de drogas antifúngicas em valores da média geométrica da concentração inibitória mínima (CIM).

Este estudo mostrou que as drogas antifúngicas e antibacterianas testadas, isoladamente e em combinação, apresentaram efeito inibitório *in vitro* no crescimento de cepas de *C. posadasii*. A concentração inibitória mínima (média geométrica) do AMB foi 0,111 µg/mL. No entanto, o SMX / TMP foi capaz de reduzir a CIMs da AMB em todas as cepas de *C. posadasii* testadas em cerca de 5,85 vezes. Depois da combinação com o SMX / TMP, a CIMs da AMB variaram de 0,007 - 0,015 µg/mL. O SMX/ TMP em si também foi capaz de promover a inibição do crescimento de todas as cepas de *C. posadasii in vitro* e os valores de CIM variaram de 1000/200 até 2000/400 µg/mL (Tabela 4). Não foi observado valor crescente da CIM, após quatro e sete dias de incubação.

Com relação ao meio de cultura líquido *Yeast Nitrogen Base* (YNB), todas as cepas de *C. posadasii* não apresentaram crescimento *in vitro* no tubo -controle do teste, que continha meio de cultura YNB sem drogas antimicrobianas.

A tabela 4 mostra a concentração inibitória mínima (CIM) do sulfametoxazol com trimetoprim e anfotericina B, testados em combinação, valores do FICI e efeito inibitório *in vitro* da combinação de ambos os antifúngicos frente a 18 cepas de *C. posadasii* lidas após 48 horas de incubação.

No que diz respeito à concentração fungicida mínima (CFM), do sulfametoxazol com trimetoprim, isolado e em combinação com anfotericina B, houve atividade fungicida frente a todas as cepas de *C. posadasii*.

Tabela 4. Concentração inibitória mínima (CIM) do sulfametoxazol com trimetoprim ($\mu\text{g/mL}$) associado ou não com anfotericina B ($\mu\text{g/mL}$) frente a 18 cepas de *C. posadasii*.

Número de Coleção	CIM ($\mu\text{g/mL}$)		
	AMB	SMX / TMP	AMB / SMX / TMP
CEMM 01-6-085	0,125	2000 / 400	0,007 / 250 / 50
CEMM 01-6-087	0,125	2000 / 400	0,015 / 500 / 100
CEMM 01-6-088	0,125	2000 / 400	0,015 / 500 / 100
CEMM 01-6-089	0,125	1000 / 200	0,015 / 500 / 100
CEMM 01-6-090	0,125	2000 / 400	0,015 / 500 / 100
CEMM 01-6-091	0,125	2000 / 400	0,015 / 500 / 100
CEMM 01-6-092	0,125	2000 / 400	0,015 / 500 / 100
CEMM 01-6-101	0,062	2000 / 400	0,015 / 500 / 100
CEMM 01-6-102	0,125	2000 / 400	0,031 / 1000 / 200
CEMM 01-6-103	0,125	1000 / 200	0,015 / 500 / 100
CEMM 05-2-063	0,125	2000 / 400	0,015 / 500 / 100
CEMM 05-2-064	0,125	2000 / 400	0,015 / 500 / 100
CEMM 05-2-065	0,125	2000 / 400	0,031 / 1000 / 200
CEMM 05-2-066	0,125	1000 / 200	0,015 / 500 / 100
CEMM 05-2-067	0,125	2000 / 400	0,015 / 500 / 100
CEMM 05-2-068	0,062	2000 / 400	0,015 / 500 / 100
CEMM 05-2-069	0,062	1000 / 200	0,015 / 500 / 100
CEMM 05-2-070	0,125	2000 / 400	0,031 / 1000 / 200

AMB - anfotericina B; **SMX**- sulfametoxazol; **TMP** – trimetoprim.

As 24 combinações de drogas antimicrobianas testadas inibiram as cepas de *C. posadasii in vitro*, das quais foram observadas interações sinérgicas em 16 combinações (Figura 22). Entre as combinações sinérgicas, valores menores do que o índice de concentração de inibição fracionada (FICI) foram obtidos pela anfotericina B, cetoconazol, itraconazol ou fluconazol com rifampicina ou etambutol e itraconazol com pirazinamida. Fortes interações, no entanto, foram observadas nas seguintes combinações: anfotericina B ou itraconazol com rifampicina; itraconazol, fluconazol ou voriconazol com etambutol e itraconazol com pirazinamida ($p < 0,0002$) (Tabela 5), as quais foram reduzidas as CIMs em dez vezes, ao se comparar com a CIMs da droga testada isoladamente (Figura 23).

Combinações indiferentes foram formadas pela anfotericina B com pirazinamida; cetoconazol com isoniazida ou pirazinamida; fluconazol ou voriconazol com isoniazida; caspofungina com isoniazida, etambutol ou pirazinamida (Tabela 5). Antagonismo entre as drogas testadas não foi observado.

No Anexo I, são mostradas tabelas, as quais exibem a concentração inibitória mínima (CIMs) de cada droga antifúngica testada, isolada e em combinação, valores do índice da concentração inibitória fracionada (FICI) e efeito inibitório *in vitro* da combinação entre drogas antimicrobianas frente a cepas de *C. posadasii*.

Tabela 5. CIMs, FICI e efeito de interação *in vitro* da combinação entre drogas antifúngicas ($\mu\text{g/mL}$) e drogas antituberculose (mg/mL) frente a cepas de *C. posadasii*.

Combinação	Intervalo da CIM (combinação)		CIM – Média Geométrica (combinação)		FICI	Resultado	Nº. de cepas apresentando sinergismo
	Antifúngico	Antituberculose	Antifúngico	Antituberculose			
AMB + RIF	0,007 – 0,029	0,14 - 0,56	0,01	0,203	0,088 - 0,496	Sinergismo	15 / 15
AMB + INH	0,029	0,062	0,029	0,062	0,48 - 0,495	Sinergismo	15 / 15
AMB + PZA	0,029 – 0,058	6,25 – 12,5	0,03	6,545	0,482 - 0,964	Indiferente	14 / 15
AMB + ETB	0,014 - 0,029	0,077 - 0,155	0,027	0,147	0,244 - 0,50	Sinergismo	15 / 15
KTC + RIF	0,013 - 0,055	0,141 - 0,567	0,03	0,31	0,149 - 0,886	Sinergismo	13 / 15
KTC + INH	0,027 - 0,110	0,031 - 0,125	0,063	0,071	0,297 - 1,658	Indiferente	3 / 15
KTC + PZA	0,027 - 0,055	3,12 - 6,25	0,052	5,967	0,246 - 0,57	Indiferente	1 / 15
KTC + ETB	0,013 - 0,055	0,038 - 0,155	0,03	0,084	0,246 - 0,816	Sinergismo	13 / 15
ITC + RIF	0,009 - 0,019	0,141 - 0,283	0,014	0,214	0,105 - 0,418	Sinergismo	15 / 15
ITC + INH	0,009 - 0,038	0,015 - 0,062	0,031	0,051	0,13 - 0,552	Sinergismo	10 / 15
ITC + PZA	0,009 - 0,038	1,562 - 6,25	0,017	2,983	0,098 - 0,498	Sinergismo	15 / 15
ITC + ETB	0,009 - 0,038	0,038 - 0,155	0,015	0,063	0,079 - 0,554	Sinergismo	14 / 15
FLC + RIF	0,55 - 2,22	0,283 - 1,135	1,108	0,566	0,242 - 1,245	Sinergismo	11 / 15
FLC + INH	1,11 - >4,44	0,062 - > 0,25	3,042	0,171	0,425 - 2,42	Indiferente	1 / 15
FLC + PZA	0,277 - 1,11	1,56 - 6,25	0,766	4,316	0,106 - 0,605	Sinergismo	13 / 15
FLC + ETB	0,277 - 0,555	0,038 - 0,077	0,401	0,055	0,105 - 0,301	Sinergismo	15 / 15
VRZ + RIF	0,007 - 0,031	0,141 - 0,56	0,02	0,324	0,118 – 0,776	Sinergismo	13 / 15
VRZ + INH	0,031 - 0,125	0,062 - 0,25	0,071	0,143	0,496 – 2,00	Indiferente	2 / 15
VRZ + PZA	0,031	6,250	0,031	6,25	0,498	Sinergismo	15 / 15
VRZ + ETB	0,007 – 0,015	0,038 - 0,077	0,01	0,05	0,117 – 0,244	Sinergismo	15 / 15
CAS + RIF	2,00 - 8,00	0,14 - 0,56	4,189	0,293	0,157 – 1,028	Sinergismo	12 / 15
CAS + INH	8,00 – 16,00	0,062 - 0,125	12,125	0,094	0,601 – 1,207	Indiferente	0 / 15
CAS + PZA	8,00 - 16	6,25 - 12,25	12,125	9,473	1,00 – 1,50	Indiferente	0 / 15
CAS + ETB	8,00 - 32,00	0,15 - 0,62	16	0,309	0,594 – 2,00	Indiferente	0 / 15

AMB - anfotericina B; **KTC** - cetoconazol; **FLC** - fluconazol; **ITC** - itraconazol; **VRZ** - voriconazol; **CAS** - caspofungina; **RIF** - rifampicina; **INH** - isoniazida; **PZA** - pirazinamida; **ETB** – etambutol.

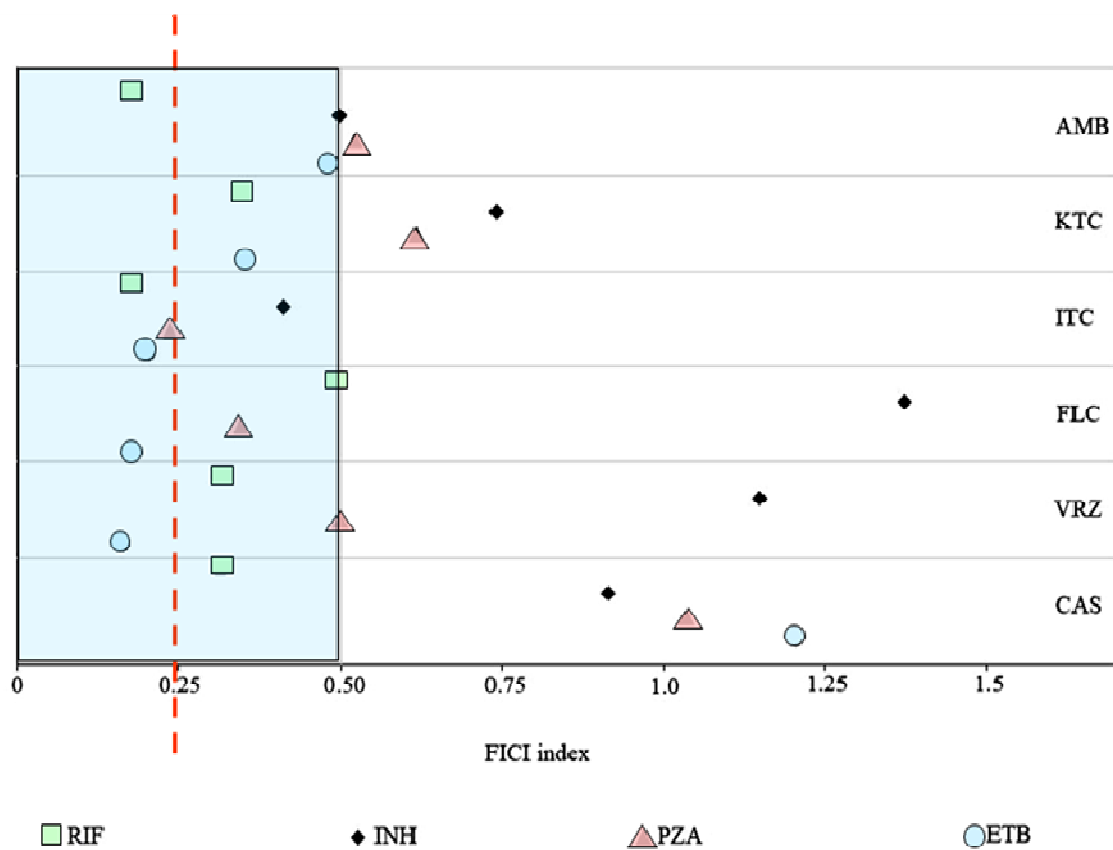
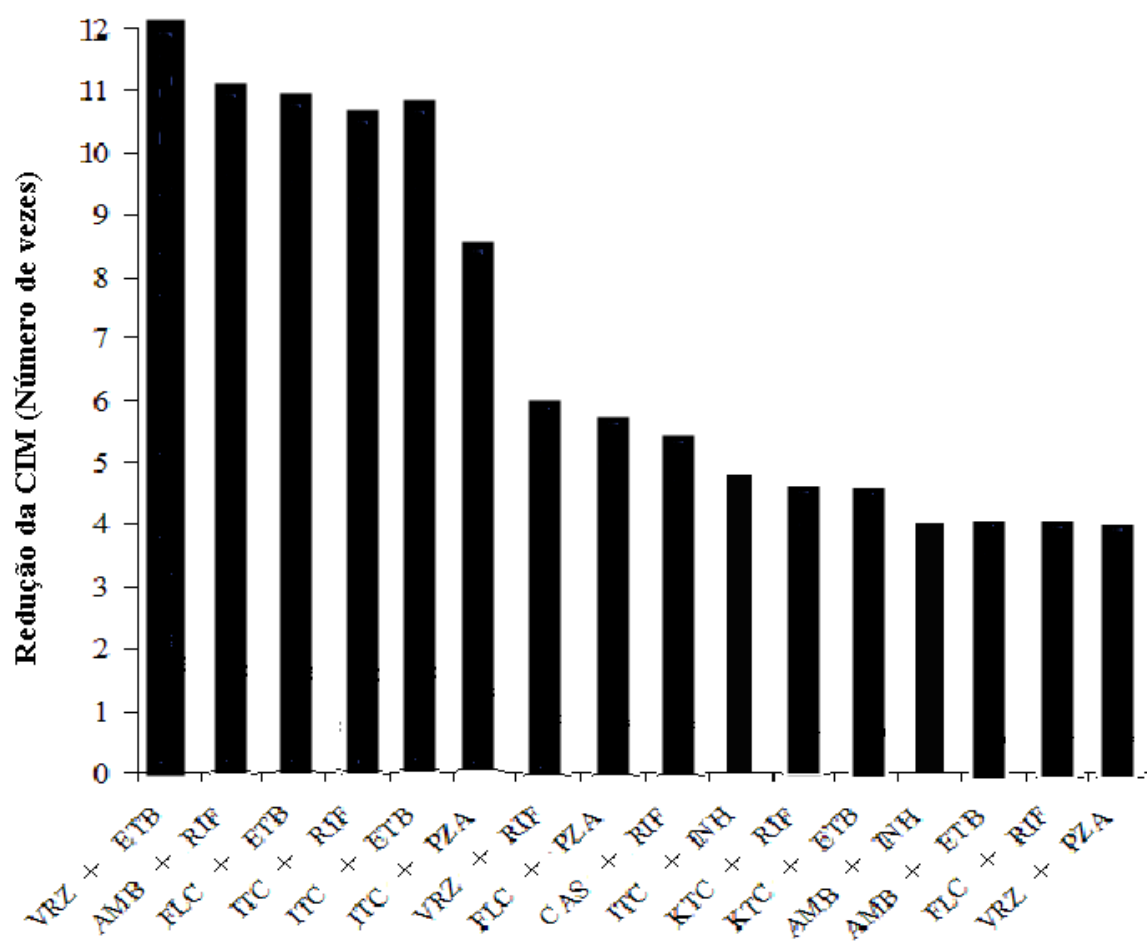


Figura 22. FICI para cada combinação de antimicrobianos testados frente a cepas de *C. posadasii*.



AMB - anfotericina B; **KTC** - cetoconazol; **ITC** - itraconazol; **FLC** - fluconazol; **VRZ** - voriconazol; **CAS** - caspofungina; **RIF** - rifampicina; **INH** - isoniazida; **PZA** - pirazinamida; **ETB** - etambutol.

Figura 23. Efeito da combinação de antimicrobianos em valores da média geométrica da concentração inibitória mínima (CIM).

8 DISCUSSÃO

A coccidioidomicose representa um importante desafio terapêutico, em razão a refratariedade ao tratamento e recidivas (OLDFIELD et al., 1997; CHILLER et al., 2003; ANTONY, 2004; STEVENS, 2007). Com a finalidade de ampliar o leque de opções no tratamento desta doença, a busca de novos alvos antifúngicos para a coccidioidomicose tem sido propostas, através da combinação de antifúngicos (ODDS, 2003b), a descoberta de novas drogas antifúngicas (SHUBITZ et al., 2006), testes com antimicrobianos de amplo espectro com potencial antifúngico (STEVENS et al., 1982; HAHN et al., 2003; YEKETUEL et al. 2004) e testes com drogas antituberculose (CORDEIRO et al., 2006c).

A combinação de drogas antifúngicas é uma opção que está adquirindo importância como terapêutica alternativa nos casos de pacientes com infecções fúngicas invasivas graves não responsivos a monoterapia antifúngica habitual (GALGIANI, 2000; CUENCA-ESTRELLA, 2004, 2006; MUKHERJEE et al., 2005; O'SHAUGHNESSY et al., 2006; GUBLER et al., 2007; PÉREZ-DIAZ, 2010). Nos últimos anos, vários estudos *in vitro* e *in vivo* têm sugerido que a terapia combinada antifúngica pode ser melhor do que a monoterapia com anfotericina B em pacientes imunodeprimidos (ARIKAN et al., 2002; BARCHIESI et al., 2000, 2005; BALLESTER et al. 2008; CÓRDOBA et al., 2008). Entre as razões que justificam o uso da dupla ou tripla combinação antimicrobiana, Vazquez (2008) apontou a possibilidade de reduzir as doses da droga e, como consequência, minimizar os efeitos colaterais de cada droga, bem como minimizar o fenômeno de resistência.

Novas estratégias com resultados promissores vêm sendo alcançadas com o uso da combinação de antifúngicos, frente a diversas espécies fúngicas (DURAND-JOLY et al., 2003; JONHSON et al., 2004; HO et al., 2007). Dentre as combinações já documentadas estão os derivados azólicos com poliênicos, equinocandinas com azólicos ou poliênicos, as quais têm apresentado interação *in vitro* frente à diversas espécies fúngicas como, *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Fusarium*, *Rhizopus* spp., e *Scedosporium* spp. (ARIKAN et al., 2002; BARCHIESI et al., 2000, 2004, 2005; YUSTES & GUARRO, 2005; BALLESER et al., 2008; CÓRDOBA et al., 2008; YU et al., 2008).

Corroborando com outros estudos (GONZÁLEZ et al., 2001; NAKAI, 2003; CORDEIRO et al., 2006b; RAMANI & CHATURVEDI, 2007), a presente pesquisa evidenciou que as cepas de *C. posadasii* oriundas do Nordeste brasileiro foram sensíveis *in vitro* a anfotericina B, cetoconazol, itraconazol, fluconazol, voriconazol e caspofungina testadas isoladamente. Os valores da concentração inibitória mínima destas drogas antifúngicas frente a cepas de *C. posadasii* reproduziram os resultados já relatados por Cordeiro et al. (2006b). Neste trabalho, o efeito inibitório das drogas foi mais evidente quando as drogas antifúngicas foram utilizadas em combinação, as quais foram capazes de inibir o crescimento *in vitro* de cepas de *C. posadasii* com concentração inibitória mínima (CIM) baixas. No entanto, apenas uma combinação anfotericina B com voriconazol exibiu interação sinérgica.

Diversos estudos têm demonstrado que a associação de anfotericina B com voriconazol apresenta interação sinérgica *in vitro* frente a outras espécies fúngicas como *Candida glabrata* e *Cryptococcus* spp. (BARCHIESI et al., 2004; MUKHERJEE et al., 2005) e interação sinérgica *in vivo* frente a *Aspergillus* sp., *Candida albicans* e *Fusarium solani* (BARCHIESI et al., 2004; MULDREW et al., 2005; PHILIP et al., 2005; RUIZ - CENDOYA et al., 2008).

A combinação de anfotericina B com voriconazol na forma de tratamento já foi bem sucedida em pacientes meningite coccidióidica (ANTONY et al., 2006) forma grave e freqüentemente fatal da coccidioidomicose. Os resultados obtidos nesta pesquisa registram dados da interação sinérgica *in vitro* da combinação anfotericina B com voriconazol frente a *C. posadasii*. Por tanto, há uma necessidade urgente de realizar ensaios clínicos controlados, a fim de definir a segurança e utilidade desta combinação na terapia antifúngica.

A introdução de novos agentes antifúngicos com diferentes mecanismos de ação tornou possível o uso da combinação de drogas antifúngicas (ANTONY et al., 2006; O'SHAUGHNESSY et al., 2006). No entanto, a combinação de anfotericina B com derivados azólicos tem apresentado diferentes respostas de interação *in vitro* frente a diversas espécies fúngicas como *Cryptococcus* spp., *Candida* spp. e *Aspergillus* spp. (MARINÉ et al., 2006; OZ et al., 2008). Neste estudo, interações indiferentes foram formadas pela anfotericina B com cetoconazol, itraconazol ou fluconazol frente a *C. posadasii* *in vitro*. Estes resultados corroboram com Barchiesi et al. (2000) e Kratzer et al.

(2006) os quais mostraram que a combinação entre derivados azólicos com anfotericina B apresentaram interação indiferente *in vitro* frente a outras espécies fúngicas como *Candida* spp. e *Cryptococcus neoformans* e *Trichoderma* spp. respectivamente.

Os derivados azólicos atuam na biossíntese do ergosterol através da inibição seletiva do lanosterol 14 - α - esterol desmetilase (P- 450), causando a depleção do ergosterol, e originando anomalias na permeabilidade da membrana (CHAPMAN et al., 2008). Anfotericina B atua alterando a permeabilidade da membrana celular fúngica, sua ligação ao ergosterol, provoca fugas de cátions e íons hidrogênio terminando com a morte celular (CHAPMAN et al., 2008). Devido, a inibição simultânea do mesmo alvo da célula fúngica por mecanismos diferentes, em teoria, os azólicos poderiam antagonizar os efeitos da anfotericina B (SCHEVEN & SCHWEGLER, 1995; SUGAR, 1995). No entanto, segundo Wroblewska et al. (2002), os derivados azólicos poderiam apresentar uma atividade lenta em comparação a anfotericina B que possui uma atividade de início rápido frente a outras espécies fúngicas como *Candida* e *Cryptococcus* spp., permitindo o aumento da penetração do azólico na membrana celular como resultado da atividade prévia da anfotericina B, potencializando assim a morte celular fúngica. É provável que os derivados azólicos associados à anfotericina B apresentem este mecanismo de ação frente a cepas de *C. posadasii*. Além disso, é possível que voriconazol, triazólico de segunda geração, apresente propriedades farmacodinâmicas favoráveis quando combinado com anfotericina B, em comparação a cetoconazol, itraconazol e fluconazol quando associados com anfotericina B respectivamente que apresentaram interação indiferente.

Nesta pesquisa, foi avaliada a interação *in vitro* de voriconazol com cetoconazol, itraconazol e fluconazol respectivamente, onde foram mostradas interações indiferentes frente a cepas de *C. posadasii*. A interação indiferente define-se quando o resultado com duas drogas é igual ao obtido apenas com aquela que é mais eficaz (RONALD J. & TALLARIDA, 2001; JOHNSON et al., 2004), baseado nesta definição é possível, que o voriconazol, triazólico de segunda geração, apresente a mesma eficácia, tanto isoladamente como em combinação com outros azólicos que possuam o mesmo mecanismo de ação. Este resultado mostra que a interação sinérgica de drogas só é possível quando as drogas em combinação possuem diferentes mecanismos de ação (O'SHAUGHNESSY et al., 2006). Os azólicos, equinocandinas e poliênicos são potenciais candidatos à terapêutica

combinada, constituindo alvos de interesse de estudos nesta área (O'SHAUGHNESSY et al., 2006).

A combinação de voriconazol com caspofungina, tem apresentado diferentes respostas de interação *in vitro* (MANAVATHU et al., 2003; DEMCHOK et al., 2010). Gubler et al. (2007) demonstraram que a combinação de voriconazol com caspofungina na forma de tratamento foi bem sucedida em paciente com aspergilose disseminada. Segundo Johnson et al. (2004), existe interação sinérgica entre equinocandinas e os derivados azólicos, uma vez que ambas drogas quando combinadas poderiam atuar inibindo simultaneamente diferentes alvos das células fúngicas, como a parede celular (caspofungina) e membrana células fúngica (voriconazol).

Neste estudo nós investigamos o efeito de cotrimoxazol – associação antimicrobiana formado por sulfametoxazol com trimetoprim, que possui um amplo espectro de ação - sobre a sensibilidade de *C. posadasii* a anfotericina B, que é a droga mais importante para a forma fatal da coccidioidomicose.

Os derivados das sulfanamidas são drogas bacteriostáticas, inibidores do metabolismo do folato dos microrganismos bacterianos. Estes compostos têm um amplo espectro antimicrobiano contra várias bactérias aeróbias Gram-positivas (MAGALHÃES et al., 2010), e Gram-negativas (TAVARES, 2007) bem como algumas espécies de protozoários (FRANCIS et al., 2004), sendo freqüentemente utilizado como profilaxia para evitar a aspergilose disseminada (AFELTRA et al., 2001) e prevenção e tratamento de pneumonia por *Pneumocystis jiroveci* em pacientes com AIDS (THOMAS et al., 2009). Embora estes compostos não sejam drogas de primeira linha comum no tratamento de infecções fúngicas, a associação de sulfametoxazol com trimetoprim tem mostrado bons resultados terapêuticos na paracoccidioidomicose (HAHN et al., 2003; SCAVONE et al. 2004). Assim mesmo recentemente Brilhante et al. (2010) evidenciaram efeito inibitório *in vitro* do sulfametoxazol com trimetoprim frente a cepas de *Histoplasma capsulatum*.

O presente estudo avaliou o efeito do sulfametoxazol com trimetoprim na relação 5:1 utilizada no tratamento da paracoccidioidomicose (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006) frente a cepas de *C. posadasii in vitro*, baseados na similaridade filogenética entre os

membros da família Onygenaceae a qual compreende os fungos dimórficos: *Coccidioides immitis* e *C. posadasii*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum* e *Blastomyces dermatitidis* (BAGAGLI et al., 2006; COX & MAGEE, 2004).

A associação sulfametoxazol com trimetoprim na relação 5:1 é a droga de escolha na rotina diária nos quadros de paracoccidioidomicose (STEVENS et al., 1982; DO VALLE et al., 1993; WANKE, 2005; SHIKANAI - YASUDA et al., 2006). Esta associação antimicrobiana apresenta boa difusibilidade para todos os órgãos e sistemas, além do baixo custo é considerada alternativa eficaz no tratamento da paracoccidioidomicose (PANIAGO et al., 2003; VISBAL et al., 2005; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). No Brasil, a associação sulfametoxazol com trimetoprim está disponível comercialmente em comprimidos na relação 5:1, a qual é distribuída gratuitamente pela rede pública de assistência médica para doentes que não conseguem arcar com o custo do tratamento crônico (WANKE, 2005).

Nesta pesquisa foi mostrado que o sulfametoxazol com trimetoprim foi capaz de aumentar a sensibilidade de *C. posadasii* a anfotericina B, reduzindo a concentração inibitória mínima em cerca de 5,85 vezes. Assim mesmo, foi demonstrado que a associação sulfametoxazol com trimetoprim também foi capaz de inibir o crescimento *in vitro* de *C. posadasii*.

Em um trabalho anterior, Hanafy et al (2007) encontraram uma grande variabilidade entre as CIMs do sulfametoxazol contra *Cryptococcus* sp. Os autores mostraram que valores mais elevados de CIM foram encontrados quando testes de sensibilidade foram realizados em meios enriquecidos, tais como RPMI e caldo batata, pois podem estar contaminados com compostos de PABA ou PABA-relacionados. O meio de cultura, RPMI 1640 é o meio padrão descrito pelo CLSI (2002) para teste de sensibilidade *in vitro* de fungos filamentosos.

O RPMI é um meio cuja mistura contém sais, aminoácidos, vitaminas, e outros componentes essenciais para o crescimento celular, porém dentro destes componentes encontra-se o ácido paraminobenzóico (PABA). A atividade antimicrobiana *in vitro* das sulfonamidas é influenciada pela composição do meio de ensaio, uma vez que a presença de PABA inibe a sua atividade, devido que as sulfonamidas atuam como um antagonista

competitivo do ácido p-aminobenzóico (PABA), que é um componente integrante da estrutura do ácido fólico da célula bacteriana.

Neste estudo, procurou-se realizar os testes de suscetibilidade com b⁷⁶ nitrogenada de levedura (*Yeast Nitrogen Base* - YNB), como sugerido por Afeltra et al. (2002) e Hanafy et al. (2007), em cuja composição possui PABA quatro vezes menor do que o médio RPMI, mas, infelizmente, este meio não suportou o crescimento de *C. posadasii in vitro* (dados não mostrados). Como outros estudos já foram realizados em RPMI (YEKUTIEL et al., 2004; NAVARRO-MARTÍNEZ et al., 2006), decidimos avaliar esse meio em nosso estudo. No entanto, supomos que em meio livre de PABA, o sulfametoxazol com trimetoprim pode levar a uma redução mais expressiva na CIMs da anfotericina B.

De acordo com Navarro et al. (2006), a interrupção da via biossintética do ácido fólico também prejudica a produção de ergosterol em *Candida albicans*, possivelmente por perturbação do metabolismo do esteroil metiltransferase C24, como a síntese de seu substrato também está bloqueado. Embora nesta pesquisa não tenha sido testados essa hipótese em *C. posadasii*, parecia possível que o sulfametoxazol com trimetoprim tinha causado uma perturbação na síntese de ergosterol. Supomos que baixas concentrações de anfotericina B pode ter causado danos leves na membrana plasmática dos fungos, permitindo uma fuga de íons moderada.

Além disso, estes canais através da membrana pode ter auxiliado a entrada do sulfametoxazol com trimetoprim na célula. Portanto, acreditamos que o bloqueio de ácido fólico pode ser um alvo potencial para a inibição de *C. posadasii*. O mecanismo de ação de sulfas com mais afinidade para diidrofolato redutase ou de outras enzimas da via biossintética do ácido fólico poderia tornar uma intensa inibição de fungos. Na verdade, este caminho parece ser determinante para a viabilidade de fungos, como mostrado em mutantes de *Aspergillus fumigatus* com defeito na biossíntese de folato, que provaram ser avirulentos (Brown et al., 2000).

Por tanto, os resultados obtidos neste estudo indicam o potencial da combinação do sulfametoxazol com trimetoprim e anfotericina B, que tem demonstrado um efeito inibidor sobre cepas de *C. posadasii*, mesmo em concentrações sub-CIMs da

anfotericina B. Além disso, os resultados mostraram que o sulfametoxazol com trimetoprim também tem um efeito inibitório sobre *C. posadasii*, sugerindo que o bloqueio de ácido fólico pode ser um alvo potencial antifúngico para *C. posadasii*. Estes dados são dignos 77 nota, uma que este é o primeiro relato do potencial antifúngico de sulfas contra este patógeno.

Neste estudo foi evidenciado que as cepas de *C. posadasii* foram sensíveis *in vitro* a rifampicina, isoniazida e etambutol testadas isoladamente. Os valores da concentração inibitória mínima destas drogas antituberculose frente a cepas de *C. posadasii* reproduziram os resultados já relatados por Cordeiro et al. (2006c). Neste trabalho, o efeito inibitório das drogas foi mais evidente quando as drogas antituberculose foram utilizadas em combinação com as drogas antifúngicas, indicando a existência de efeito sinérgico *in vitro* frente a cepas de *C. posadasii*. A combinação de voriconazol com etambutol; anfotericina B com rifampicina; fluconazol com etambutol; itraconazol com rifampicina ou etambutol, apresentaram interação sinérgica, com redução em até 10 vezes da CIM de cada droga.

Com relação à combinação da rifampicina em combinação com os antifúngicos, os resultados do presente estudo mostraram que, entre as drogas antituberculose, apenas rifampicina tem potencial de interação sinérgica com todas as combinações de antifúngicos, independentemente do seu mecanismo de ação. Este fato é devido que esta droga antituberculose quando combinada com derivados azólicos, anfotericina B e caspofungina respectivamente, causou uma diminuição nos valores da concentração inibitória mínima em comparação com a concentração inibitória mínima de cada droga quando testada isoladamente.

O potencial antifúngico de rifampicina isoladamente ou em combinação com antifúngicos foi investigado anteriormente. Estudos pioneiros têm mostrado o sinergismo entre rifampicina e anfotericina B contra cepas de *Coccidioides immitis* (HUPPERT et al., 1976), *Histoplasma capsulatum* (KOBAYASHI et al., 1972), *Blastomyces dermatitidis*, *Candida albicans* (BEGGS et al., 1976; EDWARDS et al., 1980), *Cryptococcus neoformans* (FUJITA et al., 1981) e cepas de *Aspergillus* spp. (HUGHES et al., 1984). Mais recentemente, o efeito sinérgico da rifampicina e anfotericina B foi demonstrado *in vitro* frente a *Aspergillus* spp. e *Rhizopus* spp. (EL-AZIZI, 2007).

Rifampicina é um derivado semi-sintético da rifamicina B, cujo alvo primário de ação é a síntese do RNA. Este antibiótico inibe a síntese protéica bacteriana em todos ⁷⁸ seus estágios, impedindo a formação do RNA mensageiro, RNA ribossomal e RNA de transporte (TAVARES, 2007). Já anfotericina B age ligando-se aos esteróis da membrana celular do fungo sensível, alterando a permeabilidade da membrana e provocando extravasamento dos componentes intracelulares (JOHNSON et al., 2004). Diante destes dados, parece ser que o fator farmacodinâmico seja o responsável pela interação sinérgica de ambas as drogas, permitindo assim que anfotericina B altere a membrana fúngica e a rifampicina penetre facilmente na membrana celular fúngica atingindo assim o seu alvo na síntese de DNA.

Clinicamente, interações medicamentosas entre rifampicina e vários antimicrobianos têm sido relatadas. Embora neste estudo, a combinação entre rifampicina e as drogas antifúngicas tenham apresentando interação sinérgica *in vitro*, estudos *in vivo* mostraram que a rifampicina pode reduzir os níveis plasmáticos de cetoconazol, fluconazol, itraconazol, voriconazol e posaconazol (BACIEWICZ et al., 2008), provavelmente devido a existência de fatores farmacocinéticos.

Com relação à combinação de rifampicina com equinocandinas neste estudo foi demonstrada a interação sinérgica *in vitro* entre estas drogas. No entanto, segundo alguns autores, esta combinação tem demonstrado resultados contraditórios *in vivo*. A interação medicamentosa destas duas drogas tem demonstrado que a rifampicina tanto induz como inibe a disposição da caspofungina.

De acordo com Stone et al. (2004), a co-administração de rifampicina e caspofungina pode aumentar a depuração deste último fármaco, neste caso, uma maior dose de caspofungina é necessária para o seu tratamento bem sucedido. Belmares et al. (2005) relatou uma falha do tratamento com caspofungina em um paciente que tinha recebido também rifampicina previamente. Novos estudos devem ser realizados para melhor compreender as interações de rifampicina com equinocandinas.

O potencial sinérgico da isoniazida, etambutol e pirazinamida com antifúngicos nunca foi investigado antes. Como consequência, interações farmacocinéticas entre estas drogas são desconhecidas. Neste estudo, foram encontradas interações sinérgicas *in vitro* entre isoniazida com anfotericina B ou itraconazol; etambutol com anfotericina B, cetoconazol ou triazólicos; e pirazinamida com triazólicos.

A isoniazida é uma pró-droga bactericida que atua através da inibição da síntese do ácido micólico presente na parede celular do *Mycobacterium tuberculosis*. Seguidamente a droga ativa a catalase - peroxidase micobacteriana, várias espécies reativas de oxigênio e radicais orgânicos são gerados, prejudicando o metabolismo do DNA, lipídios, carboidratos e o NAD (ZHANG, 2005). Supomos que danos inespecíficos também podem ocorrer na parede fungica. A associação sinérgica entre isoniazida com anfotericina B ou itraconazol necessita de futuras investigações para compreender seus mecanismos de ação.

Etambutol é um medicamento micobacteriostático que inibe a biossíntese do arabinogalactanos da parede celular (ZHANG, 2005). Sítios análogos a esta droga pode ser encontrados na mitocôndria dos fungos (CORDEIRO et al., 2006c). Outro mecanismo de ação do etambutol pode estar relacionado com a inibição de moléculas derivadas da galactose, tais como galactomananos da parede celular das cepas de *C. posadasii*. Neste estudo, foi mostrado que o etambutol apresentou interações sinérgicas apenas com fármacos que tem como alvo os esteróis na membrana plasmática das células fúngicas, exemplo: anfotericina B e derivados azólicos. Os resultados apresentados neste documento abrem um amplo campo de investigação sobre o potencial antifúngico do etambutol contra muitas outras espécies fúngicas.

É interessante notar que, embora pirazinamida testado isoladamente não tenha efeito inibitório contra as cepas de *C. posadasii* (CORDEIRO et al., 2006c), interações sinérgicas entre pirazinamida com triazólicos foram observados neste estudo. Acreditamos que a baixas doses de drogas antifúngicas alteraram a integridade da membrana dos fungos, permitindo a penetração da pirazinamida na célula e atingir seus alvos moleculares. Como pirazinamida altera o metabolismo energético da membrana no *Mycobacterium tuberculosis*, é provável que o efeito inibitório detectados nas células de *C. posadasii* pode ser como resultados de danos mitocondriais conforme sugerido por Cordeiro et al. (2006c).

Futuros estudos em modelos animais são necessários para confirmar a utilidade destas combinações. Este trabalho é fonte de apoio para novas investigações de combinações que resultem em interações sinérgicas, bem como para determinar a correlação de resultados *in vivo*.

9 CONCLUSÕES

- 2 Voriconazol atua sinérgicamente com anfotericina B *in vitro* frente a cepas de *Coccidioides posadasii*. Por tanto, há uma necessidade urgente de realizar ensaios clínicos controlados, a fim de definir a segurança e utilidade desta combinação na terapia antifúngica.
- 3 A associação sulfametoxazol e trimetoprim tem efeito inibitório sobre *C. posadasii in vitro*.
- 4 Sulfametoxazol e trimetoprim aumenta a sensibilidade de *C. posadasii in vitro* frente a anfotericina B, mesmo em concentrações sub-CIMs da anfotericina B.
- 5 A associação de drogas antituberculose (etambutol e pirazinamida) potencializa a atividade antifúngica dos derivados azólicos, especialmente dos triazólicos em cepas de *C. posadasii in vitro*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFELTRA, J.; MEIS, J. F.; MOUTON, J. W.; VERWEIJ, P. E. Prevention of invasive aspergillosis in AIDS by sulfamethoxazole. **AIDS**. v. 15, n. 8, p. 1067 - 1068, May, 2001.

AFELTRA, J. et al. *In vitro* Activities of pentamidine, pyrimethamine, trimethoprim, and sulfonamides against *Aspergillus* species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 46, n. 6, p. 2029 - 2031, June, 2002a.

AFELTRA, J. et al. *In vitro* interaction of amphotericin B and cotrimoxazole against clinical isolates of *Aspergillus* species using RPMI and AM3. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 42, p. 27 - 30, September, 2002b.

AFELTRA, J.; VERWEIJ, P. E. Antifungal activity of nonantifungal drugs. **European Journal Clinical Microbiology Infectious Diseases**. v. 22, n. 7, p. 397 - 407, July, 2003.

AMPEL, N. M. Combating opportunistic infections: coccidioidomycosis. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 5, n. 2, p. 255- 261, February, 2004.

AMPEL, N. M. et al. Factors and outcomes associated with the decision to treat primary pulmonary coccidioidomycosis. **Clinical Infectious Diseases**. v. 48, n. 2, p. 172 - 178, January, 2009.

ANTONY, S. Use of the echinocandins (caspofungin) in the treatment of disseminated coccidioidomycosis in a renal transplant recipient. **Clinical Infectious Diseases**. v. 39, n. 6, p. 879 - 880, September, 2004.

ANTONY, S. J.; JURCZYK, P.; BRUMBLE, L. Successful use of combination antifungal therapy in the treatment of *Coccidioides* meningitis. **Journal of the National Medical Association**. v. 98, n. 6, p. 940 - 942, June, 2006.

ANSTEAD et al. Refractory coccidioidomycosis treated with posaconazole. **Clinical Infectious Diseases**. v. 40, n.15, p. 1770-1776, June, 2005.

AQUILAR, J. A. et al. Pericarditis caused by coccidioidomycosis. Report of a case. **Archivos de Cardiología de México**. v.71, n. 4, p. 313–318, October/ December, 2001.

ASSI, M. A. et al. Disseminated coccidioidomycosis in a liver transplant recipient with negative serology: use of polymerase chain reaction. **Liver Transplantation**. v. 12, n. 8, 1290–1292, August, 2006.

ARIKAN, S. et al. *In vitro* synergy of caspofungin and amphotericin B against *Aspergillus* and *Fusarium* spp. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 46, n. 1, p. 245 - 247, January, 2002.

AVILES - SALAS, A.; QUINTERO - CUADRA, Y.; CORNEJO-JUÁREZ. P. Coccidioidomycosis extrapulmonar. Presentación de un caso y revisión de la literatura. **Revista chilena de infectología**. v. 24, n. 5, p. 398 - 401, Octubre, 2007.

BACIEWICZ, A. M. et al. Update on rifampin and rifabutin drug interactions. **The American Journal of the Medical Sciences**. v. 335, n. 2, p. 126 - 136, February, 2008.

BAGAGLI, E. S. et al. Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. **Infection Genetics and Evolution**. v. 6, n. 5, p. 344 - 351, September, 2006.

BALLESTER, F.; PASTOR, F. J.; GUARRO, J. *In vitro* activities of combinations of amphotericin B, posaconazole and four other agents against *Rhizopus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 61, p. 755 - 757, January, 2008.

BAPTISTA - ROSAS, R. C.; HINOJOSA, A.; RIQUELME, M. Ecological niche modeling of *Coccidioides* spp. in western North american deserts. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 1111, n. 1, p. 35 - 46, September, 2007.

BARCHIESI, F. et al. Interactions between triazoles and amphotericin B against *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 44, n. 9, p. 2435 – 2441, September, 2000.

BARCHIESI, F. et al. *In vitro* activities of voriconazole in combination with three other antifungal agents against *Candida glabrata*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 48, n. 9, p. 3317 – 3322, September 2004.

BARCHIESI, F. et al. Caspofungin in combination with amphotericin B against *Candida glabrata*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 49, n. 6, p. 2546 – 2549, June, 2005.

BEGGS, W. H.; SAROSI, G. A.; WALKER, M. I. Synergistic action of amphotericin B and rifampin against *Candida* species. **The Journal Infectious Diseases**. v. 133, n. 2 p. 206–209, February, 1976.

BELMARES, J.; COLAIZZI, L.; PARADA, J. P.; JOHNSON, S. Caspofungin treatment failure in a patient with invasive candidiasis and concomitant rifampicin treatment. **International Journal Antimicrobial Agents**. v. 26, n. 3, p. 264 – 265, September, 2005.

BERGOLD, A. M.; GEORGIADIS, S. Novidades em fármacos antifúngicos: uma revisão. New antifungic drugs: a review. **Visão Acadêmica**. v. 5, n. 2, p. 159 - 172, Julho- Dezembro, 2004.

BIALEK, R. et al. PCR assays for identification of *Coccidioides posadasii* based on the nucleotide sequence of the antigen 2/proline-rich antigen. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 42, n. 2, p. 778 - 783, February, 2004.

BINNICKER, M. J. et al. Detection of *Coccidioides* species in clinical specimens by Real-Time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 45, n. 6, p. 173 - 178, January, 2007.

BLAIR, J. E. et al. Serologic testing for symptomatic coccidioidomycosis in immunocompetent and immunosuppressed hosts. **Mycopathologia**. v. 162, n. 5, p. 317 - 324, November, 2006.

BLAIR, J. E. et al. Coccidioidomycosis in elderly persons, **Clinical Infectious Diseases**. v. 47, n. 12, p. 1513 - 1518, December, 2008.

BRILHANTE, R. S. N.; ROCHA, M. F.G; PAIXÃO, G. C. Corantes e soluções em Micologia. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F.G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004. Cap. 32, p. 327 - 334.

BRILHANTE, R. S. et al. Coccidioidal pericarditis: a rapid presumptive diagnosis by an in-house antigen confirmed by mycological and molecular methods. **Journal of Medical Microbiology**. v. 57 (Pt 10), p. 1288 - 1292, October, 2008.

BRILHANTE, R. S. N. et al. *In vitro* effect of sulfamethoxazole-trimethoprim against *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 54, n. 9, p. 000, September, 2010.

BROWN, J. S.; AUFAUVRE-BROWN, A.; BROWN, J.; JENNINGS, J. M.; ARST, H. JR.; HOLDEN, D. W. Signature-tagged and directed mutagenesis identify PABA synthetase as essential for *Aspergillus fumigatus* pathogenicity. **Molecular Microbiology**. v. 36, n. 6, p. 1371 – 1380, June, 2000.

CAMARGO, Z. P. Técnicas imunológicas em micologia. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004. Cap. 34, p. 349 - 357.

CASTAÑEDA-GODOY, R.; LANIADO-LABORIN, R. Coexistência de tuberculosis y coccidioidomicoses. Presentación de dos casos clínicos. **Revista Del Instituto Nacional e Enfermedades Respiratorias (México)**. v. 15, n. 2, p. 98 - 101, Abril-Junho, 2002.

CASTAÑÓN-OLIVARES, L. R. et al. Coccidioidomycosis y su escaso conocimiento en nuestro país. **Revista de la Facultad de Medicina-UNAM**. v. 47, n. 4, p. 145 - 148, Júlio-Agosto, 2004.

CATALÁN, M.; MONTEJO, J. C. Antifúngicos sistêmicos. Farmacodinamia y farmacocinética. **Revista Iberoamericana de Micología**. v. 23, n. 39, p. 39 - 49, Octubre, 2006.

CATANZARO, A. et al. Ketoconazole for treatment of disseminated coccidioidomycosis. **Annals of Internal Medicine**. v. 96, n. 4, p. 436 – 440, April, 1982.

CATANZARO, A. Coccidioidomycosis. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**. v. 25, p. 123 - 128, January, 2004.

CATANZARO, A. et al. Safety, tolerance, and efficacy of posaconazole therapy in patients with nonmeningeal disseminated or chronic pulmonary coccidioidomycosis. **Clinical Infectious Diseases**. v. 45, n. 5, p. 562- 568, September, 2007.

CHAPMAN, S. W.; SULLIVAN, D. C.; CLEARLY, J. D. In search of the holy grail of antifungal therapy. **Transactions of the American Clinical Climatological Association**. v. 119, p. 197 - 215, January, 2008.

CHENG-YI et al. Disseminated coccidioidomycosis. **Emerging Infectious Diseases**. v. 11, n.1, p. 177-178, January, 2005.

CHILLER, T. M.; GALGANI, J. N.; STEVENS, D. A. Coccidioidomycosis. **Infectious Disease Clinics of North America**. v. 17, n. 1, p. 41 - 57, January, 2003.

CHIRCH, L.; ROCHE, P.; FUHRER, J. Successful treatment of invasive *Aspergillus* sinusitis with caspofungin and voriconazole. **Ear, Nose and Throat Journal**. v. 87, n. 1, p. 30 - 33. January, 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE –**Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica dos fungos filamentosos; Norma Aprovada-M38- A**, v. 18, n. 3, Segunda Edição, Pennsylvania, Estados Unidos, 2002.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE –**Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard**. Second Edition. M38- A2, v.22, n.16, Replaces M38-A. Pennsylvania, Estados Unidos, 2008.

COLOMBO, A. L.; ALVES, S. H. Testes de susceptibilidade a antifúngicos. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. (Eds). **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004. Cap. 10, p. 102 – 111.

CORDEIRO, R. A. et al. Phenotypic characterization and ecological features of *Coccidioides* spp. from Ceará-Northeast Brazil. **Medical Mycology**. v. 44, n. 7, p. 1 - 9, November, 2006a.

CORDEIRO, R. A. et al. *In vitro* activities of caspofungin, amphotericin B and azoles against *Coccidioides posadasii* strains from Northeast, Brazil. **Mycopathologia**. v. 161, n. 1, p. 21 - 26, January, 2006b.

CORDEIRO, R. A. et al. *In vitro* inhibitory effect of antituberculosis drugs on clinical and environmental strains of *Coccidioides posadasii*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 58, n. 3, p. 575 – 579, July, 2006c.

CORDEIRO, R. A. **Fenotipagem de cepas de *Coccidioides posadasii* e desenvolvimento de novas estratégias para o diagnóstico da coccidioidomicose - uma doença emergente no Nordeste brasileiro**. 2006d. 107f. Teses (Doutorado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará.

CORDEIRO, R. A. et al. Rapid diagnosis of coccidioidomycosis by nested PCR assay of sputum. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 13, n. 4, p. 449 - 451, January, 2007.

CORDEIRO, R. A. et al. Serologic detection of coccidioidomycosis antibodies in Northeast Brazil. **Mycopathologia**. v. 167, n. 4, p. 187- 190, April, 2009.

CORDEIRO, R. A. et al. Twelve years of coccidioidomycosis in Ceará State, Northeast Brazil: epidemiologic and diagnostic aspects. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 66, n. 1, p. 65 – 72, December, 2010.

CÓRDOBA, S. et al. *In vitro* interactions of antifungal agents against clinical isolates of *Fusarium* spp. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 31, n. 2, p. 171 – 174, February, 2008.

CORTEZ, K. J.; WALSH, T. J.; BENNETT, J. E. Successful treatment of coccidioidal meningitis with voriconazole. **Clinical Infectious Diseases**. v. 36, n. 12, p. 1619 - 1622, June, 2003.

COX, R. A.; MAGEE, D. M. Coccidioidomycosis: Host response and vaccine development. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 17, n. 4, p. 804 - 839, October, 2004.

CRUM, N. F.; POTTER, M.; PAPPAGIANIS, D. Seroincidence of coccidioidomycosis during military desert training exercises. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 42, n. 10, p. 4552 - 4555, October, 2004.

CRUM, N. F.; BALLON-LANDA, G. Coccidioidomycosis in pregnancy: case report and review of the literature. **The American Journal of Medicine**. v. 119, n. 11, p. 11-17, November, 2006.

CRUM-CIANFLONE, N. F. et al. Unusual presentations of coccidioidomycosis: a case series and review of the literature. **Medicine (Baltimore)**. v. 85, n. 5, p. 263–277, September, 2006.

*CUENCA-ESTRELLA, M. Combinations of antifungal agents in therapy—what value are they? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. n. 54, n. 5, p. 854 - 869, September, 2004.*

CUENCA-ESTRELLA, M. et al. *In vitro* activities of 10 combinations of antifungal agents against the multiresistant pathogen *Scopulariopsis brevicaulis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 50, n. 6, p. 2248 - 2250, June, 2006.

DA COSTA, F. A. M. et al. Coccidioidomicose pulmonar em caçador de tatus. **Journal de pneumologia**. v. 27, n. 5, p. 275 – 278, Setembro-Outubro, 2001.

DE DEUS, A. F. Coccidioidomicose. **Journal Brasileiro de Pneumologia**. v. 35, n. 9, p. 920 – 930, Marzo, 2009.

DEMCHOK, J. P.; MELETIADIS, J.; ROILIDES, E.; WALSH, T. J. Comparative pharmacodynamic interaction analysis of triple combinations of caspofungin and voriconazole or ravuconazole with subinhibitory concentrations of amphotericin B against *Aspergillus* spp. **Mycoses**. v. 53, n. 3, p. 39 – 245, March, 2010.

DERESINSKI, S. C. Coccidioidomycosis: efficacy of new agents and future prospects. **Current Opinion Infectious Disease**. v. 14, n. 6, p. 693- 696, December, 2001.

DICAUDO, D. J. Coccidioidomycosis: a review and update. **Journal of the American Academy of Dermatology**. v. 55, n. 6, p. 929 - 942, December, 2006.

DIOGENES, M. J. N. et al. Inquérito epidemiológico com esferulina em Jaguaribara – Ce, Brasil, 1993. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 70, n. 6, p. 525 - 529, Novembro-Dezembro, 1995.

DO VALLE, A. C. F. et al. Tratamento da paracoccidioidomicose. Estudo retrospectivo de 500 casos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 68, n. 1, p. 65 - 70, June 1993.

DURAND-JOLY, I. et al. Successful outcome of disseminated *Fusarium* infection with skin localization treated with voriconazole and amphotericin B-lipid complex in a patient with acute leukemia. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 41, n. 10, p. 4898 – 4900, October, 2003.

DURKIN, M. et al. Diagnosis of coccidioidomycosis with use of the *Coccidioides* antigen enzyme immunoassay. **Clinical Infectious Diseases**. v. 47, n. 8, p. 69 – 73, October, 2008.

DU TOIT, L. C.; PILLAY, V.; DANCKWERTS, M. P. Tuberculosis chemotherapy: current drug delivery approaches. **Respiratory Research**. v. 7, n. 7, p. 118, September, 2006.

EDWARDS, J. E. et al. Combined effect of amphotericin B and rifampin on *Candida* species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 17, n. 3, p. 484 – 487, March, 1980.

EL-AZIZI, M. Enhancement of the *in vitro* activity of amphotericin B against the biofilms of non-*albicans* *Candida* spp. by rifampicin and doxycycline. **Journal of Medical Microbiology**. v. 56, p. 645 - 649, December, 2007.

EULALIO, K. D. et al. *Coccidioides immitis* isolated from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in the state of Piauí, northeast Brazil. **Mycopathologia**. v. 149, n. 2, p. 57 - 61, 2001.

EULÁLIO, K. D. Coccidioidomicose: uma doença emergente no Brasil. In: II Encontro Brasileiro de Coccidioidomicose, Teresina, 2006. **XLII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Teresina, p. 72, 2006.

FECHINE, M. A. B. **Inquérito sorológico em regiões com condições geoclimáticas favoráveis e casos índices de coccidioidomicose no sertão do Ceará**. 2005. 110f. Dissertação (Mestrado em Medicina- Clínica Médica)- Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará.

FISHER, M. C. et al. Biogeographic range expansion into South America by *Coccidioides immitis* mirrors New World patterns of human migration. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 98, n. 8, p. 4558 - 4562, April, 2001.

FISHER, M. C. et al. Molecular and phenotypic description of *Coccidioides posadasii* sp. nov., previously recognized as the non-California population of *Coccidioides immitis*. **Mycologia**. v. 94, n. 1, p. 73 - 84, December, 2002a.

FISHER, M. C. et al. Disease surveillance in recombining pathogens: multilocus genotypes identify sources of human *Coccidioides* infections. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 99, n. 13, p. 9067 - 9071, June, 2002b.

FISHER, B. T. et al. Hospitalizations for coccidioidomycosis at forty-one children's hospitals in the United States. **Pediatric Infectious Diseases Journal**, v. 29, n. 3, p. 243- 247, March, 2010.

FRANCIS, P.; PATEL, V. B.; BILL, P. L.; BHIGJEE, A. I. Oral trimethoprim-sulfamethoxazole in the treatment of cerebral toxoplasmosis in AIDS patients-a prospective study. **South African Medical Journal**. v. 94, n. 1, p. 51- 53, January, 2004.

FUJITA, N. K.; EDWARDS, J. E. Combined *in vitro* effect of amphotericin B and rifampin on *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v. 19, p. 196 – 198, January, 1981.

GALGANI, J. N. Coccidioidomycosis. **The Western Journal of Medicine**. v. 159, n .1, p. 153 - 171, March, 1993.

GALGANI, J. N. Coccidioidomycosis: a regional disease of national importance. Rethinking approaches for control. **Annals of Internal Medicine**. v.130, (4 Pt 1), p. 293- 300, February, 1999.

GALGANI, J. N. et al. Practice guideline for the treatment of coccidioidomycosis. **Clinical Infectious Diseases**. v. 30, p. 658 - 661, June, 2000.

GALGANI, J. N. et al. Coccidioidomycosis. **Clinical Infectious Diseases**. v. 41, p. 1217 - 1223, July, 2005.

GOODMAN & GILMAN. **The pharmacological basis of therapeutics**, 11th ed. Bruton, Lazo and Parker editors; Mc Graw Hill Ed. USA, 2006.

GOMES, O. M. et al. Coccidioidomicose pulmonar: primeiro caso nacional. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v. 24, n. 5, p. 167 – 168, Maio, 1978.

GONZÁLEZ, G. M. et al. Correlation between antifungal susceptibilities of *Coccidioides immitis in vitro* and antifungal treatment with caspofungin in a mouse model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 45, n. 6, p. 1854 - 1859, June, 2001.

GONZÁLEZ, G. M. et al. *In vitro* e *in vivo* activities of posaconazole against *Coccidioides immitis*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v. 46, n. 5, p. 1352 – 1356, May, 2002.

GONZÁLEZ, G. M. et al. Therapeutic efficacy of caspofungin alone and in combination with amphotericin B deoxycholate for coccidioidomycosis in a mouse model. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 60, n. 12, p. 1341 - 1346, October, 2007.

GONZALEZ, G. M. *In vitro* activities of isavuconazole against opportunistic filamentous and dimorphic fungi. **Medical Mycology**. v. 47, n. 1, p. 71 - 76, February, 2009.

GUBLER, C. et al. Disseminated invasive aspergillosis with cerebral involvement successfully treated with caspofungin and voriconazole. **Infection**. v. 35, n. 5, p. 364- 366, October, 2007.

HAHN, R. C. et al. Disseminated paracoccidioidomycosis: correlation between clinical and *in vitro* resistance to ketoconazole and trimethoprim sulphamethoxazole. **Mycoses**. v. 46, p. 324 - 329, August, 2003.

HANAFY, A.; UNO, J.; MITANI, H.; KANG, Y.; MIKAMI, Y. *In vitro* antifungal activities of sulfa drugs against clinical isolates of *Aspergillus* and *Cryptococcus* species. **Japan Journal Medical Mycology**. v.48, p. 47- 50, October, 2007.

HECTOR, R. F., LANIADO-LABORIN, R. Coccidioidomycosis – a fungal disease of the Americas **PLS Medical**. v. 2, p. 15 - 18, 2005.

HIRSCHMANN, J. V. The early history of coccidioidomycosis: 1892-1945. **Clinical Infectious Diseases**. v. 44, p. 1202 - 1207, January, 2007.

HO, D.Y.; LEE, J. D.; ROSSO, F.; MONTROYA, J. G. Treating disseminated fusariosis: amphotericin B, voriconazole or both?. **Mycoses**. v.50, n. 3, p. 227 – 231, May, 2007.

HOMANS, J. D.; SPENCER, L. Itraconazole treatment of nonmeningeal coccidioidomycosis in children: two case reports and review of the literature. **Pediatric Infectious Diseases Journal**. v. 29, n. 1, p. 65 – 67, August, 2010.

HUGHES, C. E. et al. *In vitro* activities of amphotericin B in combination with four antifungal agents and rifampin against *Aspergillus*. spp. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 25, p. 560 – 562, January, 1984

HUPPERT, M. et al. Effect of amphotericin B and rifampin against *Coccidioides immitis* *in vitro* and *in vivo*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 9, n. 3, p. 406 – 413, March, 1976.

HSUE, G. et al. Treatment of meningeal coccidioidomycosis with caspofungin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 54, n. 1, p. 292 - 294, July, 2004.

JONHSON, M. D.; MACDOUGALL, C.; OSTROSKY-ZEICHNER, L. Combination antifungal therapy. **Antimicrobial Agents and Chemoterapy**. v. 48, n. 3, p. 693 - 715, March, 2004.

JOHNSON, R. H.; EINSTEIN, H. E. Coccidioidal meningitis. **Clinical Infectious Diseases**. v. 42, p. 103 - 107, January, 2006.

JOHNSON, J. E. et al. Laboratory acquired coccidioidomycosis. **Annals of Internal Medicine**. v. 60, p. 941 - 956, January, 2008.

KIRKLAND, T. N.; FIERER, J. Coccidioidomycosis: a reemerging infectious disease. **Emerging Infectious Diseases**. v. 2, n. 3, p. 192 - 199, July-September, 1996.

KOBBAYASHI, G. S. et al. Amphotericin B potentiation of rifampicin as an antifungal agent against the yeast phase of *Histoplasma capsulatum*. **Science**. v. 177, p. 709 – 710, January, 1972.

KRATZER, C. et al. *In vitro* activity and synergism of amphotericin B, azoles and cationic antimicrobials against the emerging pathogen *Trichoderma* spp. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 58, n. 5, p. 1058 - 1061, September, 2006.

KRIESEL, J. D. et al. Persistent pulmonary infection with an azole-resistant *Coccidioides* species. **Medical Mycology**. v. 46, n. 6, p. 607 – 610, September, 2008.

KUHL, I. A et al. Coccidioidomicose laríngea: relato de caso. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**. v. 62, n. 1, p. 48 -52, Janeiro-Fevereiro, 1996.

LACAZ, C. S. et al. Contribuição para o estudo da “Blastomicose-infecção”. Inquérito com a paraccoccidioidina. Estudo sorológico e clinico radiológico dos paraccoccidioidinos-positivos. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 1, n. 4, p. 245 - 259, Novembro-Dezembro, 1959.

LANIADO-LABORIN. R. Expanding Understanding of Epidemiology of Coccidioidomycosis in the Western Hemisphere. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v.1111, p. 19- 34, October, 2005.

LI, R. K. et al. *In vitro* activities of voriconazole, itraconazole, and amphotericin B against *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, and *Histoplasma capsulatum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 44, n. 6, p. 1734 – 1736, June, 2000.

MAGALHÃES, G.M.; OLIVEIRA, S. C.; SOARES, A. C.; MACHADO-PINTO, J.; DE RESENDE, M. A. Mycetoma caused by *Nocardia caviae* in the first Brazilian patient. **International Journal of Dermatology**. v. 49, n.1, p. 56- 58, January, 2010.

MANAVATHU, E. K.; ALANGADEN, G. J.; CHANDRASEKAR, P. H. Differential activity of triazoles in two-drug combinations with the echinocandin caspofungin against *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 51, n.6, p.1423 – 1425, April, 2005.

MARINÉ, M. et al. Combined antifungal therapy in a murine infection by *Candida glabrata*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, p. 1295 - 1298, January, 2006.

MARTINS, M. A. et al. Coccidioidomycosis in Brazil. A case report. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 39, n. 5, p. 299 - 304, Setembro/ Outubro, 1997.

MASTERS, P. A. et al. Trimethoprim-Sulfamethoxazole Revisited. **Archives of Internal Medicine**. v. 163, p. 402- 410, February, 2003.

MEHTA, H. et al. Voriconazole for the treatment of refractory *Aspergillus fumigatus* keratitis. **Indian Journal of Ophthalmology**. v. 56, n. 3, p. 243 -245, May- June, 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Coccidioidomicose. In: **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso, Ministério da Saúde, Secretaria de vigilância em saúde, Departamento de vigilância epidemiológica, Brasília, Brasil**. 7ª edição, p. 76–78, 2008.

MELETIADIS, J. et al. Concentration –Dependent synergy and antagonism within a triple antifungal drug combination against *Aspergillus* species: Analysis by a New Response Surface Model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 51, n. 6, p. 2053 - 2064, June, 2007.

MORAES, M. A. P. et al. Coccidioidomicose: novo caso brasileiro, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 31, n. 6, p. 559 - 562, Novembro/Dezembro, 1998.

MOROYOQUI, N. L. A.; FIGUEROA, S. S. R. Coccidioidomycosis. **Medicina Interna de Mexico**. v. 24, n. 2, p. 125 - 141, Marzo-Abril, 2008.

MUKHERJEE, P. K. et al. Combination Treatment of Invasive Fungal Infections. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 18, n. 1, p. 163 - 194, January, 2005.

MULDREW, K. M. et al. Intravenous voriconazole therapy in a preterm infant. **Pharmacotherapy**. v. 25, n. 6, p. 893 - 898, June, 2005.

MURTHY, M. H.; BLAIR, J. E. Coccidioidomycosis. **Current Fungal Infection Reports**. v. 3, p. 7 – 14, January, 2009.

NAKAI, T. *In vitro* antifungal activity of micafungin (FK 463) against dimorphic fungi: comparison of yeast-like and mycelial forms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 47, p. 1376 - 1381, January, 2003.

NAVARRO-MARTINEZ M. D.; CABEZAS-HERRERA, J.; RODRIGUEZ-LOPEZ, J. N. Antifolates as antimycotics? Connection between the folic acid cycle and the ergosterol biosynthesis pathway in *Candida albicans*. **The International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 28, p. 560 - 567, July, 2006a.

NAVARRO-MARTÍNEZ, M. D.; GARCÍA-CÁNOVAS, F.; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, J. N. Tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits ergosterol synthesis by disturbing folic acid metabolism in *Candida albicans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 57, p. 1083 - 1092, January, 2006b.

NEGRONI, R. Historical evolution of some clinical and epidemiological knowledge of coccidioidomycosis in the Americas. **Revista Argentina de Microbiología**. v. 40, n. 4, p. 246 - 256, October-December, 2008.

NOOR, O.; RAO, M.; RAO, B. K. An unusual case of coccidioidomycosis presenting with skin lesions. **The American Journal of Dermatopathology**. v. 30, n. 5, p. 481 - 483, October, 2008.

NOSANCHUK, JIEH-JUEN, Y.; CHIUNG-YU, H.; CASADEVALL A.; COLE, G. T. *Coccidioides posadasii* produces melanin *in vitro* and during infection. **Fungal Genetics and Biology**, v. 44, n.6.; p. 517- 520, June, 2007.

ODDS, F. C. Coccidioidomycosis: flying conidia and severed heads. **Mycologist**. v. 17, p. 37 - 40, February, 2003a.

- ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 52, n. 1 p. 1, June, 2003b.
- OLDFIELD, E. C.; BONE, W. D. Prediction of relapse after treatment of coccidioidomycosis. **Clinical Infectious Diseases**. v. 25, p. 1205- 1210, July, 1997.
- O'SHAUGHNESSY, E. M. et al. Antifungal interactions within the triple combination of amphotericin B, caspofungin and voriconazole against *Aspergillus* species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 58, p. 1168 - 1176, October, 2006.
- OZ, Y. et al. Short communication: *In vitro* activity of amphotericin B with fluconazole or voriconazole combinations against *Candida albicans* isolates. **Mikrobiyoloji Bulteni**. v. 42, n. 1, p. 149 - 155, January, 2008.
- PAIXÃO, G. C.; ROCHA, M. F. G.; SIDRIM, J. J. C. Coccidioidomicose e blastomicose. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. (Eds). **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. 2004. Cap. 23, p. 237 - 251.
- PANIAGO, A. M. M. et al. Paracoccidioidomicose: estudo clínico e epidemiológico de 422 casos observados no Estado de Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 36, p. 455 - 459, January, 2003.
- PAPPAGIANIS, D. Serologic studies in coccidioidomycosis. **Seminars in Respiratory Infections**. v. 16, n.4, p. 242-250, March, 2001.
- PARISH, J. M.; BLAIR, J. E. Coccidioidomycosis. **Mayo Foundation for Medical Education and Research**. v. 83, n. 3, p. 343 - 349, March, 2008.
- PARK, D. W. et al. Combination therapy of disseminated coccidioidomycosis with caspofungin and fluconazole. **BMC Infectious Diseases**. v. 6, n. 26, p. 1 - 6, February, 2006.
- PETKUS, A. F. et al. Pure spherules of *Coccidioides immitis* in continuous culture. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 22, n. 2, p. 165-167, August, 1985.

PEREZ - DIAZ, C. E. Use of antifungal combination therapy. **Drugs Today**. v. 46, Suppl C, p. 47 - 50, April, 2010.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of Invasive Mycoses in North America. **Critical Reviews in Microbiology**. v. 36, n.1, p. 1 - 53, February, 2010.

PHILIP, A. et al. In vitro Synergy Testing of anidulafungin with itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against *Aspergillus spp.* and *Fusarium spp.* **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 49, n. 8, p. 3572 - 3574, August, 2005.

PIGATTO, M. C.; UCHOA, F. T.; COSTA, T. D. Farmacocinética dos novos antifúngicos de uso sistêmico utilizados em pacientes imunocomprometidos. **Revista Brasileira de Farmácia**. v. 90, n. 1, p. 86 - 94, Março, 2009.

PRABHU, R. M. et al. Successful treatment of disseminated nonmeningeal coccidioidomycosis with voriconazole. **Clinical Infectious Disease**. v. 39, n. 7, p. 74 – 77, September, 2004.

PROIA, L. A.; TENORIO, A. R. Successful use of voriconazole for treatment of *Coccidioides* meningitis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 48, n. 6, p. 2341, June, 2004.

RAMANI, R.; CHATURVEDI, V. Antifungal susceptibility profiles of *Coccidioides immitis* and *Coccidioides posadasii* from endemic and non-endemic areas. **Mycopathology**. v. 163, p. 315 - 319, n. 6, June, 2007.

RESTREPO, A.; ARANGO, M. D. In vitro susceptibility testing of *Paracoccidioides brasiliensis* to sulfonamides. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 18, n.1, p. 190 - 194, July, 1980. 99

RESTREPO, A. *Coccidioides immitis* Rixford et Gilchrist 1895, y *Paracoccidioides brasiliensis* (splendore 1912) Almeida 1930: Dos hongos patógenos restringidos al continente

Americano. **Revista de la Academia Colombiana de Ciencias**. n. 116, p. 367 - 386, Septiembre, 2006.

RIFKIND, D.; CROWDER, E. D.; HYLAND, R. N. *In vitro* inhibition of *Coccidioides immitis* strains with amphotericin B plus rifampin. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v. 6, n. 6, p. 783–784, 1974.

RONALD J.; TALLARIDA. Drug Synergism: Its Detection and Applications. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 298, n. 3, p. 865 – 872, September, 2001.

RUIZ-CENDOYA, M.; MARINÉ M.; GUARRO, J. Combined therapy in treatment of murine infection by *Fusarium solani*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 62, n. 3, p. 543 - 546, Mayo, 2008.

SAUBOLLE, M. A.; MCKELLAR, P. P.; SUSSLAND, D. Epidemiologic, clinical, and diagnostic aspects of coccidioidomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 45, n. 1, p. 26-30, January, 2007.

SCAVONE, R.; BURGER, E. Paracoccidioidomycosis: reduction in fungal load and abrogation of delayed-type hypersensitivity energy in susceptible inbred mice submitted to therapy with trimethoprim-sulfamethoxazole. **Medical Microbiology and Immunology**. v. 193, n. 1, p. 53 -59, February, 2004.

SCHEVEN, M.; SCHWEGLER, F. Antagonistic interactions between azoles and amphotericin B with yeasts depend on azole lipophilia for special test conditions *in vitro*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v. 38, n.8, p. 371–373, August, 1995.

SCHREIBER, A. Z. Antifungigrama: Quando Solicitar e Como Interpretar. **Prática hospitalar**. Ano IX, n. 49, p. 87 - 91, Janeiro-Fevereiro, 2007.

SERENA, C. et al. *In vitro* interactions of micafungin with amphotericin B against clinical isolates of *Candida* spp. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 52, n. 4, p. 1529 – 1532, April, 2008.

SHEFF, K. W. et al. Development of a rapid, cost-effective TaqMan Real-Time PCR Assay for identification and differentiation of *Coccidioides immitis* and *Coccidioides posadasii* **Medical Mycology**, v. 48, n. 3, p. 466 - 469, May, 2010.

SHIKANAI-YASUDA, M. et al. e Grupo de consultores de consenso em paracoccidiodomicose. Consenso em paracoccidiodomicose- Guidelines in paracoccidiodomycosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 39, n. 3, p, 297 - 310, Maio - Junho, 2006.

SHUBITZ, L. F. et al. Efficacy of ambruticin analogs in a murine of coccidiodomycosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 50, n. 10, p. 3467 – 3469, October, 2006.

SIDRIM, J. J. C. et al. Le nord-est brésilien, région d'endémie de coccidiodomycose? A propos d'une micro-épidémie. **Journal of Medical Mycology**. v. 7, p. 37 - 39, 1997.

SIDRIM, J. J. C.; OLIVEIRA, F. G. M. Micoses profundas. In: SIDRIM, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B. (Eds). **Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1999. Cap. 14, p. 164 - 166.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Drogas Antifúngicas utilizadas na terapêutica contemporânea. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. (Eds). **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004a, Cap. 6, p. 50 - 62.

SILVA, L. C. L. et al. Coccidiodomicose pulmonar aguda. Primeiro surto epidêmico descrito no Ceará – Segundo no Brasil. **Jornal Brasileiro de Medicina Brasil**. v. 72, n. 5, p. 49 - 66, Março, 1997.

SILVA, T. M. J. et al. Coccidiodomicose pulmonar fatal no semi-árido cearense: relato de um caso e confirmação diagnóstica em animal. In: XXXV Congresso da Sociedade Brasileira de

Medicina Tropical, Guarapari. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. n. 32, supl I, p. 483, 1999.

SIONOV, E.; MENDLOVIC, S.; SEGAL, E. Efficacy of amphotericin B or amphotericin B-intralipid in combination with caspofungin against experimental aspergillosis. **The Journal of Infection**. v. 53, n. 2, p. 131 - 139, August, 2006.

SMITH, C. E. et al. Varieties of coccidioidal infection in relation to the epidemiology and control of the diseases. **American Journal of Public Health**. v. 36, n. 12, p. 1394 -1402 838, December, 1946.

STANLEY, W. et al. In search of the Holy Grail of Antifungal Therapy. **Transactions of the American Clinical Climatological Association**. v. 119, p. 197 - 215, January, 2008.

STEVES, D. A.; VO, P. T. Synergistic interaction of trimethoprim and sulphamethoxazole on *Paracoccidioides brasiliensis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 21, n. 5, p. 852 - 854, May, 1982.

STEVENS, D. A. Coccidioidomycosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 332, n. 16, p. 1077 - 1082, April, 1995.

STEVENS, D. A. et al. Posaconazole therapy for chronic refractory coccidioidomycosis. **Chest**. v. 132, n. 3, p. 952 - 958, June, 2007.

STONE, J. A. et al. *Potential for interactions between caspofungin and nelfinavir or rifampin.* **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 48, n. 11, p. 4306 - 4314, November, 2004.

SUGAR, A. M. Use of amphotericin B with azole antifungal drugs: what are we doing?. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 39, n. 9, p. 1907 – 1912, September, 1995.

SUTTON, D. A. Diagnosis of coccidioidomycosis by culture: safety considerations, traditional methods, and susceptibility testing. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 1111, n.1, p. 315 -3 25, September, 2007.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfecciosos**. 3ª Ed. São Paulo: Atheneu, 2007.

TINTELNOT, K. et al. Taxonomic and diagnostic markers for identification of *Coccidioides immitis* and *Coccidioides posadasii*. **Medical Mycology**. v. 45, n. 5, p. 385 - 392, August, 2007.

TOGASHI, R. H. et al. Pulmonary and extrapulmonary coccidioidomycosis: three cases in an endemic area in the state of Ceará, Brazil. **Journal Brasileiro de Pneumologia**. v. 35, n. 3, Marzo, 2009.

THOMAS, M.; RUPALI, P.; WOODHOUSE, A.; ELLIS-PEGLER, R. Good outcome with trimethoprim 10 mg/kg/day-sulfamethoxazole 50 mg/kg/day for *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in HIV infected patients. **Scandinavian Journal of Infectious Disease**. v. 41, n. (11-12), p. 862 – 868, May, 2009.

UMEYAMA, T. et al. Novel Approach to Designing Primers for Identification and Distinction of the Human Pathogenic Fungi *Coccidioides immitis* and *Coccidioides posadassi* by PCR Amplification. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 44, n. 5, p. 1859 - 1862, May, 2006.

VALDIVIA, L. et al. Coccidioidomycosis as a common cause of community-acquired pneumonia. **Emerging Infectious Diseases**. v. 12, p. 958 - 962, August, 2006.

VAZQUEZ, J. A. Clinical practice: combination antifungal therapy for mold infections: much ado about nothing? **Clinical Infectious Diseases**. v.46, n. 12, p. 1889 – 1901, June, 2008.

VERAS, K. N. Coccidioidomycosis: an unusual cause of acute respiratory distress syndrome. **Journal de Pneumologia**. v. 29, n. 1, p. 211 - 214, January/February, 2003.

VIANNA, H.; PASSOS, H. V.; SANTANA, A. V. Coccidioidomicose: relato do primeiro caso ocorrido em nativo do Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 21, n. 1, p. 51- 55, Janeiro- Fevereiro, 1979.

VISBAL, G. et al. *Paracoccidioides brasiliensis*, paracoccidioidomycosis, and antifungal antibiotics. **Current Drug Targets Infectious Disorders**. v. 5, p. 211 - 226, September, 2005.

WANKE, B. Coccidioidomicose. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 27, supl. 4, p. 375 - 378, 1994.

WANKE, B. et al. Investigation of an outbreak of endemic coccidioidomycosis in Brazil's northeastern state of Piauí with a review of the occurrence and distribution of *Coccidioides immitis* in three other Brazilian states. **Mycopathologia**. v. 148, p. 57 – 67, November, 1999.

WANKE, B. Coccidioidomicose. In: COURA, J. R. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2005. p. 1237 – 1245.

WHEAT, L. J. Nonculture diagnostic methods for invasive fungal infections. **Current Infectious Disease Reports**. v. 9, n. 6, p. 465 - 471, November, 2007.

WHITE, R. L. et al. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. v. 40, n. 8, p. 1914 - 1918, August, 1996.

WOLLINA, U. et al. Successful treatment of relapsing disseminated coccidioidomycosis with cutaneous involvement with posaconazole. **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**. v. 7, n. 1, p. 46 - 49, August, 2009.

WROBLEWSKA, M.M.; SWOBODA-KOPEC, E.; ROKOSA, A.; KRAWEZYK, E.; MARCHEL, H.; LUCZACK, M. Epidemiology of clinical isolates of *Candida albicans* and their susceptibility to Triazoles. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 20, p. 472 - 475, 2002.

YEKUTIEL, A. et al. *In vitro* activity of caspofungin combined with sulfamethoxazole against clinical isolates of *Aspergillus* spp. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 48, n. 9, p. 3279 – 3283, September, 2004.

YU, J. et al. *In vitro* interaction of terbinafine with itraconazole and amphotericin B against fungi causing chromoblastomycosis in China. **Medical Mycology**. v. 46, n. 7, p. 745 – 747, November, 2008.

YUSTES, C.; GUARRO, J. *In vitro* synergistic interaction between amphotericin B and micafungin against *Scedosporium* spp. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 49, n. 8, p. 3498 - 3500, August, 2005.

ZHANG, Y. et al. Mode of action of pyrazinamide: disruption of *Mycobacterium tuberculosis* membrane transport and energetics by pyrazinoic acid. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 52, p. 790 – 795, October, 2003.

ZHANG, Y. The magic bullets and tuberculosis drugs targets. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 45, p. 529- 564, February, 2005.

ANEXOS

ANEXO I
BANCO DE DADOS

Tabela 6. Concentração inibitória mínima (CIMs) de anfotericina B ($\mu\text{g/mL}$) e cetoconazol ($\mu\text{g/mL}$) isolada e em combinação, valores do índice da concentração inibitória fracionada (FICI) e efeito inibitório *in vitro* da combinação de ambos os antifúngicos frente a 18 cepas de *C. posadasii*. O FICI para todas as cepas fúngicas testadas foi interpretado como interação indiferente.

Nº de coleção	CIM isolado		CIM combinação		FIC		FICI
	AMB	KTC	AMB	KTC	AMB	KTC	
CEMM 01-6-085	0,125	0,156	0,058	0,11	0,464	0,705	1,169
CEMM 01-6-087	0,125	0,156	0,029	0,055	0,232	0,352	0,584
CEMM 01-6-088	0,125	0,156	0,058	0,11	0,464	0,705	1,169
CEMM 01-6-089	0,125	0,078	0,029	0,055	0,232	0,705	0,937
CEMM 01-6-090	0,125	0,039	0,014	0,027	0,112	0,692	0,804
CEMM 01-6-091	0,125	0,156	0,029	0,055	0,232	0,352	0,584
CEMM 01-6-092	0,125	0,078	0,029	0,055	0,232	0,705	0,937
CEMM 01-6-101	0,062	0,078	0,029	0,055	0,467	0,705	1,172
CEMM 01-6-102	0,125	0,156	0,029	0,055	0,232	0,352	0,584
CEMM 01-6-103	0,125	0,156	0,058	0,11	0,464	0,705	1,169
CEMM 05-2-063	0,125	0,078	0,029	0,055	0,232	0,705	0,937
CEMM 05-2-064	0,125	0,156	0,029	0,055	0,232	0,352	0,584
CEMM 05-2-065	0,125	0,078	0,029	0,055	0,232	0,705	0,937
CEMM 05-2-066	0,125	0,156	0,058	0,11	0,464	0,705	1,169
CEMM 05-2-067	0,125	0,078	0,029	0,055	0,232	0,705	0,937
CEMM 05-2-068	0,062	0,156	0,029	0,055	0,467	0,352	0,819
CEMM 05-2-069	0,125	0,078	0,029	0,11	0,232	1,41	1,642
CEMM 05-2-070	0,062	0,156	0,029	0,055	0,467	0,352	0,819

AMB - anfotericina B; **KTC** - cetoconazol

Tabela 7. Concentração inibitória mínima (CIMs) de anfotericina B ($\mu\text{g/mL}$) e itraconazol ($\mu\text{g/mL}$) isolada e em combinação, valores do índice da concentração inibitória fracionada (FICI) e efeito inibitório *in vitro* da combinação de ambos os antifúngicos frente a 18 cepas de *C. posadasii*.

Nº de coleção	CIM isolado		CIM combinação		FIC		FICI	Resultado
	AMB	ITC	AMB	ITC	AMB	ITC		
CEMM 01-6-085	0,125	0,125	0,058	0,076	0,464	0,608	1,072	Indiferente
CEMM 01-6-087	0,125	0,125	0,058	0,076	0,464	0,608	1,072	Indiferente
CEMM 01-6-088	0,125	0,125	0,029	0,038	0,232	0,304	0,536	Indiferente
CEMM 01-6-089	0,125	0,125	0,029	0,038	0,232	0,304	0,536	Indiferente
CEMM 01-6-090	0,125	0,25	0,058	0,076	0,464	0,304	0,768	Indiferente
CEMM 01-6-091	0,125	0,125	0,058	0,076	0,464	0,608	1,072	Indiferente
CEMM 01-6-092	0,125	0,125	0,058	0,076	0,464	0,608	1,072	Indiferente
CEMM 01-6-101	0,062	0,125	0,058	0,076	0,935	0,608	1,543	Indiferente
CEMM 01-6-102	0,125	0,125	0,029	0,038	0,232	0,304	0,536	Indiferente
CEMM 01-6-103	0,125	0,5	0,029	0,038	0,232	0,076	0,308	Sinergismo
CEMM 05-2-063	0,125	0,125	0,029	0,038	0,232	0,304	0,536	Indiferente
CEMM 05-2-064	0,125	0,5	0,029	0,038	0,232	0,076	0,308	Sinergismo
CEMM 05-2-065	0,125	0,25	0,058	0,076	0,464	0,304	0,768	Indiferente
CEMM 05-2-066	0,125	0,125	0,058	0,076	0,464	0,608	1,072	Indiferente
CEMM 05-2-067	0,125	0,125	0,029	0,038	0,232	0,304	0,536	Indiferente
CEMM 05-2-068	0,062	0,125	0,029	0,038	0,467	0,304	0,771	Indiferente
CEMM 05-2-069	0,125	0,125	0,029	0,038	0,232	0,304	0,536	Indiferente
CEMM 05-2-070	0,062	0,25	0,058	0,076	0,935	0,304	1,239	Indiferente

AMB - anfotericina B; **ITC** - itraconazol

Tabela 8. Concentração inibitória mínima (CIMs) de anfotericina B ($\mu\text{g/mL}$) e fluconazol ($\mu\text{g/mL}$) isolada e em combinação, valores do índice da concentração inibitória fracionada (FICI) e efeito inibitório *in vitro* da combinação de ambos os antifúngicos frente a 18 cepas de *C. posadasii*. O FICI para todas as cepas fúngicas testadas foi interpretado como interação indiferente.

Nº de coleção	CIM isolado		CIM combinação		FIC		FICI
	AMB	FLC	AMB	FLC	AMB	FLC	
CEMM 01-6-085	0,125	3,125	0,058	3,125	0,464	1	1,464
CEMM 01-6-087	0,125	3,125	0,058	3,125	0,464	1	1,464
CEMM 01-6-088	0,125	3,125	0,058	3,125	0,464	1	1,464
CEMM 01-6-089	0,125	3,125	0,058	3,125	0,464	1	1,464
CEMM 01-6-090	0,125	6,25	0,058	3,125	0,464	0,5	0,964
CEMM 01-6-091	0,125	3,125	0,058	3,125	0,464	1	1,464
CEMM 01-6-092	0,125	6,25	0,058	3,125	0,464	0,5	0,964
CEMM 01-6-101	0,062	6,25	0,058	3,125	0,935	0,5	1,435
CEMM 01-6-102	0,125	6,25	0,058	3,125	0,464	0,5	0,964
CEMM 01-6-103	0,125	6,25	0,058	3,125	0,464	0,5	0,964
CEMM 05-2-063	0,125	6,25	0,058	3,125	0,464	0,5	0,964
CEMM 05-2-064	0,125	6,25	0,058	3,125	0,464	0,5	0,964
CEMM 05-2-065	0,125	6,25	0,058	3,125	0,464	0,5	0,964
CEMM 05-2-066	0,125	6,25	0,058	3,125	0,464	0,5	0,964
CEMM 05-2-067	0,125	6,25	0,058	3,125	0,464	0,5	0,964
CEMM 05-2-068	0,062	6,25	0,029	1,562	0,467	0,249	0,716
CEMM 05-2-069	0,125	6,25	0,058	3,125	0,464	0,5	0,964
CEMM 05-2-070	0,062	6,25	0,058	3,125	0,935	0,5	1,435

AMB - anfotericina B; **FLC** - fluconazol

Tabela 9. Concentração inibitória mínima (CIMs) de anfotericina B ($\mu\text{g/mL}$) e voriconazol ($\mu\text{g/mL}$) isolada e em combinação, valores do índice da concentração inibitória fracionada e efeito inibitório *in vitro* da combinação de ambos os antifúngicos frente a 18 cepas de *C. posadasii*. O FICI para todas as cepas fúngicas testadas foi interpretado como interação sinergismo.

Nº de coleção	CIM isolado		CIM combinação		FIC		FICI
	AMB	VRZ	AMB	VRZ	AMB	VRZ	
CEMM 01-6-085	0,125	0,125	0,006	0,007	0,048	0,056	0,104
CEMM 01-6-087	0,125	0,125	0,006	0,007	0,048	0,056	0,104
CEMM 01-6-088	0,125	0,125	0,006	0,007	0,048	0,056	0,104
CEMM 01-6-089	0,125	0,125	0,006	0,007	0,048	0,056	0,104
CEMM 01-6-090	0,125	0,125	0,006	0,007	0,048	0,056	0,104
CEMM 01-6-091	0,125	0,125	0,006	0,007	0,048	0,056	0,104
CEMM 01-6-092	0,125	0,125	0,006	0,007	0,048	0,056	0,104
CEMM 01-6-101	0,062	0,125	0,006	0,007	0,096	0,056	0,152
CEMM 01-6-102	0,125	0,125	0,006	0,007	0,048	0,056	0,104
CEMM 01-6-103	0,125	0,125	0,006	0,007	0,048	0,056	0,104
CEMM 05-2-063	0,125	0,125	0,006	0,007	0,048	0,056	0,104
CEMM 05-2-064	0,125	0,125	0,006	0,007	0,048	0,056	0,104
CEMM 05-2-065	0,125	0,25	0,006	0,007	0,048	0,028	0,076
CEMM 05-2-066	0,125	0,125	0,006	0,007	0,048	0,056	0,104
CEMM 05-2-067	0,125	0,125	0,006	0,007	0,048	0,056	0,104
CEMM 05-2-068	0,062	0,125	0,006	0,007	0,096	0,056	0,152
CEMM 05-2-069	0,125	0,25	0,006	0,007	0,048	0,028	0,076
CEMM 05-2-070	0,062	0,25	0,006	0,007	0,096	0,028	0,124

AMB - anfotericina B; **VRZ** - voriconazol

Tabela 10. Concentração inibitória mínima (CIMs) de voriconazol ($\mu\text{g/mL}$) e cetoconazol ($\mu\text{g/mL}$) isolada e em combinação, valores do índice da concentração inibitória fracionada (FICI) e efeito inibitório *in vitro* da combinação de ambos os antifúngicos frente a 18 cepas de *C. posadasii*.

Nº de coleção	CIM isolado		CIM combinação		FIC		FICI	Resultado
	VRZ	KTC	VRZ	KTC	VRZ	KTC		
CEMM 01-6-085	0,125	0,156	0,062	0,11	0,496	0,705	1,201	Indiferente
EMM 01-6-087	0,125	0,156	0,062	0,11	0,496	0,705	1,201	Indiferente
CEMM 01-6-088	0,125	0,156	0,062	0,11	0,496	0,705	1,201	Indiferente
CEMM 01-6-089	0,125	0,078	0,031	0,055	0,248	0,705	0,953	Indiferente
CEMM 01-6-090	0,125	0,039	0,015	0,027	0,12	0,692	0,812	Indiferente
CEMM 01-6-091	0,125	0,156	0,031	0,055	0,248	0,352	0,6	Indiferente
CEMM 01-6-092	0,125	0,078	0,031	0,055	0,248	0,705	0,953	Indiferente
CEMM 01-6-101	0,125	0,078	0,062	0,11	0,496	1,41	1,906	Indiferente
CEMM 01-6-102	0,125	0,156	0,062	0,11	0,496	0,705	1,201	Indiferente
CEMM 01-6-103	0,125	0,156	0,062	0,11	0,496	0,705	1,201	Indiferente
CEMM 05-2-063	0,125	0,078	0,031	0,055	0,248	0,705	0,953	Indiferente
CEMM 05-2-064	0,125	0,156	0,031	0,055	0,248	0,352	0,6	Indiferente
CEMM 05-2-065	0,25	0,078	0,031	0,055	0,124	0,705	0,829	Indiferente
CEMM 05-2-066	0,125	0,156	0,031	0,055	0,248	0,352	0,6	Indiferente
CEMM 05-2-067	0,125	0,078	0,031	0,055	0,248	0,705	0,953	Indiferente
CEMM 05-2-068	0,125	0,156	0,031	0,055	0,248	0,352	0,6	Indiferente
CEMM 05-2-069	0,25	0,078	0,031	0,055	0,124	0,705	0,829	Indiferente
CEMM 05-2-070	0,25	0,156	0,031	0,055	0,124	0,352	0,476	Sinergismo

VRZ - voriconazol; **KTC** - cetoconazol

Tabela 11. Concentração inibitória mínima (CIMs) de voriconazol ($\mu\text{g/mL}$) e itraconazol ($\mu\text{g/mL}$) isolada e em combinação, valores do índice da concentração inibitória fracionada (FICI) e efeito inibitório *in vitro* da combinação de ambos os antifúngicos frente a 18 cepas de *C. posadasii*. O FICI para todas as cepas fúngicas testadas foi interpretado como interação indiferente.

Nº de coleção	CIM isolado		CIM combinação		FIC		FICI
	VRZ	ITC	VRZ	ITC	VRZ	ITC	
CEMM 01-6-085	0,125	0,125	0,062	0,076	0,496	0,608	1,104
CEMM 01-6-087	0,125	0,125	0,062	0,076	0,496	0,608	1,104
CEMM 01-6-088	0,125	0,125	0,062	0,076	0,496	0,608	1,104
CEMM 01-6-089	0,125	0,125	0,031	0,038	0,248	0,304	0,552
CEMM 01-6-090	0,125	0,25	0,062	0,076	0,496	0,304	0,8
CEMM 01-6-091	0,125	0,125	0,062	0,076	0,496	0,608	1,104
CEMM 01-6-092	0,125	0,125	0,062	0,076	0,496	0,608	1,104
CEMM 01-6-101	0,125	0,125	0,031	0,038	0,248	0,304	0,552
CEMM 01-6-102	0,125	0,125	0,062	0,076	0,496	0,608	1,104
CEMM 01-6-103	0,125	0,5	0,062	0,076	0,496	0,152	0,648
CEMM 05-2-063	0,125	0,125	0,062	0,076	0,496	0,608	1,104
CEMM 05-2-064	0,125	0,5	0,062	0,076	0,496	0,152	0,648
CEMM 05-2-065	0,25	0,25	0,062	0,076	0,248	0,304	0,552
CEMM 05-2-066	0,125	0,125	0,062	0,076	0,496	0,608	1,104
CEMM 05-2-067	0,125	0,125	0,062	0,076	0,496	0,608	1,104
CEMM 05-2-068	0,125	0,125	0,062	0,076	0,496	0,608	1,104
CEMM 05-2-069	0,25	0,125	0,062	0,076	0,248	0,608	0,856
CEMM 05-2-070	0,25	0,25	0,062	0,076	0,248	0,304	0,552

VRZ - voriconazol; **ITC** - itraconazol

Tabela 12. Concentração inibitória mínima (CIMs) de voriconazol ($\mu\text{g/mL}$) e fluconazol ($\mu\text{g/mL}$) isolada e em combinação, valores do índice da concentração inibitória fracionada (FICI) e efeito inibitório *in vitro* da combinação de ambos os antifúngicos frente a 18 cepas de *C. posadasii*. O FICI para todas as cepas fúngicas testadas foi interpretado como interação indiferente.

Nº de coleção	CIM isolado		CIM combinação		FIC		FICI
	VRZ	FLC	VRZ	FLC	VRZ	FLC	
CEMM 01-6-085	0,125	3,125	0,062	3,125	0,496	1	1,496
CEMM 01-6-087	0,125	3,125	0,062	3,125	0,496	1	1,496
CEMM 01-6-088	0,125	3,125	0,062	3,125	0,496	1	1,496
CEMM 01-6-089	0,125	3,125	0,062	3,125	0,496	1	1,496
CEMM 01-6-090	0,125	6,25	0,062	3,125	0,496	0,5	0,996
CEMM 01-6-091	0,125	3,125	0,062	3,125	0,496	1	1,496
CEMM 01-6-092	0,125	6,25	0,062	3,125	0,496	0,5	0,996
CEMM 01-6-101	0,125	6,25	0,062	3,125	0,496	0,5	0,996
CEMM 01-6-102	0,125	6,25	0,062	3,125	0,496	0,5	0,996
CEMM 01-6-103	0,125	6,25	0,062	3,125	0,496	0,5	0,996
CEMM 05-2-063	0,125	6,25	0,062	3,125	0,496	0,5	0,996
CEMM 05-2-064	0,125	6,25	0,062	3,125	0,496	0,5	0,996
CEMM 05-2-065	0,25	6,25	0,062	3,125	0,248	0,5	0,748
CEMM 05-2-066	0,125	6,25	0,125	6,25	1	1	2
CEMM 05-2-067	0,125	6,25	0,062	3,125	0,496	0,5	0,996
CEMM 05-2-068	0,125	6,25	0,062	3,125	0,496	0,5	0,996
CEMM 05-2-069	0,25	6,25	0,125	6,25	0,5	1	1,5
CEMM 05-2-070	0,25	6,25	0,062	3,125	0,248	0,5	0,748

VRZ - voriconazol; **FLC** - fluconazol

Tabela 13. Concentração inibitória mínima (CIMs) de voriconazol ($\mu\text{g/mL}$) com caspofungina ($\mu\text{g/mL}$) isolada e em combinação, valores do índice da concentração inibitória fracionada (FICI) e efeito inibitório *in vitro* da combinação de ambos antifúngicos frente a 18 cepas de *C. posadasii*.

Nº de coleção	CIM isolado		CIM combinação		FIC		FICI	Resultado
	VRZ	CAS	VRZ	CAS	VRZ	CAS		
CEMM 01-6-085	0,125	32	0,062	16	0,496	0,5	0,996	Indiferente
CEMM 01-6-087	0,125	16	0,062	16	0,496	1	1,496	Indiferente
CEMM 01-6-088	0,125	16	0,031	8	0,248	0,5	0,748	Indiferente
CEMM 01-6-089	0,125	32	0,062	16	0,496	0,5	0,996	Indiferente
CEMM 01-6-090	0,125	32	0,062	16	0,496	0,5	0,996	Indiferente
CEMM 01-6-091	0,125	16	0,031	8	0,248	0,5	0,748	Indiferente
CEMM 01-6-092	0,125	16	0,062	16	0,496	1	1,496	Indiferente
CEMM 01-6-101	0,125	32	0,062	16	0,496	0,5	0,996	Indiferente
CEMM 01-6-102	0,125	16	0,062	16	0,496	1	1,496	Indiferente
CEMM 01-6-103	0,125	32	0,062	16	0,496	0,5	0,996	Indiferente
CEMM 05-2-063	0,125	32	0,062	16	0,496	0,5	0,996	Indiferente
CEMM 05-2-064	0,125	32	0,031	8	0,248	0,25	0,498	Sinergismo
CEMM 05-2-065	0,25	32	0,062	16	0,248	0,5	0,748	Indiferente
CEMM 05-2-066	0,125	32	0,062	16	0,496	0,5	0,996	Indiferente
CEMM 05-2-067	0,125	32	0,062	16	0,496	0,5	0,996	Indiferente
CEMM 05-2-068	0,125	32	0,062	16	0,496	0,5	0,996	Indiferente
CEMM 05-2-069	0,25	32	0,062	16	0,248	0,5	0,748	Indiferente
CEMM 05-2-070	0,25	32	0,062	16	0,248	0,5	0,748	Indiferente

VRZ - voriconazol; **CAS** - caspofungina

Tabela 14. Concentração inibitória mínima (CIMs) de anfotericina B ($\mu\text{g/mL}$) e rifampicina (mg/mL) isolada e em combinação, valores do índice da concentração inibitória fracionada (FICI) e efeito inibitório *in vitro* da combinação de ambos os antimicrobianos frente a 15 cepas de *C. posadasii*. O FICI para todas as cepas fúngicas testadas foi interpretado como interação sinérgica.

Nº de coleção	CIM isolado		CIM combinação		FIC		FICI
	AMB	RIF	AMB	RIF	AMB	RIF	
CEMM 01-6-085	0,125	2,12	0,007	0,14	0,056	0,066	0,122
CEMM 01-6-087	0,125	2,12	0,007	0,14	0,056	0,066	0,122
CEMM 01-6-088	0,125	4,25	0,007	0,14	0,056	0,032	0,088
CEMM 01-6-089	0,125	4,25	0,014	0,283	0,112	0,066	0,178
CEMM 01-6-090	0,125	2,12	0,014	0,283	0,112	0,133	0,245
CEMM 01-6-091	0,125	4,25	0,014	0,283	0,112	0,066	0,178
CEMM 01-6-092	0,125	1,06	0,007	0,14	0,056	0,132	0,188
CEMM 01-6-101	0,116	2,12	0,014	0,283	0,120	0,133	0,253
CEMM 01-6-102	0,125	2,12	0,029	0,56	0,232	0,264	0,496
CEMM 01-6-103	0,125	1,06	0,014	0,283	0,112	0,266	0,378
CEMM 05-2-063	0,116	2,273	0,007	0,14	0,060	0,061	0,121
CEMM 05-2-064	0,116	2,273	0,007	0,14	0,060	0,061	0,121
CEMM 05-2-065	0,116	2,273	0,007	0,14	0,060	0,061	0,121
CEMM 05-2-066	0,116	2,273	0,007	0,14	0,060	0,061	0,121
CEMM 05-2-069	0,116	2,273	0,014	0,283	0,120	0,124	0,244

AMB – anfotericina B; **RIF** - rifampicina

Tabela 15. Concentração inibitória mínima (CIMs) de anfotericina B ($\mu\text{g/mL}$) e isoniazida (mg/mL) isolada e em combinação, valores do índice da concentração inibitória fracionada (FICI) e efeito inibitório *in vitro* da combinação de ambos os antimicrobianos frente a 15 cepas de *C. posadasii*. O FICI para todas as cepas fúngicas testadas foi interpretado como interação sinérgica.

Nº de coleção	CIM isolado		CIM combinação		FIC		FICI
	AMB	INH	AMB	INH	AMB	INH	
CEMM 01-6-085	0,125	<0,25	0,029	0,062	0,232	0,248	0,48
CEMM 01-6-087	0,125	<0,25	0,029	0,062	0,232	0,248	0,48
CEMM 01-6-088	0,125	<0,25	0,029	0,062	0,232	0,248	0,48
CEMM 01-6-089	0,125	<0,25	0,029	0,062	0,232	0,248	0,48
CEMM 01-6-090	0,125	<0,25	0,029	0,062	0,232	0,248	0,48
CEMM 01-6-091	0,125	<0,25	0,029	0,062	0,232	0,248	0,48
CEMM 01-6-092	0,125	<0,25	0,029	0,062	0,232	0,248	0,48
CEMM 01-6-101	0,116	<0,25	0,029	0,062	0,25	0,248	0,498
CEMM 01-6-102	0,125	<0,25	0,029	0,062	0,232	0,248	0,48
CEMM 01-6-103	0,125	<0,25	0,029	0,062	0,232	0,248	0,48
CEMM 05-2-063	0,116	<0,25	0,029	0,062	0,25	0,248	0,498
CEMM 05-2-064	0,116	<0,25	0,029	0,062	0,25	0,248	0,498
CEMM 05-2-065	0,116	<0,25	0,029	0,062	0,25	0,248	0,498
CEMM 05-2-066	0,116	<0,25	0,029	0,062	0,25	0,248	0,498
CEMM 05-2-069	0,116	<0,25	0,029	0,062	0,25	0,248	0,498

AMB – anfotericina B; **INH** - isoniazida

Tabela 16. Concentração inibitória mínima (CIMs) de anfotericina B ($\mu\text{g/mL}$) e pirazinamida (mg/mL) isolada e em combinação, valores do índice da concentração inibitória fracionada (FICI) e efeito inibitório *in vitro* da combinação de ambos os antimicrobianos frente a 15 cepas de *C. posadasii*.

Nº de coleção	CIM isolado		CIM combinação		FIC		FICI	Resultado
	AMB	PZA	AMB	PZA	AMB	PZA		
CEMM 01-6-085	0,125	>25	0,029	6,25	0,232	0,25	0,482	Sinergismo
CEMM 01-6-087	0,125	>25	0,029	6,25	0,232	0,25	0,482	Sinergismo
CEMM 01-6-088	0,125	>25	0,058	12,5	0,464	0,5	0,964	Indiferente
CEMM 01-6-089	0,125	>25	0,029	6,25	0,232	0,25	0,482	Sinergismo
CEMM 01-6-090	0,125	>25	0,029	6,25	0,232	0,25	0,482	Sinergismo
CEMM 01-6-091	0,125	>25	0,029	6,25	0,232	0,25	0,482	Sinergismo
CEMM 01-6-092	0,125	>25	0,029	6,25	0,232	0,25	0,482	Sinergismo
CEMM 01-6-101	0,116	>25	0,029	6,25	0,25	0,25	0,5	Sinergismo
CEMM 01-6-102	0,125	>25	0,029	6,25	0,232	0,25	0,482	Sinergismo
CEMM 01-6-103	0,125	>25	0,029	6,25	0,232	0,25	0,482	Sinergismo
CEMM 05-2-063	0,116	>25	0,029	6,25	0,25	0,25	0,5	Sinergismo
CEMM 05-2-064	0,116	>25	0,029	6,25	0,25	0,25	0,5	Sinergismo
CEMM 05-2-065	0,116	>25	0,029	6,25	0,25	0,25	0,5	Sinergismo
CEMM 05-2-066	0,116	>25	0,029	6,25	0,25	0,25	0,5	Sinergismo
CEMM 05-2-069	0,116	>25	0,029	6,25	0,25	0,25	0,5	Sinergismo

AMB – anfotericina B; **PZA** - pirazinamida

Tabela 17. Concentração inibitória mínima (CIMs) de anfotericina B ($\mu\text{g/mL}$) e etambutol (mg/mL) isolada e em combinação, valores do índice da concentração inibitória fracionada (FICI) e efeito inibitório *in vitro* da combinação de ambos os antimicrobianos frente a 15 cepas de *C. posadasii*. O FICI para todas as cepas fúngicas testadas foi interpretada como interação sinérgica.

Nº de coleção	CIM isolado		CIM combinação		FIC		FICI
	AMB	ETB	AMB	ETB	AMB	ETB	
CEMM 01-6-085	0,125	<0,62	0,029	0,155	0,232	0,25	0,482
CEMM 01-6-087	0,125	<0,62	0,029	0,155	0,232	0,25	0,482
CEMM 01-6-088	0,125	<0,62	0,029	0,155	0,232	0,25	0,482
CEMM 01-6-089	0,125	<0,62	0,029	0,155	0,232	0,25	0,482
CEMM 01-6-090	0,125	<0,62	0,029	0,155	0,232	0,25	0,482
CEMM 01-6-091	0,125	<0,62	0,029	0,155	0,232	0,25	0,482
CEMM 01-6-092	0,125	<0,62	0,029	0,155	0,232	0,25	0,482
CEMM 01-6-101	0,116	<0,62	0,029	0,155	0,25	0,25	0,5
CEMM 01-6-102	0,125	<0,62	0,029	0,155	0,232	0,25	0,482
CEMM 01-6-103	0,125	<0,62	0,029	0,155	0,232	0,25	0,482
CEMM 05-2-063	0,116	<0,62	0,014	0,077	0,120	0,124	0,244
CEMM 05-2-064	0,116	<0,62	0,029	0,155	0,25	0,25	0,5
CEMM 05-2-065	0,116	<0,62	0,029	0,155	0,25	0,25	0,5
CEMM 05-2-066	0,116	<0,62	0,029	0,155	0,25	0,25	0,5
CEMM 05-2-069	0,116	<0,62	0,029	0,155	0,25	0,25	0,5

AMB – anfotericina B; **ETB** - etambutol

Tabela 18. Concentração inibitória mínima (CIMs) de cetoconazol ($\mu\text{g/mL}$) e rifampicina (mg/mL) isolada e em combinação, valores do índice da concentração inibitória fracionada (FICI) e efeito inibitório *in vitro* da combinação de ambos os antimicrobianos frente a 15 cepas de *C. posadasii*.

Nº de coleção	CIM isolado		CIM combinação		FIC		FICI	Resultado
	KTC	RIF	KTC	RIF	KTC	RIF		
CEMM 01-6-085	0,156	2,12	0,027	0,283	0,173	0,133	0,306	Sinergismo
CEMM 01-6-087	0,156	2,12	0,027	0,283	0,173	0,133	0,306	Sinergismo
CEMM 01-6-088	0,156	4,25	0,027	0,283	0,173	0,066	0,239	Sinergismo
CEMM 01-6-089	0,078	4,25	0,027	0,283	0,346	0,066	0,412	Sinergismo
CEMM 01-6-090	0,039	2,12	0,027	0,283	0,692	0,133	0,825	Indiferente
CEMM 01-6-091	0,156	4,25	0,027	0,283	0,173	0,066	0,239	Sinergismo
CEMM 01-6-092	0,078	1,06	0,013	0,141	0,166	0,133	0,299	Sinergismo
CEMM 01-6-101	0,078	2,12	0,027	0,283	0,346	0,133	0,479	Sinergismo
CEMM 01-6-102	0,156	2,12	0,013	0,141	0,083	0,066	0,149	Sinergismo
CEMM 01-6-103	0,156	1,06	0,055	0,567	0,352	0,534	0,886	Indiferente
CEMM 05-2-063	0,22	2,273	0,027	0,283	0,122	0,124	0,246	Sinergismo
CEMM 05-2-064	0,22	2,273	0,055	0,567	0,25	0,249	0,499	Sinergismo
CEMM 05-2-065	0,22	2,273	0,055	0,567	0,25	0,249	0,499	Sinergismo
CEMM 05-2-066	0,22	2,273	0,027	0,283	0,125	0,124	0,249	Sinergismo
CEMM 05-2-069	0,22	2,273	0,055	0,567	0,25	0,249	0,499	Sinergismo

KTC - cetoconazol; **RIF** - rifampicina

Tabela 19. Concentração inibitória mínima (CIMs) de cetoconazol ($\mu\text{g/mL}$) e isoniazida (mg/mL) isolada e em combinação, valores do índice da concentração inibitória fracionada (FICI) e efeito inibitório *in vitro* da combinação de ambos os antimicrobianos frente a 15 cepas de *C. posadasii*.

Nº de coleção	CIM isolado		CIM combinação		FIC		FICI	Resultado
	KTC	INH	KTC	INH	KTC	INH		
CEMM 01-6-085	0,156	<0,25	0,11	0,125	0,705	0,5	1,205	Indiferente
CEMM 01-6-087	0,156	<0,25	0,027	0,031	0,173	0,124	0,297	Sinergismo
CEMM 01-6-088	0,156	<0,25	0,055	0,062	0,352	0,248	0,6	Indiferente
CEMM 01-6-089	0,078	<0,25	0,055	0,062	0,705	0,248	0,953	Indiferente
CEMM 01-6-090	0,039	<0,25	0,055	0,062	1,41	0,248	1,658	Indiferente
CEMM 01-6-091	0,156	<0,25	0,055	0,062	0,352	0,248	0,6	Indiferente
CEMM 01-6-092	0,078	<0,25	0,027	0,031	0,346	0,124	0,47	Sinergismo
CEMM 01-6-101	0,078	<0,25	0,055	0,062	0,705	0,248	0,953	Indiferente
CEMM 01-6-102	0,156	<0,25	0,11	0,125	0,705	0,5	1,205	Indiferente
CEMM 01-6-103	0,156	<0,25	0,055	0,062	0,352	0,248	0,6	Indiferente
CEMM 05-2-063	0,22	<0,25	0,11	0,125	0,5	0,5	1	Indiferente
CEMM 05-2-064	0,22	<0,25	0,11	0,125	0,5	0,5	1	Indiferente
CEMM 05-2-065	0,22	<0,25	0,11	0,125	0,5	0,5	1	Indiferente
CEMM 05-2-066	0,22	<0,25	0,055	0,062	0,25	0,248	0,498	Sinergismo
CEMM 05-2-069	0,22	<0,25	0,11	0,125	0,5	0,5	1	Indiferente

KTC - cetoconazol; **INH** - isoniazida

Tabela 20. Concentração inibitória mínima (CIMs) de cetoconazol ($\mu\text{g/mL}$) e pirazinamida (mg/mL) isolada e em combinação, valores do índice da concentração inibitória fracionada (FICI) e efeito inibitório *in vitro* da combinação de ambos os antimicrobianos frente a 15 cepas de *C. posadasii*.

Nº de coleção	CIM isolado		CIM combinação		FIC		FICI	Resultado
	KTC	PZA	KTC	PZA	KTC	PZA		
CEMM 01-6-085	0,156	>25	0,055	6,25	0,325	0,25	0,575	Indiferente
CEMM 01-6-087	0,156	>25	0,055	6,25	0,325	0,25	0,575	Indiferente
CEMM 01-6-088	0,156	>25	0,055	6,25	0,325	0,25	0,575	Indiferente
CEMM 01-6-089	0,078	>25	0,055	6,25	0,325	0,25	0,575	Indiferente
CEMM 01-6-090	0,039	>25	0,055	6,25	0,325	0,25	0,575	Indiferente
CEMM 01-6-091	0,156	>25	0,055	6,25	0,325	0,25	0,575	Indiferente
CEMM 01-6-092	0,078	>25	0,055	6,25	0,325	0,25	0,575	Indiferente
CEMM 01-6-101	0,078	>25	0,055	6,25	0,325	0,25	0,575	Indiferente
CEMM 01-6-102	0,156	>25	0,055	6,25	0,325	0,25	0,575	Indiferente
CEMM 01-6-103	0,156	>25	0,055	6,25	0,325	0,25	0,575	Indiferente
CEMM 05-2-063	0,22	>25	0,027	3,12	0,122	0,124	0,246	Sinergismo
CEMM 05-2-064	0,22	>25	0,055	6,25	0,325	0,25	0,575	Indiferente
CEMM 05-2-065	0,22	>25	0,055	6,25	0,325	0,25	0,575	Indiferente
CEMM 05-2-066	0,22	>25	0,055	6,25	0,325	0,25	0,575	Indiferente
CEMM 05-2-069	0,22	>25	0,055	6,25	0,325	0,25	0,575	Indiferente

KTC - cetoconazol; **PZA** - pirazinamida

Tabela 21. Concentração inibitória mínima (CIMs) de cetoconazol ($\mu\text{g/mL}$) e etambutol (mg/mL) isolada e em combinação, valores do índice da concentração inibitória fracionada (FICI) e efeito inibitório *in vitro* da combinação de ambos os antimicrobianos frente a 15 cepas de *C. posadasii*.

Nº de coleção	CIM isolado		CIM combinação		FIC		FICI	Resultado
	KTC	ETB	KTC	ETB	KTC	ETB		
CEMM 01-6-085	0,156	<0,62	0,027	0,077	0,173	0,124	0,297	Sinergismo
CEMM 01-6-087	0,156	<0,62	0,027	0,077	0,173	0,124	0,297	Sinergismo
CEMM 01-6-088	0,156	<0,62	0,027	0,077	0,173	0,124	0,297	Sinergismo
CEMM 01-6-089	0,078	<0,62	0,027	0,077	0,346	0,124	0,47	Sinergismo
CEMM 01-6-090	0,039	<0,62	0,027	0,077	0,692	0,124	0,816	Indiferente
CEMM 01-6-091	0,156	<0,62	0,027	0,077	0,173	0,124	0,297	Sinergismo
CEMM 01-6-092	0,078	<0,62	0,027	0,077	0,346	0,124	0,47	Sinergismo
CEMM 01-6-101	0,078	<0,62	0,027	0,077	0,346	0,124	0,47	Sinergismo
CEMM 01-6-102	0,156	<0,62	0,013	0,038	0,083	0,061	0,144	Sinergismo
CEMM 01-6-103	0,156	<0,62	0,055	0,155	0,352	0,25	0,602	Indiferente
CEMM 05-2-063	0,22	<0,62	0,027	0,077	0,122	0,124	0,246	Sinergismo
CEMM 05-2-064	0,22	<0,62	0,055	0,155	0,25	0,25	0,5	Sinergismo
CEMM 05-2-065	0,22	<0,62	0,055	0,155	0,25	0,25	0,5	Sinergismo
CEMM 05-2-066	0,22	<0,62	0,027	0,077	0,122	0,124	0,246	Sinergismo
CEMM 05-2-069	0,22	<0,62	0,055	0,155	0,25	0,25	0,5	Sinergismo

KTC - cetoconazol; **ETB** - etambutol

Tabela 22. Concentração inibitória mínima (CIMs) de itraconazol ($\mu\text{g/mL}$) e rifampicina (mg/mL) isolada e em combinação, valores do índice da concentração inibitória fracionada (FICI) e efeito inibitório *in vitro* da combinação de ambos os antimicrobianos frente a 15 cepas de *C. posadasii*. O FICI para todas as cepas fúngicas testadas foi interpretado como interação sinérgica.

Nº de coleção	CIM isolado		CIM combinação		FIC		FICI
	ITC	RIF	ITC	RIF	ITC	RIF	
CEMM 01-6-085	0,125	2,12	0,019	0,283	0,152	0,133	0,285
CEMM 01-6-087	0,125	2,12	0,019	0,283	0,152	0,133	0,285
CEMM 01-6-088	0,125	4,25	0,009	0,141	0,072	0,033	0,105
CEMM 01-6-089	0,125	4,25	0,019	0,283	0,152	0,066	0,218
CEMM 01-6-090	0,25	2,12	0,019	0,283	0,076	0,133	0,209
CEMM 01-6-091	0,125	4,25	0,009	0,141	0,072	0,033	0,105
CEMM 01-6-092	0,125	1,06	0,019	0,283	0,152	0,266	0,418
CEMM 01-6-101	0,125	2,12	0,019	0,283	0,152	0,133	0,285
CEMM 01-6-102	0,125	2,12	0,009	0,141	0,072	0,066	0,138
CEMM 01-6-103	0,5	1,06	0,019	0,283	0,038	0,266	0,304
CEMM 05-2-063	0,153	2,273	0,009	0,141	0,058	0,062	0,12
CEMM 05-2-064	0,153	2,273	0,019	0,283	0,124	0,124	0,248
CEMM 05-2-065	0,153	2,273	0,009	0,141	0,058	0,062	0,12
CEMM 05-2-066	0,153	2,273	0,019	0,283	0,124	0,124	0,248
CEMM 05-2-069	0,153	2,273	0,009	0,141	0,058	0,062	0,12

ITC - itraconazol; **RIF** - rifampicina

Tabela 23. Concentração inibitória mínima (CIMs) de itraconazol ($\mu\text{g/mL}$) e isoniazida (mg/mL) isolada e em combinação, valores do índice da concentração inibitória fracionada (FICI) e efeito inibitório *in vitro* da combinação de ambos os antimicrobianos frente a 15 cepas de *C. posadasii*.

Nº de coleção	CIM isolado		CIM combinação		FIC		FICI	Resultado
	ITC	INH	ITC	INH	ITC	INH		
CEMM 01-6-085	0,125	<0,25	0,038	0,062	0,304	0,248	0,552	Indiferente
CEMM 01-6-087	0,125	<0,25	0,038	0,062	0,304	0,248	0,552	Indiferente
CEMM 01-6-088	0,125	<0,25	0,019	0,031	0,152	0,124	0,276	Sinergismo
CEMM 01-6-089	0,125	<0,25	0,038	0,062	0,304	0,248	0,552	Indiferente
CEMM 01-6-090	0,25	<0,25	0,038	0,062	0,152	0,248	0,4	Sinergismo
CEMM 01-6-091	0,125	<0,25	0,019	0,031	0,152	0,124	0,276	Sinergismo
CEMM 01-6-092	0,125	<0,25	0,009	0,015	0,072	0,06	0,132	Sinergismo
CEMM 01-6-101	0,125	<0,25	0,038	0,062	0,304	0,248	0,552	Indiferente
CEMM 01-6-102	0,125	<0,25	0,038	0,062	0,304	0,248	0,552	Indiferente
CEMM 01-6-103	0,5	<0,25	0,038	0,062	0,076	0,248	0,324	Sinergismo
CEMM 05-2-063	0,153	<0,25	0,038	0,062	0,248	0,248	0,496	Sinergismo
CEMM 05-2-064	0,153	<0,25	0,038	0,062	0,248	0,248	0,496	Sinergismo
CEMM 05-2-065	0,153	<0,25	0,038	0,062	0,248	0,248	0,496	Sinergismo
CEMM 05-2-066	0,153	<0,25	0,038	0,062	0,248	0,248	0,496	Sinergismo
CEMM 05-2-069	0,153	<0,25	0,038	0,062	0,248	0,248	0,496	Sinergismo

ITC - itraconazol; INH - isoniazida

Tabela 24. Concentração inibitória mínima (CIMs) de itraconazol ($\mu\text{g/mL}$) e pirazinamida (mg/mL) isolada e em combinação, valores do índice da concentração inibitória fracionada (FICI) e efeito inibitório *in vitro* da combinação de ambos os antimicrobianos frente a 15 cepas de *C. posadasii*. O FICI para todas as cepas fúngicas testadas foi interpretado como interação sinérgica.

Nº de coleção	CIM isolado		CIM combinação		FIC		FICI
	ITC	PZA	ITC	PZA	ITC	PZA	
CEMM 01-6-085	0,125	>25	0,019	3,125	0,152	0,125	0,277
CEMM 01-6-087	0,125	>25	0,019	3,125	0,152	0,125	0,277
CEMM 01-6-088	0,125	>25	0,019	3,125	0,152	0,125	0,277
CEMM 01-6-089	0,125	>25	0,019	3,125	0,152	0,125	0,277
CEMM 01-6-090	0,25	>25	0,009	1,562	0,036	0,062	0,098
CEMM 01-6-091	0,125	>25	0,019	3,125	0,152	0,125	0,277
CEMM 01-6-092	0,125	>25	0,009	1,562	0,072	0,062	0,134
CEMM 01-6-101	0,125	>25	0,009	1,562	0,072	0,062	0,134
CEMM 01-6-102	0,125	>25	0,019	3,125	0,152	0,125	0,277
CEMM 01-6-103	0,5	>25	0,038	6,25	0,076	0,25	0,326
CEMM 05-2-063	0,153	>25	0,019	3,125	0,124	0,125	0,249
CEMM 05-2-064	0,153	>25	0,019	3,125	0,124	0,125	0,249
CEMM 05-2-065	0,153	>25	0,019	3,125	0,124	0,125	0,249
CEMM 05-2-066	0,153	>25	0,038	6,25	0,248	0,25	0,498
CEMM 05-2-069	0,153	>25	0,019	3,125	0,124	0,125	0,249

ITC - itraconazol; **PZA** - pirazinamida

Tabela 25. Concentração inibitória mínima (CIMs) de itraconazol ($\mu\text{g/mL}$) e etambutol (mg/mL) isolada e em combinação, valores do índice da concentração inibitória fracionada (FICI) e efeito inibitório *in vitro* da combinação de ambos os antimicrobianos frente a 15 cepas de *C. posadasii*

Nº de coleção	CIM isolado		CIM combinação		FIC		FICI	Resultado
	ITC	ETB	ITC	ETB	ITC	ETB		
CEMM 01-6-085	0,125	<0,62	0,019	0,077	0,152	0,124	0,276	Sinergismo
CEMM 01-6-087	0,125	<0,62	0,038	0,155	0,304	0,25	0,554	Indiferente
CEMM 01-6-088	0,125	<0,62	0,019	0,077	0,152	0,124	0,276	Sinergismo
CEMM 01-6-089	0,125	<0,62	0,009	0,038	0,072	0,061	0,133	Sinergismo
CEMM 01-6-090	0,25	<0,62	0,019	0,077	0,076	0,124	0,2	Sinergismo
CEMM 01-6-091	0,125	<0,62	0,009	0,038	0,072	0,061	0,133	Sinergismo
CEMM 01-6-092	0,125	<0,62	0,009	0,038	0,072	0,061	0,133	Sinergismo
CEMM 01-6-101	0,125	<0,62	0,019	0,077	0,152	0,124	0,276	Sinergismo
CEMM 01-6-102	0,125	<0,62	0,009	0,038	0,072	0,061	0,133	Sinergismo
CEMM 01-6-103	0,5	<0,62	0,009	0,038	0,018	0,061	0,079	Sinergismo
CEMM 05-2-063	0,153	<0,62	0,009	0,038	0,058	0,061	0,119	Sinergismo
CEMM 05-2-064	0,153	<0,62	0,019	0,077	0,124	0,124	0,248	Sinergismo
CEMM 05-2-065	0,153	<0,62	0,038	0,155	0,248	0,25	0,498	Sinergismo
CEMM 05-2-066	0,153	<0,62	0,038	0,155	0,248	0,25	0,498	Sinergismo
CEMM 05-2-069	0,153	<0,62	0,009	0,038	0,058	0,061	0,119	Sinergismo

ITC - itraconazol; **ETB** - etambutol

Tabela 26. Concentração inibitória mínima (CIMs) de fluconazol ($\mu\text{g/mL}$) e rifampicina (mg/mL) isolada e em combinação, valores do índice da concentração inibitória fracionada (FICI) e efeito inibitório *in vitro* da combinação de ambos os antimicrobianos frente a 15 cepas de *C. posadasii*

Nº de coleção	CIM isolado		CIM combinação		FIC		FICI	Resultado
	FLC	RIF	FLC	RIF	FLC	RIF		
CEMM 01-6-085	3,125	2,12	2,22	1,135	0,71	0,535	1,245	Indiferente
CEMM 01-6-087	3,125	2,12	1,11	0,567	0,355	0,267	0,622	Indiferente
CEMM 01-6-088	3,125	4,25	0,55	0,283	0,176	0,066	0,242	Sinergismo
CEMM 01-6-089	3,125	4,25	1,11	0,567	0,355	0,133	0,488	Sinergismo
CEMM 01-6-090	6,25	2,12	1,11	0,567	0,177	0,267	0,444	Sinergismo
CEMM 01-6-091	3,125	4,25	0,55	0,283	0,176	0,066	0,242	Sinergismo
CEMM 01-6-092	6,25	1,06	1,11	0,567	0,177	0,534	0,711	Indiferente
CEMM 01-6-101	6,25	2,12	1,11	0,567	0,177	0,267	0,444	Sinergismo
CEMM 01-6-102	6,25	2,12	1,11	0,567	0,177	0,267	0,444	Sinergismo
CEMM 01-6-103	6,25	1,06	1,11	0,567	0,177	0,534	0,711	Indiferente
CEMM 05-2-063	4,44	2,273	1,11	0,567	0,25	0,249	0,499	Sinergismo
CEMM 05-2-064	4,44	2,273	1,11	0,567	0,25	0,249	0,499	Sinergismo
CEMM 05-2-065	4,44	2,273	1,11	0,567	0,25	0,249	0,499	Sinergismo
CEMM 05-2-066	4,44	2,273	1,11	0,567	0,25	0,249	0,499	Sinergismo
CEMM 05-2-069	4,44	2,273	1,11	0,567	0,25	0,249	0,499	Sinergismo

FLC - fluconazol; **RIF** - rifampicina

Tabela 27. Concentração inibitória mínima (CIMs) de fluconazol ($\mu\text{g/mL}$) e isoniazida (mg/mL) isolada e em combinação, valores do índice da concentração inibitória fracionada (FICI) e efeito inibitório *in vitro* da combinação de ambos os antimicrobianos frente a 15 cepas de *C. posadasii*.

Nº de coleção	CIM isolado		CIM combinação		FIC		FICI	Resultado
	FLC	INH	FLC	INH	FLC	INH		
CEMM 01-6-085	3,125	<0,25	>4,44	>0,25	1,42	1	2,42	Indiferente
CEMM 01-6-087	3,125	<0,25	>4,44	>0,25	1,42	1	2,42	Indiferente
CEMM 01-6-088	3,125	<0,25	>4,44	>0,25	1,42	1	2,42	Indiferente
CEMM 01-6-089	3,125	<0,25	>4,44	>0,25	1,42	1	2,42	Indiferente
CEMM 01-6-090	6,25	<0,25	2,22	0,125	0,355	0,5	0,855	Indiferente
CEMM 01-6-091	3,125	<0,25	2,22	0,125	0,710	0,5	1,21	Indiferente
CEMM 01-6-092	6,25	<0,25	1,11	0,062	0,177	0,248	0,425	Sinergismo
CEMM 01-6-101	6,25	<0,25	>4,44	>0,25	0,710	1	1,71	Indiferente
CEMM 01-6-102	6,25	<0,25	>4,44	>0,25	0,710	1	1,71	Indiferente
CEMM 01-6-103	6,25	<0,25	>4,44	>0,25	0,710	1	1,71	Indiferente
CEMM 05-2-063	4,44	<0,25	>4,44	>0,25	1	1	2	Indiferente
CEMM 05-2-064	4,44	<0,25	>4,44	>0,25	1	1	2	Indiferente
CEMM 05-2-065	4,44	<0,25	2,22	0,125	0,5	0,5	1	Indiferente
CEMM 05-2-066	4,44	<0,25	>4,44	>0,25	1	1	2	Indiferente
CEMM 05-2-069	4,44	<0,25	2,22	0,125	0,5	0,5	1	Indiferente

FLC- fluconazol; **INH** - isoniazida.

Tabela 28. Concentração inibitória mínima (CIMs) de fluconazol ($\mu\text{g/mL}$) e pirazinamida (mg/mL) isolada e em combinação, valores do índice da concentração inibitória fracionada (FICI) e efeito inibitório *in vitro* da combinação de ambos os antimicrobianos frente a 15 cepas de *C. posadasii*.

Nº de coleção	CIM isolado		CIM combinação		FIC		FICI	Resultado
	FLC	PZA	FLC	PZA	FLC	PZA		
CEMM 01-6-085	3,125	>25	1,11	6,25	0,355	0,25	0,605	Indiferente
CEMM 01-6-087	3,125	>25	0,277	1,56	0,088	0,062	0,15	Sinergismo
CEMM 01-6-088	3,125	>25	0,277	1,56	0,088	0,062	0,15	Sinergismo
CEMM 01-6-089	3,125	>25	0,277	1,56	0,088	0,062	0,15	Sinergismo
CEMM 01-6-090	6,25	>25	0,277	1,56	0,044	0,062	0,106	Sinergismo
CEMM 01-6-091	3,125	>25	1,11	6,25	0,355	0,25	0,605	Indiferente
CEMM 01-6-092	6,25	>25	1,11	6,25	0,177	0,25	0,427	Sinergismo
CEMM 01-6-101	6,25	>25	1,11	6,25	0,177	0,25	0,427	Sinergismo
CEMM 01-6-102	6,25	>25	1,11	6,25	0,177	0,25	0,427	Sinergismo
CEMM 01-6-103	6,25	>25	1,11	6,25	0,177	0,25	0,427	Sinergismo
CEMM 05-2-063	4,44	>25	1,11	6,25	0,25	0,25	0,5	Sinergismo
CEMM 05-2-064	4,44	>25	1,11	6,25	0,25	0,25	0,5	Sinergismo
CEMM 05-2-065	4,44	>25	0,277	1,56	0,062	0,062	0,124	Sinergismo
CEMM 05-2-066	4,44	>25	1,11	6,25	0,25	0,25	0,5	Sinergismo
CEMM 05-2-069	4,44	>25	1,11	6,25	0,25	0,25	0,5	Sinergismo

FLC - fluconazol; **PZA** - pirazinamida

Tabela 29. Concentração inibitória mínima (CIMs) de fluconazol ($\mu\text{g/mL}$) e etambutol (mg/mL) isolada e em combinação, valores do índice da concentração inibitória fracionada (FICI) e efeito inibitório *in vitro* da combinação de ambos os antimicrobianos frente a 15 cepas de *C. posadasii*. O FICI para todas as cepas fúngicas testadas foi interpretado como interação sinérgica.

Nº de coleção	CIM isolado		CIM combinação		FIC		FICI
	FLC	ETB	FLC	ETB	FLC	ETB	
CEMM 01-6-085	3,125	<0,62	0,555	0,077	0,177	0,124	0,301
CEMM 01-6-087	3,125	<0,62	0,555	0,077	0,177	0,124	0,301
CEMM 01-6-088	3,125	<0,62	0,555	0,077	0,177	0,124	0,301
CEMM 01-6-089	3,125	<0,62	0,277	0,038	0,088	0,061	0,149
CEMM 01-6-090	6,25	<0,62	0,277	0,038	0,044	0,061	0,105
CEMM 01-6-091	3,125	<0,62	0,277	0,038	0,088	0,061	0,149
CEMM 01-6-092	6,25	<0,62	0,555	0,077	0,088	0,124	0,212
CEMM 01-6-101	6,25	<0,62	0,277	0,038	0,044	0,061	0,105
CEMM 01-6-102	6,25	<0,62	0,277	0,038	0,044	0,061	0,105
CEMM 01-6-103	6,25	<0,62	0,555	0,077	0,088	0,124	0,212
CEMM 05-2-063	4,44	<0,62	0,277	0,038	0,062	0,061	0,123
CEMM 05-2-064	4,44	<0,62	0,555	0,077	0,125	0,124	0,249
CEMM 05-2-065	4,44	<0,62	0,555	0,077	0,125	0,124	0,249
CEMM 05-2-066	4,44	<0,62	0,277	0,038	0,062	0,061	0,123
CEMM 05-2-069	4,44	<0,62	0,555	0,077	0,125	0,124	0,249

FLC - fluconazol; **ETB** - etambutol

Tabela 30. Concentração inibitória mínima (CIMs) de voriconazol ($\mu\text{g/mL}$) e rifampicina (mg/mL) isolada e em combinação, valores do índice da concentração inibitória fracionada (FICI) e efeito inibitório *in vitro* da combinação de ambos os antimicrobianos frente a 15 cepas de *C. posadasii*.

Nº de coleção	CIM isolado		CIM combinação		FIC		FICI	Resultado
	VRZ	RIF	VRZ	RIF	VRZ	RIF		
CEMM 01-6-085	0,125	2,12	0,015	0,283	0,12	0,133	0,253	Sinergismo
CEMM 01-6-087	0,125	2,12	0,015	0,283	0,12	0,133	0,253	Sinergismo
CEMM 01-6-088	0,125	4,25	0,015	0,283	0,12	0,066	0,186	Sinergismo
CEMM 01-6-089	0,125	4,25	0,015	0,283	0,12	0,066	0,186	Sinergismo
CEMM 01-6-090	0,125	2,12	0,015	0,283	0,12	0,133	0,253	Sinergismo
CEMM 01-6-091	0,125	4,25	0,015	0,283	0,12	0,066	0,186	Sinergismo
CEMM 01-6-092	0,125	1,06	0,015	0,283	0,12	0,266	0,386	Sinergismo
CEMM 01-6-101	0,125	2,12	0,015	0,283	0,12	0,133	0,253	Sinergismo
CEMM 01-6-102	0,125	2,12	0,031	0,56	0,248	0,264	0,512	Indiferente
CEMM 01-6-103	0,125	1,06	0,031	0,56	0,248	0,528	0,776	Indiferente
CEMM 05-2-063	0,125	2,273	0,015	0,283	0,12	0,124	0,244	Sinergismo
CEMM 05-2-064	0,125	2,273	0,015	0,283	0,12	0,124	0,244	Sinergismo
CEMM 05-2-065	0,125	2,273	0,007	0,141	0,056	0,062	0,118	Sinergismo
CEMM 05-2-066	0,125	2,273	0,031	0,56	0,248	0,246	0,494	Sinergismo
CEMM 05-2-069	0,125	2,273	0,031	0,56	0,248	0,246	0,494	Sinergismo

VRZ – voriconazol; **RIF** - rifampicina

Tabela 31. Concentração inibitória mínima (CIMs) de voriconazol ($\mu\text{g/mL}$) e isoniazida (mg/mL) isolada e em combinação, valores do índice da concentração inibitória fracionada (FICI) e efeito inibitório *in vitro* da combinação de ambos os antimicrobianos frente a 15 cepas de *C. posadasii*.

Nº de coleção	CIM isolado		CIM combinação		FIC		FICI	Resultado
	VRZ	INH	VRZ	INH	VRZ	INH		
CEMM 01-6-085	0,125	<0,25	0,062	0,125	0,496	0,5	0,996	Indiferente
CEMM 01-6-087	0,125	<0,25	0,062	0,125	0,496	0,5	0,996	Indiferente
CEMM 01-6-088	0,125	<0,25	0,031	0,062	0,248	0,248	0,496	Sinergismo
CEMM 01-6-089	0,125	<0,25	0,062	0,125	0,496	0,5	0,996	Indiferente
CEMM 01-6-090	0,125	<0,25	0,062	0,125	0,496	0,5	0,996	Indiferente
CEMM 01-6-091	0,125	<0,25	0,062	0,125	0,496	0,5	0,996	Indiferente
CEMM 01-6-092	0,125	<0,25	0,031	0,062	0,248	0,248	0,496	Sinergismo
CEMM 01-6-101	0,125	<0,25	0,062	0,125	0,496	0,5	0,996	Indiferente
CEMM 01-6-102	0,125	<0,25	0,125	0,25	1	1	2	Indiferente
CEMM 01-6-103	0,125	<0,25	0,125	0,25	1	1	2	Indiferente
CEMM 05-2-063	0,125	<0,25	0,125	0,25	1	1	2	Indiferente
CEMM 05-2-064	0,125	<0,25	0,125	0,25	1	1	2	Indiferente
CEMM 05-2-065	0,125	<0,25	0,062	0,125	0,496	0,5	0,996	Indiferente
CEMM 05-2-066	0,125	<0,25	0,125	0,25	1	1	2	Indiferente
CEMM 05-2-069	0,125	<0,25	0,062	0,125	0,496	0,5	0,996	Indiferente

VRZ - voriconazol; **INH** - isoniazida

Tabela 32. Concentração inibitória mínima (CIMs) de voriconazol ($\mu\text{g/mL}$) e pirazinamida (mg/mL) isolada e em combinação, valores do índice da concentração inibitória fracionada (FICI) e efeito inibitório *in vitro* da combinação de ambos os antimicrobianos frente a 15 cepas de *C. posadasii*. O FICI para todas as cepas fúngicas testadas foi interpretado como interação sinérgica.

Nº de coleção	CIM isolado		CIM combinação		FIC		FICI
	VRZ	PZA	VRZ	PZA	VRZ	PZA	
CEMM 01-6-085	0,125	>25	0,031	6,25	0,248	0,25	0,498
CEMM 01-6-087	0,125	>25	0,031	6,25	0,248	0,25	0,498
CEMM 01-6-088	0,125	>25	0,031	6,25	0,248	0,25	0,498
CEMM 01-6-089	0,125	>25	0,031	6,25	0,248	0,25	0,498
CEMM 01-6-090	0,125	>25	0,031	6,25	0,248	0,25	0,498
CEMM 01-6-091	0,125	>25	0,031	6,25	0,248	0,25	0,498
CEMM 01-6-092	0,125	>25	0,031	6,25	0,248	0,25	0,498
CEMM 01-6-101	0,125	>25	0,031	6,25	0,248	0,25	0,498
CEMM 01-6-102	0,125	>25	0,031	6,25	0,248	0,25	0,498
CEMM 01-6-103	0,125	>25	0,031	6,25	0,248	0,25	0,498
CEMM 05-2-063	0,125	>25	0,031	6,25	0,248	0,25	0,498
CEMM 05-2-064	0,125	>25	0,031	6,25	0,248	0,25	0,498
CEMM 05-2-065	0,125	>25	0,031	6,25	0,248	0,25	0,498
CEMM 05-2-066	0,125	>25	0,031	6,25	0,248	0,25	0,498
CEMM 05-2-069	0,125	>25	0,031	6,25	0,248	0,25	0,498

VRZ - voriconazol; **PZA** - pirazinamida

Tabela 33. Concentração inibitória mínima (CIMs) de voriconazol ($\mu\text{g/mL}$) e etambutol (mg/mL) isolada e em combinação, valores do índice da concentração inibitória fracionada (FICI) e efeito inibitório *in vitro* da combinação de ambos os antimicrobianos frente a 15 cepas de *C. posadasii*. O FICI para todas as cepas fúngicas testadas foi interpretado como interação sinérgica.

Nº de coleção	CIM isolado		CIM combinação		FIC		FICI
	VRZ	ETB	VRZ	ETB	VRZ	ETB	
CEMM 01-6-085	0,125	<0,62	0,007	0,038	0,056	0,061	0,117
CEMM 01-6-087	0,125	<0,62	0,015	0,077	0,12	0,124	0,244
CEMM 01-6-088	0,125	<0,62	0,007	0,038	0,056	0,061	0,117
CEMM 01-6-089	0,125	<0,62	0,007	0,038	0,056	0,061	0,117
CEMM 01-6-090	0,125	<0,62	0,007	0,038	0,056	0,061	0,117
CEMM 01-6-091	0,125	<0,62	0,015	0,077	0,12	0,124	0,244
CEMM 01-6-092	0,125	<0,62	0,015	0,077	0,12	0,124	0,244
CEMM 01-6-101	0,125	<0,62	0,007	0,038	0,056	0,061	0,117
CEMM 01-6-102	0,125	<0,62	0,007	0,038	0,056	0,061	0,117
CEMM 01-6-103	0,125	<0,62	0,015	0,077	0,12	0,124	0,244
CEMM 05-2-063	0,125	<0,62	0,007	0,038	0,056	0,061	0,117
CEMM 05-2-064	0,125	<0,62	0,007	0,038	0,056	0,061	0,117
CEMM 05-2-065	0,125	<0,62	0,015	0,077	0,12	0,124	0,244
CEMM 05-2-066	0,125	<0,62	0,015	0,077	0,12	0,124	0,244
CEMM 05-2-069	0,125	<0,62	0,007	0,038	0,056	0,061	0,117

VRZ - voriconazol; **ETB** - etambutol

Tabela 34. Concentração inibitória mínima (CIMs) de caspofungina ($\mu\text{g/mL}$) e rifampicina (mg/mL) isolada e em combinação, valores do índice da concentração inibitória fracionada (FICI) e efeito inibitório *in vitro* da combinação de ambos os antimicrobianos frente a 15 cepas de *C. posadasii*.

Nº de coleção	CIM isolado		CIM combinação		FIC		FICI	Resultado
	CAS	RIF	CAS	RIF	CAS	RIF		
CEMM 01-6-085	32	2,12	4	0,28	0,125	0,132	0,257	Sinergismo
CEMM 01-6-087	16	2,12	4	0,28	0,25	0,132	0,382	Sinergismo
CEMM 01-6-088	16	4,25	8	0,56	0,5	0,131	0,631	Indiferente
CEMM 01-6-089	32	4,25	4	0,28	0,125	0,065	0,19	Sinergismo
CEMM 01-6-090	32	2,12	4	0,28	0,125	0,132	0,257	Sinergismo
CEMM 01-6-091	16	4,25	2	0,14	0,125	0,032	0,157	Sinergismo
CEMM 01-6-092	16	1,06	8	0,56	0,5	0,528	1,028	Indiferente
CEMM 01-6-101	32	2,12	8	0,56	0,25	0,264	0,514	Indiferente
CEMM 01-6-102	16	2,12	4	0,28	0,25	0,132	0,382	Sinergismo
CEMM 01-6-103	32	1,06	2	0,14	0,0625	0,132	0,194	Sinergismo
CEMM 05-2-063	22,62	2,273	4	0,28	0,176	0,123	0,299	Sinergismo
CEMM 05-2-064	22,62	2,273	4	0,28	0,176	0,123	0,299	Sinergismo
CEMM 05-2-065	22,62	2,273	4	0,28	0,176	0,123	0,299	Sinergismo
CEMM 05-2-066	22,62	2,273	4	0,28	0,176	0,123	0,299	Sinergismo
CEMM 05-2-069	22,62	2,273	4	0,28	0,176	0,123	0,299	Sinergismo

CAS - caspofungina; **RIF**- rifampicina

Tabela 35. Concentração inibitória mínima (CIMs) de caspofungina ($\mu\text{g/mL}$) e isoniazida (mg/mL) isolada e em combinação, valores do índice da concentração inibitória fracionada (FICI) e efeito inibitório *in vitro* da combinação de ambos os antimicrobianos frente a 15 cepas de *C. posadasii*. O FICI para todas as cepas fúngicas testadas foi interpretado como interação indiferente.

Nº de coleção	CIM isolado		CIM combinação		FIC		FICI
	CAS	INH	CAS	INH	CAS	INH	
CEMM 01-6-085	32	<0,25	16	0,125	0,5	0,5	1
CEMM 01-6-087	16	<0,25	8	0,062	0,5	0,248	0,748
CEMM 01-6-088	16	<0,25	8	0,062	0,5	0,248	0,748
CEMM 01-6-089	32	<0,25	16	0,125	0,5	0,5	1
CEMM 01-6-090	32	<0,25	16	0,125	0,5	0,5	1
CEMM 01-6-091	16	<0,25	8	0,062	0,5	0,248	0,748
CEMM 01-6-092	16	<0,25	8	0,062	0,5	0,248	0,748
CEMM 01-6-101	32	<0,25	16	0,125	0,5	0,5	1
CEMM 01-6-102	16	<0,25	8	0,062	0,5	0,248	0,748
CEMM 01-6-103	32	<0,25	16	0,125	0,5	0,5	1
CEMM 05-2-063	22,62	<0,25	8	0,062	0,353	0,248	0,601
CEMM 05-2-064	22,62	<0,25	8	0,062	0,353	0,248	0,601
CEMM 05-2-065	22,62	<0,25	16	0,125	0,707	0,5	1,207
CEMM 05-2-066	22,62	<0,25	8	0,062	0,353	0,248	0,601
CEMM 05-2-069	22,62	<0,25	16	0,125	0,707	0,5	1,207

CAS - caspofungina; **INH** - isoniazida

Tabela 36. Concentração inibitória mínima (CIMs) de caspofungina ($\mu\text{g/mL}$) e pirazinamida (mg/mL) isolada e em combinação, valores do índice da concentração inibitória fracionada (FICI) e efeito inibitório *in vitro* da combinação de ambos os antimicrobianos frente a 15 cepas de *C. posadasii*. O FICI para todas as cepas fúngicas testadas foi interpretado como interação indiferente.

Nº de coleção	CIM isolado		CIM combinação		FIC		FICI
	CAS	PZA	CAS	PZA	CAS	PZA	
CEMM 01-6-085	32	>25	16	12,5	0,5	0,5	1
CEMM 01-6-087	16	>25	16	12,5	1	0,5	1,5
CEMM 01-6-088	16	>25	16	12,5	1	0,5	1,5
CEMM 01-6-089	32	>25	16	12,5	0,5	0,5	1
CEMM 01-6-090	32	>25	16	12,5	0,5	0,5	1
CEMM 01-6-091	16	>25	16	12,5	1	0,5	1,5
CEMM 01-6-092	16	>25	16	12,5	1	0,5	1,5
CEMM 01-6-101	32	>25	16	12,5	0,5	0,5	1
CEMM 01-6-102	16	>25	8	6,25	0,5	0,25	1
CEMM 01-6-103	32	>25	16	12,5	0,5	0,5	1
CEMM 05-2-063	22,62	>25	16	12,5	0,707	0,5	1,207
CEMM 05-2-064	22,62	>25	16	12,5	0,707	0,5	1,207
CEMM 05-2-065	22,62	>25	16	12,5	0,707	0,5	1,207
CEMM 05-2-066	22,62	>25	16	12,5	0,707	0,5	1,207
CEMM 05-2-069	22,62	>25	16	12,5	0,707	0,5	1,207

CAS - caspofungina; **PZA** - pirazinamida

Tabela 37. Concentração inibitória mínima (CIMs) de caspofungina ($\mu\text{g/mL}$) e etambutol (mg/mL) isolada e em combinação, valores do índice da concentração inibitória fracionada (FICI) e efeito inibitório *in vitro* da combinação de ambos os antimicrobianos frente a 15 cepas de *C. posadasii*. O FICI para todas as cepas fúngicas testadas foi interpretado como interação indiferente.

Nº de coleção	CIM isolado		CIM combinação		FIC		FICI
	CAS	ETB	CAS	ETB	CAS	ETB	
CEMM 01-6-085	32	<0,62	16	0,31	0,5	0,5	1
CEMM 01-6-087	16	<0,62	16	0,31	1	0,5	1,5
CEMM 01-6-088	16	<0,62	16	0,31	1	0,5	1,5
CEMM 01-6-089	32	<0,62	16	0,31	0,5	0,5	1
CEMM 01-6-090	32	<0,62	16	0,31	0,5	0,5	1
CEMM 01-6-091	16	<0,62	16	0,31	1	0,5	1,5
CEMM 01-6-092	16	<0,62	16	0,31	1	0,5	1,5
CEMM 01-6-101	32	<0,62	32	0,62	1	1	2
CEMM 01-6-102	16	<0,62	16	0,31	1	0,5	1,5
CEMM 01-6-103	32	<0,62	16	0,31	0,5	0,5	1
CEMM 05-2-063	22,62	<0,62	16	0,31	0,707	0,5	1,207
CEMM 05-2-064	22,62	<0,62	16	0,31	0,707	0,5	1,207
CEMM 05-2-065	22,62	<0,62	8	0,15	0,353	0,241	0,594
CEMM 05-2-066	22,62	<0,62	16	0,31	0,707	0,5	1,207
CEMM 05-2-069	22,62	<0,62	16	0,31	0,707	0,5	1,207

CAS - caspofungina; **ETB** - etambutol

ANEXO II
MEIOS DE CULTURA

MEIOS DE CULTURA, CORANTES E SOLUÇÕES USADOS EM MICOLOGIA
(BRILHANTE et al., 2004; PAIXÃO et al., 2004)

AZUL DE ALGODÃO

Ácido láctico	20 g
Fenol	20 g
Glicerina	20 g
Azul de algodão	0,05 g
Água deionizada	20 mL

SOLUÇÃO SALINA

NaCl	0,85 g
Água deionizada	100 mL

Misturar a água destilada e o cloreto de sódio. Autoclavar e distribuir, alíquotas de 10mL, em tubos de vidro com tampa de rosca.

MEIO RPMI –MOPS

OBJETIVO

Meio de cultura padronizado pelo CLSI, para execução de testes de susceptibilidade a antifúngicos.

COMPOSIÇÃO (g/L de água)

L-arginina	0,200
L-Histidina (base livre)	0,015
L-hidroxiprolina	0,020
L-isoleucina	0,050
Mio-inositol	0,035
L-leucina	0,050
L-lisina- HCl	0,040

L-metionina	0,015
Ácido Fólico	0,001
L-fenilalanina	0,015
Cloreto de potássio	0,400
L-prolina	0,020
Fosfato de sódio, dibásico (anidro)	0,800
Cloreto de Colina	0,003
D-glicose	2,000
Glutationa, reduzida	0,001
Niacinamida	0,001
Vitamina B12	0,000005
Sulfato de magnésio (anidro)	0,04884
L-serina	0,030
Ácido L-aspártico	0,020
Vermelho de fenol, Na	0,0053
L-treonina	0,020
L-triptofano	0,005
Cloreto de sódio	6,000
Nitrato de Sódio- H2O	0,100
L-tirosina- 2Na	0,02883
L-valina	0,020
Biotina	0,0020
D-pantotênico	0,00025
Tiamina HCl	0,001
L-cistina – 2HCl	0,0652
Ácido L-glutâmico	0,020
Piridoxina HCl	0,001
Riboflavina	0,0002
L-glutamina	0,300
Glicina	0,010
L-aspargina (anidra)	0,050
Cloranfenicol	0.5
PABA	0,001
Água destilada q.s.p	1000 mL

PREPARO

RPMI 1640 (com glutamina e sem bicarbonato de sódio) *	10.5 g	
MOPS (ácido 2- [N-morfolino] –propanossufônico)	34.5 g	
Cloranfenicol	0,5 g	Água
destilada	1000 mL	

Dissolver os componentes em água destilada. Ajustar o pH final para 7.0 (com solução de hidróxido de sódio 10 N). Homogeneizar e esterilizar o meio por filtração. Manter, sob refrigeração, até o momento do uso.

* O meio RPMI 1640 é uma mistura de sais enriquecidos com aminoácidos e vitaminas, sendo quimicamente definido e livre de macromoléculas. Este meio é fornecido comercialmente, na forma desidratada, em pó ou líquido. Na forma de pó, tem a vantagem de se manter estável por mais de 24 meses, se conservado bem fechado e sob refrigeração. Por ser um pó extremamente higroscópico, deve ser bem protegido do meio ambiente, especialmente de lugares úmidos. Não são recomendadas preparações com concentrações maiores dos que as preconizadas pelo fabricante, devido a grande possibilidade de formação de precipitados.

MEIO YNB

Composição do meio *Yeast Nitrogen Base* (YNB)

Biotina	2 µg
Pantotenato de Cálcio	400 µg
Ácido fólico	2 µg
Inositol	2000 µg
Niacina	400 µg
Ácido p-aminobenzóico	200 µg
Cloridato de piridoxina	400 µg
Riboflavina	200 µg
Cloridato de Tiamina	400 µg
Ácido bórico	500 µg
Sulfato de Cobre	40 µg
Iodeto de Potásio	100 µg
Cloreto Férrico	200 µg

Sulfato de Manganês	400 µg
Molibdato de Sódio	200 µg
Sulfato de Zinc	400 µg
Fosfato de Potásio Monobásico	1g
Sulfato de Magnésio	500 mg
Cloreto de Sódio	100 mg
Cloreto de Cálcio	100 mg
Água destilada q.s.p	1000 mL

PREPARO

Dissolver o *Yeast nitrogen base* 6.7 g em 100 mL de água destilada e deionizada; esterilizar por filtração.

ANEXO III
PUBLICAÇÕES

PUBLICAÇÕES

Artigo 1

In vitro synergistic effects of antituberculosis drugs plus antifungals against *Coccidioides posadasii*.

Artigo aceito e publicado

International Journal of Antimicrobial Agents – Fator de impacto: Qualis: A2.

Artigo 2

Cotrimoxazole enhances *in vitro* susceptibility of *Coccidioides posadasii* to amphotericin B.

Artigo submetido

Journal of Antimicrobial Chemotherapy- Fator de impacto Qualis: A1.