

CORINE SAMPAIO MATOS

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE
ISOLADOS CLÍNICOS DE *Cryptococcus* spp., NO ESTADO
DA BAHIA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmácia, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Tânia Fraga Barros

Salvador

2011

Matos, Corine Sampaio

Caracterização fenotípica e genotípica de isolados clínicos de *Cryptococcus* spp., no estado da Bahia.

100 f: II

Orientadora: Profa. Dra. Tânia Fraga Barros
Dissertação (mestrado) – UFBA, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-graduação em Farmácia, 2011.

A

Professora Tânia, minha mestra, por ter me ensinado a aprender.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me proporcionado oportunidades de crescimento pessoal e profissional durante esse período de aprendizado.

Aos meus pais pelo amor incondicional e pelo incentivo que me deram durante toda minha vida.

A Joilton Matos, meu esposo, pelo amor e companheirismo que demonstra todos os dias, principalmente nos piores. Você é muito importante!

A Clarissa e Waltinho, meus irmãos, por suportar meus maus momentos e por tentar sempre explicar minha ausência.

A minha família, que mesmo não entendendo minha ausência, torce pelo meu sucesso. Obrigada em especial a Tia Rita, Tio Jaime, Tia Sandra e Tio Cristino.

A minha nova família, Dona Rosa e Seu João Matos, por ter me acolhido com filha.

A Ana Carolina Arraes, Silvia Cruvinel, Manuela Lins e Adriana Andrade, vocês são minhas irmãs de coração.

Aos colegas de mestrado, por compartilhar os momentos bons e os ruins, espero que nossa amizade se perpetue.

A Raimundo Neves pelo apoio estatístico.

Ao LEMB (Laboratório de Epidemiologia Molecular e Bioestatística), principalmente a Ana Paula Menezes, pela ajuda preciosa.

Ao LPA (Laboratório de Pesquisa em Anemias) pelas portas sempre abertas.

A Neide Silva, se não fosse sua iniciativa, este trabalho não aconteceria.

A minha mestra e mãe, Professora Tânia Barros, pela confiança, incentivo, respeito, dedicação, carinho e amizade, pelas concordâncias e discordâncias que me fizeram crescer a cada dia ao longo destes 8 anos de formação acadêmica e pesquisa.

A Débora Carvalho e todos aqueles na Faculdade de Farmácia que me apoiaram e torceram por mim.

A todos os amigos, não citarei nomes para não ser injusta, que compartilharam esses momentos e me incentivaram emocional e profissionalmente.

Ao Programa de Pós-graduação em Farmácia.

Ao Projeto Casadinho e Fapesb pelo apoio financeiro.

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.”
Cora Coralina

Resumo

Cryptococcus spp. é uma levedura encapsulada oportunista ubíqua que causa infecções graves, que vão desde a colonização pulmonar assintomática até a meningite. Esse gênero possui duas espécies mais comumente associadas à infecção em humanos, *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, que diferem quanto à epidemiologia, virulência, manifestações clínicas e quanto à susceptibilidade a antifúngicos, este último considerado um patógeno emergente. A avaliação da sensibilidade antifúngica através da técnica de microdiluição em caldo é considerada padrão ouro, porém, apresenta alto custo, o que inviabiliza sua utilização na rotina laboratorial. A técnica de disco difusão pode se tornar uma alternativa a microdiluição em caldo visto sua simplicidade e baixo custo, tendo seu desempenho considerado adequado por diversos autores. Foram caracterizados fenotípicamente e genotípicamente 62 isolados de *Cryptococcus* spp. oriundos de casos de meningite na Bahia no período de 2006 a 2010, quanto a quimiotipagem, determinação de fatores de virulência, genotipagem e determinação de sensibilidade a antifúngicos. Também, o desempenho da técnica de disco difusão para determinação de susceptibilidade de *Cryptococcus* spp. foi avaliado. No total, 79% das leveduras pertenciam a espécie *C. neoformans* e 21% a espécie *C. gattii*. A avaliação genotípica mostrou 100% dos isolados de *C. gattii* pertencentes ao genótipo VGII e 98% dos *C. neoformans* ao VNI. A determinação do perfil de susceptibilidade mostrou isolados resistentes a fluconazol (4,8%), 5-flucitosina (1,6%) e anfotericina B (3,2%); a estratificação dos resultados de sensibilidade por espécie apontou diferenças significativas frente à azóis. Todos os isolados apresentaram pigmento melanínico e cresceram a 37°C, porém, um isolado da espécie *C. gattii* foi urease negativo. Em 63% dos isolados foi encontrada alta atividade fosfolipásica, no entanto, em nenhum foi detectada a atividade proteolítica. A técnica de disco difusão mostrou um desempenho satisfatório com base nos resultados encontrados pelas análises de correlação e concordância entre critérios de interpretação, exceto para 5-flucitosina. Este é o primeiro trabalho a descrever os perfis de susceptibilidade antifúngica e molecular de isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. na Bahia, Brasil. O elevado percentual de isolados de *C. gattii* pertencente ao genótipo VGII, bem como sua menor susceptibilidade aos antifúngicos torna importante o conhecimento da espécie envolvida na infecção criptocócica no nosso estado. A avaliação preliminar aqui apresentada tanto na avaliação do desempenho da disco difusão, como na distribuição e perfil de susceptibilidade das espécies de *Cryptococcus* spp. ressalva a importância de uma constante vigilância acerca das tendências da doença no nosso estado, bem como na utilização de testes alternativos confiáveis na determinação da sensibilidade dessas leveduras.

Palavras-chave: *Cryptococcus* spp., perfil de susceptibilidade, virulência, genotipagem, testes de susceptibilidade

Abstract

Cryptococcus spp. is a ubiquitous opportunistic encapsulated yeast that causes serious infections, ranging from asymptomatic pulmonary colonization meningitis. This genus has two species most commonly associated with infection in humans, *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, which differ in epidemiology, virulence, clinical manifestations and their susceptibility to the antifungal agents, the latter considered an emerging pathogen. The evaluation of antifungal susceptibility by broth microdilution technique is considered the gold standard, but is expensive and laborious, which makes their use for routine monitoring. The disk diffusion technique may become an alternative to microdilution because of its simplicity and low cost, and its performance as satisfactory by several authors. We characterized phenotypic and genotypic 62 isolates of *Cryptococcus* spp. from cases of meningitis in Bahia in the period 2006 to 2010, as quimiopigagem, determination of virulence factors, genotyping and determination of sensitivity to antifungal agents. We also evaluated the performance of disk-diffusion technique for determining the susceptibility of *Cryptococcus* spp. In total, 79% of the yeasts belonged to species *C. neoformans* and 21% of the species *C. gattii*. The genotypic evaluation showed 100% of *C. gattii* VGII belonging to the genotype and 98% of *C. neoformans* to the NIV. The determination of resistant isolates showed susceptibility to fluconazole (4.8%), 5-flucytosine (1.6%) and amphotericin B (3.2%), the stratification of the results of sensitivity for each species showed significant differences in front of azoles. All isolates showed melanin pigment and grew at 37 °C, however, an isolated species *C. gattii* was urease negative. In 63% of isolates were found high phospholipase activity; however none was detected in the proteolytic activity. The disk diffusion technique showed a satisfactory performance based on results found by analysis of correlation and agreement between the interpretation criteria, except for 5-flucytosine. This is the first study to describe the susceptibility profile of molecular and clinical isolates of *Cryptococcus* spp. in Bahia, Brazil. The high percentage of isolates of *C. gattii* VGII belonging to the genotype and its lower susceptibility to antifungal agents makes it important to know which species are involved in cryptococcal infection in our state. The preliminary evaluation presented here both in assessing the performance of disk diffusion, and the distribution and species susceptibility profile of *Cryptococcus* spp. Subject to the importance of constant vigilance on the trends of the disease in our state, as well as use of alternative reliable tests to determine the sensitivity of these yeasts.

Keywords: *Cryptococcus* spp., Susceptibility profile, virulence genotyping, susceptibility testing

Lista de Figuras

Figura 01. Esquema de classificação de <i>Cryptococcus</i> spp. quanto a espécie, sorotipos e genótipos.....	15
Figura 02. Ciclo de vida de <i>Cryptococcus</i> spp.....	17
Figura 03. Patogênese da criptococose.....	21
Figura 04. Sítios de restrição das enzimas <i>Sau96I</i> e <i>HhaI</i>	45
Figura 05. Cápsula de <i>Cryptococcus</i> spp. observada pelo contraste da preparação de tinta da China.....	48
Figura 06. Frequência das espécies de <i>Cryptococcus</i> spp. isolados de casos de meningite diagnosticados no Hospital Especializado Couto Maia em Salvador, BA.....	48
Figura 07. Diagrama de dispersão entre diâmetros de zonas de inibição e CIM frente a Fluconazol.....	55
Figura 08. Concordância categórica do perfil de susceptibilidade frente a Fluconazol.....	56
Figura 09. Concordância categórica do perfil de susceptibilidade frente a Itraconazol.....	56
Figura 10. Diagrama de dispersão entre diâmetros de zonas de inibição e CIM frente a Itraconazol.....	57
Figura 11. Concordância categórica do perfil de susceptibilidade frente a Anfotericina B.....	57
Figura 12. Diagrama de dispersão entre diâmetros de zonas de inibição e CIM frente a Anfotericina B.....	58
Figura 13. Concordância categórica do perfil de susceptibilidade frente a 5-Flucitosina.....	58
Figura 14. Diagrama de dispersão entre diâmetros de zonas de inibição e CIM frente a 5-Flucitosina.....	59

- Figura 15. Integridade do DNA genômico de isolados de *Cryptococcus* spp., em gel de agarose a 1%.....59
- Figura 16. Fragmento de DNA correspondente ao produto de amplificação do gene URA5 de isolados clínicos de *Cryptococcus* spp., em gel de agarose a 3%.....60
- Figura 17. Mapa de restrição do produto de PCR do gene URA5 pelas enzimas *Sau96I* e *HhaI* dos padrões moleculares de *Cryptococcus* spp.....60
- Figura 18. Perfil de RFLP do gene URA5 obtido por restrição dupla com *Sau96I* e *HhaI* de *Cryptococcus* spp. em gel de agarose a 3%.....61
- Figura 19. Perfis moleculares gerados por RFLP do gene URA5 de isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. em gel de agarose a 3%.....62
- Figura 20. Distribuição da frequência de espécies de *Cryptococcus* spp. no Brasil.....65

Lista de Tabelas

Tabela 01. Critérios de interpretação de resultados para metodologia de disco difusão (mm).....	41
Tabela 02. Diretrizes de interpretação dos testes de sensibilidade <i>in vitro</i> para metodologia de diluição em caldo.....	43
Tabela 03. Estimativa de massa (ng) por fragmento de 0,1 µg de DNA do fago λ digerido pela enzima <i>HindIII</i>	44
Tabela 04. Atividade enzimática de Proteinase e Fosfolipase de isolados clínicos de <i>Cryptococcus</i> spp.....	49
Tabela 05. Perfil de susceptibilidade antifúngica de isolados clínicos de <i>Cryptococcus</i> spp. pelo método de disco difusão avaliado por diferentes critérios de interpretação.....	50
Tabela 06. Perfil da susceptibilidade antifúngica de isolados clínicos de <i>Cryptococcus</i> spp. pela metodologia de microdiluição em caldo (M27-A3).....	50
Tabela 07. Perfil de susceptibilidade antifúngica por espécie de <i>Cryptococcus</i> spp.....	51
Tabela 08. Valores de CIM de antifúngicos de isolados clínicos de <i>Cryptococcus</i> spp.....	52
Tabela 09. Concordância entre os resultados de susceptibilidade antifúngica obtidos pela técnica de disco difusão e de microdiluição em caldo utilizando o critério proposto pelo NeoSensitabs.....	53
Tabela 10. Concordância entre os resultados de susceptibilidade antifúngica obtidos pela técnica de disco difusão e de microdiluição em caldo utilizando o critério proposto pela CECON.....	54

Sumário

1.0.	INTRODUÇÃO	14
1.1.	<i>Cryptococcus</i> spp.....	14
1.1.1.	Taxonomia.....	14
1.1.2.	Biologia.....	16
1.1.3.	Fatores de virulência	18
1.1.4.	Patogenia e ciclo de vida.....	21
1.2.	Criptococose.....	23
1.2.1.	Epidemiologia.....	23
1.2.2.	Aspectos clínicos	25
1.2.3.	Diagnóstico laboratorial.....	27
1.2.4.	Tratamento	29
1.3.	Testes de susceptibilidade antifúngica	30
1.4.	Resistência antifúngica dos <i>Cryptococcus</i> spp	32
1.5.	Justificativa.....	33
2.0.	OBJETIVOS	35
2.1.	Objetivo Geral	35
2.2.	Objetivo Específico	35
3.0.	MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1.	Micro-organismos	37
3.1.1.	Isolados clínicos	37
3.1.2.	Cepas padrão	37
3.1.3.	Estoque e manutenção dos isolados	37
3.2.	Caracterização Fenotípica	37
3.2.1.	Identificação fúngica	37
3.2.2.	Quimiotipagem	38
3.2.3.	Determinação de fatores de virulência	39
3.2.3.1.	Pesquisa de fosfolipase e proteinase	30
3.2.3.2.	Produção de urease	39
3.2.3.3.	Habilidade de crescimento a 37°C.....	40
3.2.3.4.	Produção de melanina	40
3.3.	Determinação da sensibilidade a antifúngicos	40
3.3.1.	Disco difusão	40
3.3.1.1.	Técnica	40
3.3.1.2.	Crterios de interpretação de resultados	41

3.3.2.	Microdiluição em caldo	41
3.3.2.1.	Técnica	41
3.3.2.2.	Cr�terios de interpreta�o de resultados	42
3.4.	An�lise Estat�stica	43
3.5.	Caracteriza�o Genot�pica	44
3.5.1.	Extra�o do DNA gen�mico	45
3.5.2.	Quantifica�o do DNA gen�mico	45
3.5.3.	Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) do gene URA5..	45
3.5.4.	Constru�o do mapa de restri�o	46
3.6.	Aspectos �ticos.....	46
4.0.	RESULTADOS	48
4.1.	Caracteriza�o Fenot�pica	48
4.1.1.	Identifica�o	48
4.1.2.	Quimiotipagem	48
4.1.3.	Fatores de virul�ncia	49
4.1.4.	Perfil de susceptibilidade antif�ngica	49
4.1.4.1.	Disco difus�o	49
4.1.4.2.	Microdilui�o em caldo	50
4.1.4.3.	Avalia�o de concord�ncia entre os resultados de susceptibilidade.....	52
4.1.4.4.	An�lise de Correla�o entre os di�metros de halos de inibi�o e os valores de CIM.....	55
4.2.	Caracteriza�o Genot�pica.....	59
4.2.1.	Extra�o e quantifica�o de DNA	59
4.2.2.	Rea�o em Cadeia da Polimerase associado ao Polimorfismo do Tamanho do Fragmento de Restri�o (PCR-RFLP) do gene URA5.....	60
5.0.	DISCUSS�O	64
6.0.	CONCLUS�ES	76
7.0.	CONSIDERA�OES FINAIS	78
8.0.	PERSPECTIVAS.....	80
9.0.	REFER�NCIAS	82
10.0.	ANEXOS	99

A incidência de micoses oportunistas invasivas tem se elevado devido ao aumento população de pacientes imunossuprimidos (transplantados de órgão sólido e transplantados receptores de células-tronco hematopoéticas, pacientes oncológicos, pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) pacientes com doenças auto-imunes, recém-nascidos prematuros, doentes idosos e pacientes em recuperação de cirurgia de grande porte) (PAPAS et al, 2001; WARNOCK, 2007). Apesar de algumas opções eficazes de tratamento, as micoses estão associadas com alta morbidade e mortalidade (NUCCI et al, 2010).

As micoses oportunistas mostram distintos padrões de incidência regional em todo o mundo e, dependendo da região geográfica, podem apresentar características epidemiológicas diferentes, o que pode ser particularmente marcante para micoses que são adquiridas do meio ambiente. O conhecimento das características epidemiológicas de uma determinada região é importante devido ao grande deslocamento populacional (NUCCI et al, 2010).

Cryptococcus spp. é a terceira causa de infecção oportunista entre pacientes transplantados de órgãos sólidos e células hematopoiéticas, precedido por *Candida* spp. e *Aspergillus* spp (PAPAS et al, 2001) e a criptococose é uma das principais doenças definidoras de SIDA (CHARIYALERTSAK et al, 2001)

Até a última década os *Cryptococcus* spp. foi a levedura associada a infecção em indivíduos imunocomprometidos, com raros casos de infecção em imunocompetentes. Com o aumento do número de casos registrados após o surto da doença na ilha de Vancouver Canadá, este agente emerge como importante patógeno, o que torna necessário o conhecimento acerca da distribuição, sensibilidade e virulência dessa levedura no nosso estado.

1.1. *Cryptococcus* spp.

1.1.1. Taxonomia

Cryptococcus spp. são organismos leveduriformes encapsulados, pertencentes ao filo Basidiomycota, classe Tremellales (Ordem Tremellomycetes) e da família Tremellaceae (KWON-CHUNG, 1975).

O gênero *Cryptococcus* é composto por mais de 37 espécies, a maioria dos quais não causa doença em mamíferos. As mais importantes espécies causadoras de doenças são referidas como complexo *Cryptococcus neoformans* - *C. gattii* (FINDLEY et al, 2009) e o seu estágio sexual são nomeados de *Filobasidiella neoformans* e *Filobasidiella bacillispora*, respectivamente (KWON-CHUNG, 1975; 1976a). Este complexo anteriormente incluía duas variedades: *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipos A e D) e *C. neoformans* var. *gattii* (sorotipos B e C), porém, recentemente, o *C. neoformans* var. *gattii* foi classificado como

uma espécie distinta, e os sorotipos A e D foram separados em duas variedades: *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A) e *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D) (FRANZOT et al, 1998;1999; BOEKHOUT et al, 2001; KWON-CHUNG, 1976a; 1976b; 2006; LIN; HEITMAN, 2006).

As técnicas que utilizam a biologia molecular vêm substituindo a classificação sorológica desses organismos, pois a avaliação genotípica fornece informações mais precisas que auxiliam na compreensão das suas inter-relações, tanto dentro como entre zonas geográficas (LESTER et al, 2011).

A determinação de genótipos de *Cryptococcus* spp. pode ser realizada por vários métodos moleculares, incluindo PCR fingerprinting, polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (amplified fragment length polymorphisms - AFLP); polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (restriction fragment length polymorphism – RFLP) e amplificação aleatória de DNA polimórfico (random amplification of polymorphic DNA – RAPD), gerando quatro tipos moleculares de *C. neoformans*: VNI e VNII que compreendem os isolados de *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A); VNIII o sorotipo AD e VNIV o *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D). Os sorotipos B e C de *C. gattii* podem ser classificados em também quatro genótipos: VGI, VGII, VGIII e VGIV (FINDLEY et al, 2009; MEYER et al, 1999; BOEKHOUT et al, 1997; 2001) (Figura 01).

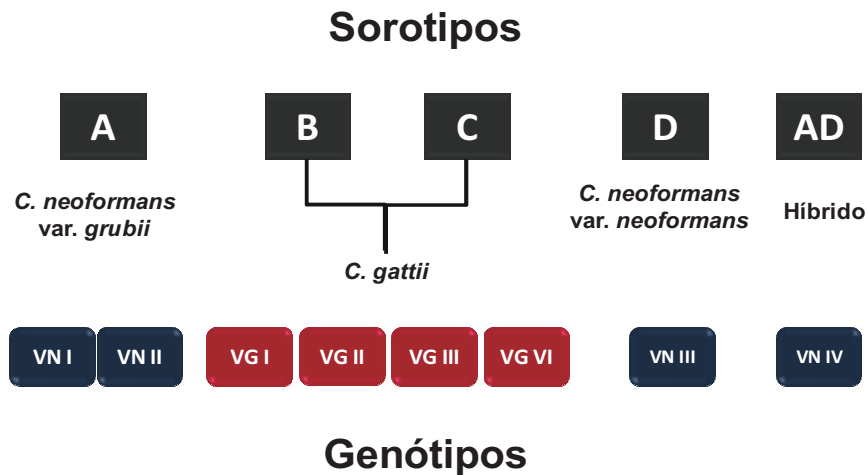


Figura 01. Esquema de classificação de *Cryptococcus* spp. quanto a espécie, sorotipos e genótipos.

1.1.2. Biologia

O *Cryptococcus* spp. apresenta duas fases de reprodução em seu ciclo de vida: assexuada e sexuada. A fase assexuada, ou anamórfica, é predominantemente haplóide, sendo encontrada nos tecidos de mamíferos, e a reprodução ocorre por formação de brotamento, quando a evaginação da célula mãe leva formação de um broto, correspondente a uma célula nova. Na fase sexuada, ou teleomórfica, a reprodução ocorre por acasalamento (“mating”), a qual ainda não foi identificada na natureza, embora o desenvolvimento sexual do fungo em plantas tenha sido demonstrado experimentalmente (LAZÉRA et al, 2004; XUE et al, 2007).

Experimentalmente a reprodução sexuada gera esporos sexuais ou basidiósporos, que são formas infectantes de 1,8 a 3 µm de diâmetros resultantes do cruzamento entre os tipos reprodutivos **a** e **α**, ou “**a**-mating type” (MAT**a**) e “**α**-mating type” (MAT**α**), regulados pelo locus gênico MAT (LIN et al, 2005, 2006). Esta região no genoma fúngico regula o ciclo sexual, desde a detecção do tipo reprodutivo até a produção e a sensibilidade a feromônios e posterior conjugação dos tubos, resultando na produção de basidiósporos (LENGELER, et al, 2002) (Figura 02).

As células MAT**a** produzem o feromônio MF**a**, devido a privação de nitrogênio, e em resposta a este feromônio as células MAT**α** formam um tubo de conjugação (CHANG et al, 2000). Por estímulo do feromônio MF**α**, induzido por condições de desnutrição celular, bem como pela presença de células MAT**a** (SHEN et al, 2002), as células MAT**a** ampliam drasticamente a formação de grandes células (clamidósporos), que podem fundir-se com os tubos de conjugação das células MAT**α** (CHANG et al, 2000) (Figura 02).

A hipótese sobre a cascata de eventos após a formação do tubo de conjugação pela célula MAT**α** é que o núcleo se divide e migra para este. Simultaneamente, o núcleo da célula MAT**a** se divide e a célula MAT**α** inicia a formação da hifa. As hifas dicarióticas são ligadas por fusão através de grampos de conexão. Um basídio é formado na ponta de hifas e, posteriormente, a cariogamia e meiose ocorrem dentro do basídio. Os quatro núcleos resultantes permanecem no basídio e repetem pós-meióticas mitoses formando quatro longas cadeias de esporos. Uma cadeia de esporos única pode conter tipos de esporos parietais, bem como recombinantes, indicando que os núcleos no basídio são distribuídos aleatoriamente e que a mitose destes núcleos ocorre aleatoriamente antes da formação dos esporos (MCCLELLAND et al, 2004) (Figura 02).

A reprodução por frutificação monocariótica envolve apenas um tipo sexual, que por endoduplicação ou por fusão nuclear, tornam-se diplóides e, em seguida, fundem seus núcleos, havendo assim formação do basídio, e por mitoses pós-meióticas ocorre a formação de quatro cadeias de basidiósporos. A frutificação monocariótica é predominantemente observada em isolados do tipo sexual MAT**α**, explicando sua maior

fertilidade e, portanto, maior abundância deste tipo na natureza (WICKES et al, 1996; CAMPBELL et al, 2006; LIN; HEITMAN, 2006) (Figura 02).

As espécies *C. gattii* e *C. neoformans* diferem em tamanho e forma dos seus basidiósporos na sua fase teleomórfica: o *Filobasidiella neoformans* (*C. neoformans*) produz basidiósporos esféricos, enquanto que *F. basillispora* (*C. gattii*) são compridos, em forma bacilar (KWON-CHUNG, 1975; 1976a; 1976b).

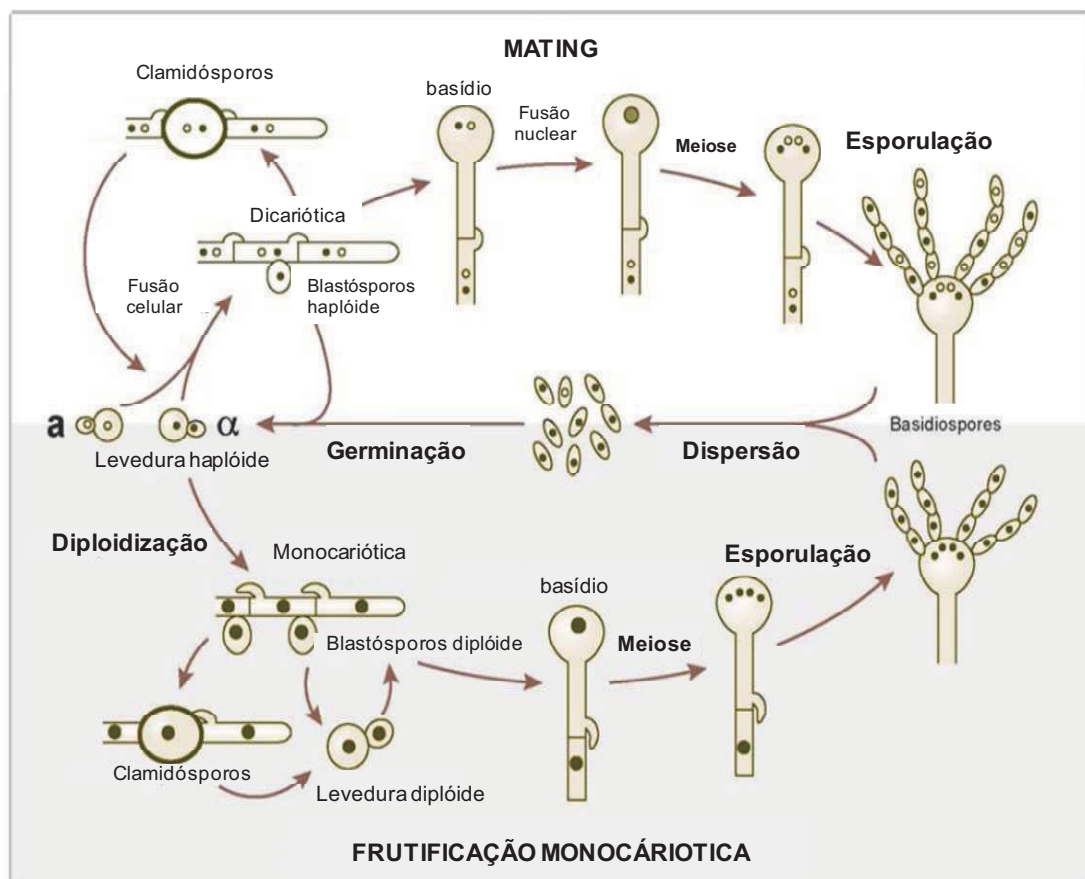


Figura 02. Ciclo de vida de *Cryptococcus* spp. Fonte: LIN; HEITMAN, 2006.

O MAT α é o tipo sexual predominantemente encontrado em isolados clínicos e laboratoriais, sendo mais virulentos e mais associados a penetração no sistema nervoso central (SNC) em experimentos de co-infecção, quando comparados com isolados MAT α congênicos em modelos animais. Esses achados definem o MAT α como um fator de virulência para *Cryptococcus* spp. (KWON-CHUN et al, 1978; 1992; NIELSEN et al, 2005).

1.1.3. Fatores de virulência

Atualmente os esforços no campo da microbiologia, genética e biologia molecular de doenças infecciosas estão voltados para a caracterização de determinantes de virulência, isto é, características requeridas para a patogenicidade, mas não essenciais para a viabilidade e proliferação do microrganismo.

A patogenicidade está relacionada à habilidade do microrganismo em estabelecer infecção no hospedeiro. A evolução desse processo é resultante da interação entre os determinantes de virulência do agente infeccioso e as defesas do hospedeiro, que, se forem adequadas, o microrganismo poderá ser eliminado ou conviver em aparente harmonia, na ausência de sintomatologia, por prolongado período de tempo. Caso contrário, o processo infeccioso leva a alterações nocivas, estabelecendo-se uma relação de parasitismo (MENDES-GIANINI et al, 1997).

Vários são os fatores de virulência que contribuem para a patogenicidade dos *Cryptococcus* spp. Os mais frequentemente citados na literatura são: a habilidade de crescimento a 37 °C, a capacidade de resistir ao dano oxidativo do hospedeiro, o desenvolvimento de cápsula polissacarídica, bem como a produção de enzimas como urease, fosfolipase e proteinase (BUCHANAN; MURPHY 1998; COX et al, 2001).

A capacidade de crescer a 37°C é um simples e intuitivo fenótipo óbvio para qualquer patógeno invasivo em mamíferos. No reino Fungi existem mais de 20.000 diferentes espécies de fungos, no entanto, pouco menos de duas dezenas podem causar doenças no homem. Estes fungos patogênicos desenvolveram ferramentas moleculares para sobreviver na temperatura corpórea do hospedeiro, enquanto fungos não patogênicos raramente possuem essa capacidade inata (MARTINEZ et al, 2001).

Para sobreviver a tais condições de stress, a levedura deve produzir a enzima calcineurina, uma fosfatase serina-treonina específica, que é ativada pelo aumento de cálcio (Ca^{2+}) intracelular e calmodulina por estímulos ainda desconhecidos (ODOM et al, 1997; DEL AGUILA et al, 2003). A calcineurina por sua vez ativada desfosforila proteínas específicas necessárias para a sobrevivência do patógeno. Mutantes não produtores de calcineurina não são patogênicos para organismos imunodeprimidos e possuem apenas habilidade de crescer a 24°C, não sobrevivendo a condições semelhantes as do hospedeiro (ODOM et al, 1997).

O fator de virulência mais significativo dos *Cryptococcus* spp. é a cápsula polissacarídica que envolve a parede celular e que tem múltiplos efeitos sobre o sistema imune do hospedeiro. Esta contém majoritariamente glucuronoxilomanana (GXM), cerca de 90% da massa capsular, sendo composta por uma cadeia não ramificada de resíduos de α 1,3-manose ligados a grupos laterais de xilosil e b-glucuronil e constituída minoritariamente

por galactoxilomanana (GalXM) (CHERNIAK et al, 1998). A estrutura capsular de *Cryptococcus* spp. proporciona uma barreira física contra a fagocitose e, por consequência, diminui a apresentação de antígenos pelas células T, reduzindo a resposta imune do hospedeiro (COLLINS; BANCROFT, 1991), pela inibição da produção de citosinas pró-inflamatórias e depleção de componentes do complemento, além de reduzir a migração de leucócitos para o sítio de inflamação (NASLUND et al, 1995; VECCHIARELLI et al, 1995).

A produção de melanina pelo *Cryptococcus* spp. também é associada com a virulência, na qual o pigmento depositado na parede celular confere proteção contra os mecanismos de resposta do hospedeiro, como fagocitose mediada por anticorpos, por danos causados por radicais reativos de oxigênio produzidos por macrófagos, além daqueles causados pela luz ultra-violeta devido sua ação antioxidante (JACOBSON; TINNELL, 1993; WANG, et al, 1995). A síntese de melanina é catalisada pela enzima fenoxidase (lacase) a partir de precursores do catecol como a L-Dopa (Levodopa) (POLACHECK et al, 1982). Estruturalmente, as melaninas são moléculas polianiónicas que contêm populações estáveis de radicais livres orgânicos, conferindo a levedura uma superfície fortemente eletronegativa que causa repulsão eletrostática entre a célula fúngica e as células do sistema imunológico carregadas negativamente dificultando, assim, a interação célula-célula requerida para a depuração do sistema imune (NOSANCHUK; CASADEVALL, 1997).

O pigmento melanínico também confere possibilidade de ligação a medicamentos e a substâncias químicas como aminas orgânicas e hidrocarbonetos policíclicos conferindo uma provável proteção contra os efeitos da anfotericina B (LARSSON, 1993). Wang e Casadevall (1994), não encontraram resultados significativos que apoiassem a hipótese de que a melanização de células dos *Cryptococcus* spp. em meio contendo L-Dopa pudesse diminuir a susceptibilidade a anfotericina B. Porém, sugerem que a melanina pode conferir proteção frente à anfotericina B, ou pela ligação à droga, ou por redução de permeabilidade da parede celular, e que, portanto, os resultados *in vivo* e *in vitro* frente à anfotericina B possam ser diferentes.

A urease é uma metaloenzima que catalisa a hidrólise de uréia em amônia e carbamato e, sob condições fisiológicas, essa reação resulta em aumento do pH. Alguns autores avaliando experimentalmente a urease como fator de virulência da criptococose, utilizando cepas produtoras e não produtoras da enzima em modelos animais demonstraram que a ausência de urease criptocócica resulta em proteção significativa devido à alta mortalidade observada em animais infectados por cepas produtoras desta metaloenzima (SHI et al, 2010). Os padrões encontrados no cérebro, baço e outros órgãos após a inoculação intravenosa da levedura indicam que a urease contribui para invasão do SNC, aumentando o sequestro das leveduras dos microcapilares durante a disseminação hematogênica. Já a inoculação direta no cérebro mostrou que este não é um fator que

contribua para o crescimento do microrganismo neste sítio, visto que o mesmo padrão foi encontrado para as cepas (COX et al, 2000; OLSZEWSKI et al, 2004).

O mecanismo pelo qual a produção de urease facilita a propagação do fungo no cérebro não é conhecido, mas pode envolver a produção de amônia local que influencia as interações com células endoteliais, causando aumento da adesão ou toxicidade. Essas tendências foram reduzidas em animais tratados com um inibidor da uréase, o flurofamide, indicando o potencial terapêutico do bloqueio transmigração (OLSZEWSKI et al, 2004; SHI et al, 2010).

O pigmento melanínico também confere possibilidade de ligação a medicamentos e a substâncias químicas como aminas orgânicas e hidrocarbonetos policíclicos conferindo uma provável proteção contra os efeitos da anfotericina B (LARSSON, 1993). Wang e Casadevall (1994), não encontraram resultados significativos que apoiassem a hipótese de que a melanização de células dos *Cryptococcus* spp. em meio contendo L-Dopa pudesse diminuir a susceptibilidade a anfotericina B. Porém, sugerem que a melanina pode conferir proteção frente à anfotericina B, ou pela ligação à droga, ou por redução de permeabilidade da parede celular, e que, portanto, os resultados *in vivo* e *in vitro* frente à anfotericina B possam ser diferentes.

A urease é uma metaloenzima que catalisa a hidrólise de uréia em amônia e carbamato e, sob condições fisiológicas, essa reação resulta em aumento do pH. Alguns autores avaliando experimentalmente a urease como fator de virulência da criptococose, utilizando cepas produtoras e não produtoras da enzima em modelos animais demonstraram que a ausência de urease criptocócica resulta em proteção significativa devido à alta mortalidade observada em animais infectados por cepas produtoras desta metaloenzima. Os padrões encontrados no cérebro, baço e outros órgãos após a inoculação intravenosa da levedura indicam que a urease contribui para invasão do SNC, aumentando o sequestro das leveduras dos microcapilares durante a disseminação hematogênica. Já a inoculação direta no cérebro mostrou que este não é um fator que contribua para o crescimento do microrganismo neste sítio, visto que o mesmo padrão foi encontrado para as cepas (COX et al, 2000; OLSZEWSKI et al, 2004).

O mecanismo pelo qual a produção de urease facilita a propagação do fungo no cérebro não é conhecido, mas pode envolver a produção de amônia local que influencia as interações com células endoteliais, causando aumento da adesão ou toxicidade. Essas tendências foram reduzidas em animais tratados com um inibidor da uréase, o flurofamide, indicando o potencial terapêutico do bloqueio transmigração (OLSZEWSKI et al, 2004; SHI et al, 2010).

1.1.4. Patogenia e ciclo da doença

A patogênese da criptococose é determinada por três grandes fatores: o estado das defesas do hospedeiro, a virulência do isolado de *Cryptococcus* sp., e o tamanho do inóculo. A importância destes três fatores como determinantes da infecção ativa ainda não foi totalmente esclarecida (MICHELL; PERFECT, 1995).

Um conceito fundamental na patogênese da criptococose está na importância da integridade das defesas do hospedeiro. Apoiado por uma suposição razoável relacionado à ampla distribuição de *Cryptococcus* spp. na natureza e a prevalência relativamente baixa de infecção sintomática, pode ser sugerido que a maioria dos indivíduos provavelmente são resistentes e apenas indivíduos com defesas imunes comprometidas estão propensos a desenvolver a doença. No entanto, indivíduos imunocompetentes apresentam a doença (MICHELL; PERFECT, 1995).

A infecção é adquirida após a inalação dos esporos da levedura no ambiente com subsequente infecção pulmonar. Na ausência de uma resposta imune efetiva, o fungo pode se disseminar até o cérebro causando a meningoencefalite (Figura 3) (LAZÉRA et al, 2004).

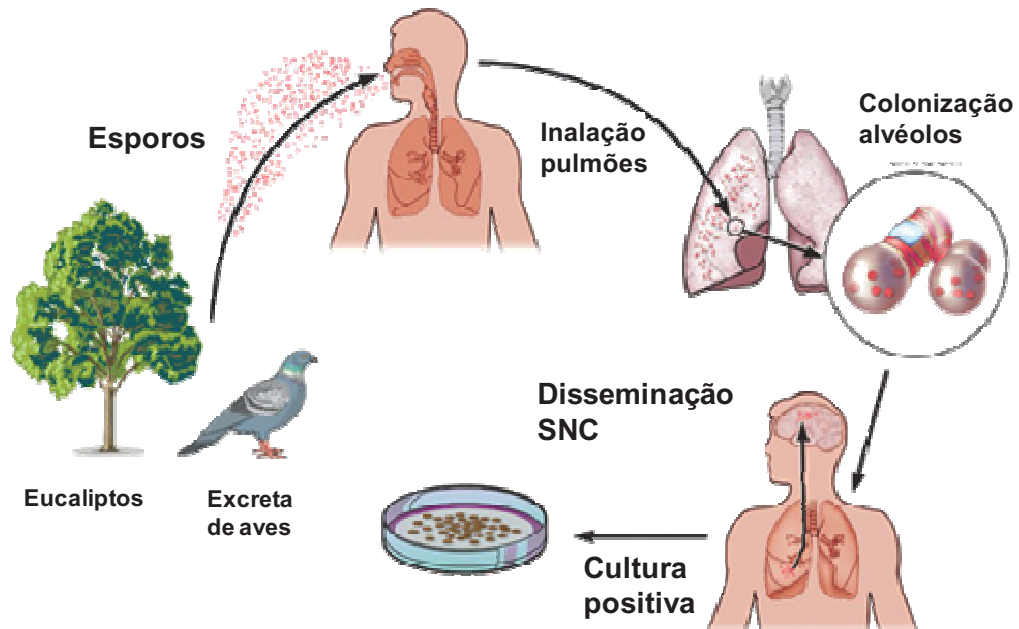


Figura 03. Patogênese da criptococose. Fonte: CRIPTOCOCOSE, 2009.

Para penetrar nos alvéolos pulmonares o fungo precisa produzir formas viáveis menores que 4 μm de diâmetro. A forma típica vegetativa de *Cryptococcus* spp. é a leveduriforme com um diâmetro celular de 4 a 10 μm (BOTSS et al, 2009; VELAGAPUDI et al, 2009), porém, essa levedura, através de reprodução sexuada, gera esporos sexuais ou

basidiósporos de 1,8 a 3 μm de diâmetro, que são as formas potencialmente infectantes (LIN; HEITMAN, 2006).

Para causar infecção em humanos, a levedura deve crescer a temperatura de 37°C, com uma atmosfera de cerca de 5% de CO_2 e com um pH entre 7,3 e 7,4. Para a adaptação em tais condições de stress, os isolados de *Cryptococcus* spp. ativam o mecanismo de produção da enzima calcinerina, responsável pela ativação de proteínas específicas necessárias para a sobrevivência do patógeno (ODOM et al, 1997).

Os esporos são facilmente fagocitados por macrófagos alveolares, que consistem na primeira linha de defesa inata celular, através do reconhecimento do Padrão Molecular Associados a Patógenos (PAMP), o β -(1,3)-glucano, presente na superfície dos esporos de *Cryptococcus* spp., pelo Receptor de Reconhecimento do Padrão do patógeno (PRR), a dectina 1 (GILES et al, 2009).

Os esporos rapidamente crescem e germinam dentro dos macrófagos, porém, a sobrevivência e proliferação celular somente são possíveis na ausência de ativação dos macrófagos pelo lipopolissacarídeo capsular e interferon- γ , sendo o resultado da infecção uma corrida entre a germinação dos esporos e a ativação da resposta imune inata (BOTTS; HULL, 2010)

Botts e Hull (2010) acreditam que a taxa de germinação de esporos podem diferir entre *C. neoformans* e *C. gattii*, o que pode levar a uma diferença da evasão inicial de morte por células fagocíticas, no reconhecimento de um hospedeiro imunocompetente ou imunocomprometido.

Após o estabelecimento inicial da infecção pulmonar, os isolados de *Cryptococcus* spp. tendem a se disseminar até atravessar a barreira hemato-encefálica (BHE) causando a meningoencefalite. Existem evidências que indicam que as células de *Cryptococcus* spp. possam atravessar a BHE por transcitose através da monocamada de células endoteliais no cérebro. Nesse processo o fungo é captado pelas células endoteliais e transmigra através do citoplasma sem afetar a sua integridade chegando ao cérebro, com a importante participação da enzima urease (CHANG et al, 2004; OLSZEWSK et al, 2004). Outro mecanismo sugerido é que as células fúngicas possam atravessar o endotélio pela estratégia de “Cavalo de Tróia”, utilizando monócitos como tal (CHARLIER et al, 2009).

A levedura consegue sobreviver ao ambiente do fagossomo e inicia sua proliferação dentro deste, sendo sugerido que possam ocorrer alterações nas propriedades da membrana do fagossomo pela modulação da dinâmica da actina, evitando a morte da célula hospedeira, que desencadearia a resposta inflamatória, garantindo, assim, sua expulsão por mecanismo não destrutivo, independente da maturação do fagossomo e em condições oportunas (MA et al, 2006; JOHNSTON; MAY, 2010).

A depender dos estímulos encontrados, as células fúngicas podem alargar sua cápsula formando células gigantes durante a infecção. Essas células gigantes medem cerca de 40 a 50 μm de diâmetro, e fazem parte do mecanismo físico de evasão da resposta imune do hospedeiro, estabelecendo a infecção nos pulmões ou prolongando sua sobrevivência no hospedeiro, podendo ser encontradas em infecções crônicas ou em portadores. No entanto, essa alteração morfológica confere menor poder de penetração no sistema nervoso (OKAGAKI et al, 2010; ZARAGOZA et al, 2003).

O aumento na ploidia (conjunto de cromossomos de um organismo) resultado da endoreplicação e da formação de células gigantes indica que consideráveis mudanças ocorrem no genoma dessa levedura durante a infecção. Essa variável pode influenciar a virulência em vários níveis, incluindo resistência à resposta imune, progressão da doença, disseminação e latência (KRONSATAD et al, 2011). Isso porque alterações na ploidia, incluindo aneuploidia, são conhecidas por influenciar o crescimento, a expressão gênica e a sensibilidade a drogas antifúngicas em outros fungos (GALITSKI et al, 1999; TORRES et al, 2007; SIONOV et al, 2010). Mudanças no cariótipo têm sido documentadas em amostras sequenciais de pacientes e essas alterações incluem rearranjo cromossômico e deleções (FRIES et al, 1996).

Estudos recentes relacionam a dissomia com o fenômeno de heteroresistência a drogas azólicas, demonstrando que tanto isolados de *Cryptococcus* da espécie *neoformans* quanto *gattii* exibem esta característica inata que confere resistência adaptativa e reversível a azóis, após exposições a crescentes concentrações da droga (SIONOV et al, 2009; VARMA; KWON-CHUNG, 2010). Uma análise comparativa do genoma de *Cryptococcus* spp. após exposições crescentes de fluconazol mostrou que a resistência a droga foi associada à dissomia de múltiplos cromossomos, principalmente ao cromossomo 1, que carrega os genes envolvidos na resistência a azóis (AFR1 e ERG11) (SIONOV et al, 2010).

1.2. Criptococose

1.2.1. Epidemiologia

Antes da epidemia da SIDA, a incidência de criptococose nos EUA era inferior a um caso por um milhão de pessoas por ano. Na década de 80, a criptococose emergiu como uma importante infecção oportunista entre pessoas com HIV, ocorrendo em 5-10% dos doentes com SIDA nos EUA, Europa e Austrália. Com o crescente uso de fluconazol para candidíase oral e o advento da terapia antiretroviral altamente ativa (HAART - Highly Active Antiretroviral Therapy), na década de 90, a incidência anual da doença diminuiu acentuadamente nos países desenvolvidos, que pode ser ilustrado pela diminuição de casos

em Atlanta, EUA que diminuiu de 66 casos por 1000 doentes com SIDA em 1993 para sete casos por 1000 em 2000 (MIRZA et al, 2003).

Desde o início da epidemia até junho de 2010, o Ministério da Saúde (MS) registrou 592.914 casos de SIDA no Brasil, sendo 38.538 casos notificados no ano de 2009, com a taxa de incidência neste ano de 20,1 casos por 100 mil habitantes. No período compreendido entre 1999 a 2009 a taxa de incidência diminuiu na região no Sudeste de 24,9 para 20,4 casos por 100 mil habitantes. No entanto, nas outras regiões do país esta cresceu: de 22,6 para 32,4 no Sul; de 11,6 para 18,0 no Centro-Oeste; de 6,4 para 13,9 no Nordeste e 6,7 para 20,1 no Norte (MINISTÉRIO DA SAUDE DO BRASIL, 2002).

Segundo o MS a criptococose não é doença de notificação compulsória, contudo há recomendação de que a investigação desta deva ser associada à imunodeficiência. Durante o período entre 1980 e 2002, 6% das infecções oportunistas associadas à SIDA foram causadas por *Cryptococcus* spp (MINISTÉRIO DA SAUDE DO BRASIL, 2002). Na Bahia, DARZÉ e colaboradores (2000) avaliando 104 prontuários de pacientes com criptococose, no período de 1972 a 1996, mostraram uma taxa de letalidade de 42,7%.

Atualmente estima-se que *Cryptococcus* spp. cause cerca de um milhão de casos de meningite por ano em pacientes com SIDA no mundo, levando a aproximadamente a 625.000 mortes e que destas, 504.000 ocorram na África subsaariana, onde é observada o maior número de casos da doença no mundo, com 720.000 casos por ano. Na América Latina estima-se que ocorram 54.400 casos da doença, com 29.900 mortes associadas (PARK et al, 2009).

A meningite criptocócica é a infecção oportunista mais comum, definidora de infecção pelo HIV em pacientes em fase tardia da doença, particularmente no sudeste asiático, sul e leste africanos (HOLMES et al, 2003; CHARİYALERTSAK et al, 2001). Esta doença é a quarta causa de morte na África subsaariana, matando mais do que a tuberculose (PARK et al, 2009).

Em pacientes com SIDA, a taxa de mortalidade global pela infecção criptocócica tem variado 9 a 31%, e está relacionada, com o atraso no início da terapia antifúngica ou a inadequação na combinação das drogas antifúngicas e as complicações oriundas do aumento da pressão intracraniana (ROBINSON et al, 1999; PAPAS et al, 2001; LEE et al, 2011). A morte em pacientes imunocompetentes varia de 4 a 27% e é devido em grande parte ao atraso no início da terapia antifúngica após o diagnóstico da doença (MICHELL et al, 1995; SHIH et al, 2000; KIERTIBURANAKUL et al, 2006; LEE et al, 2011).

O *C. neoformans* tem uma distribuição global, sendo isolado de muitas fontes ambientais, tais como excretas de aves, principalmente de pombos, bem como na matéria orgânica vegetal em decomposição e ocos de árvores (GRANADOS; CASTANEDA, 2005) e afetam principalmente pacientes imunodeprimidos (SPEED et al, 1995).

Na última década *C. gattii* foi causa rara de criptococose em humanos e animais, causando doença predominantemente em indivíduos sem imunodepressão, restrito a regiões tropicais e subtropicais da África, América do Sul e Austrália, estando associado a árvores do gênero *Eucalyptus* spp. (SPEED et al, 1995; SORRELL et al, 1996). Recentemente observou-se uma alteração nesse padrão, por um surto sem precedente, relatado em zona de clima temperado, na Ilha de Vancouver, Canadá, infectando tanto indivíduos imunocomprometidos quanto imunocompetentes, emergindo assim, como importante patógeno (KIDD et al, 2004).

Especificamente, durante o surto acima citado, foram reportados mais de 240 casos de criptococose em humanos, a maioria imunocompetentes, e em centenas de animais, com 19 casos fatais em humanos apesar da terapia antifúngica agressiva (GALANIS; MACDOUGALL, 2010). O surto já se espalhou pelo continente até a região do Pacífico no noroeste dos Estados Unidos (DATTA et al, 2009). O aumento da incidência de criptococose em zona de clima temperado sugere uma mudança adaptativa na ecologia desse patógeno (D´SOUZA et al, 2011).

O agente causal do surto ocorrido na ilha de Vancouver, Canadá, foi o *C. gattii*, predominantemente pertencente ao genótipo VGII do tipo sexual MAT α (KIDD et al, 2004), este foi caracterizado como altamente fértil e virulento, quando comparado com isolados de *C. gattii* VGII de outras partes do mundo (BYRNES et al, 2010).

A distribuição global dos tipos moleculares do complexo *C. neoformans* - *C. gattii*, mostra predomínio de VNI, sendo o mais frequentemente isolado nas Américas (Norte (41%); Central (78%); e Sul (64%)), África (72,6%), Europa (45%) e Ásia (77%). A distribuição de isolados de *C. gattii* é predominantemente mais frequente para os tipos VGI e VGII. O VGI é o tipo mais isolado na Oceania (43%), e o segundo mais isolado na Ásia (15%). O tipo VGII é o segundo mais comum nas Américas, com 26% na América do Norte, 21% na América do Sul e 11% na América Central (MEYER; TRILLES, 2010).

Na América Latina, o Grupo Ibero-americano de estudos em Criptococose, caracterizou a maioria dos isolados clínicos pertencentes ao genótipo VNI (68,2%), genótipo responsável pelo maior número de casos de criptococose no mundo, seguido em menor percentual pelo VNII, como 5,6%, VNIII, com 4,1% e VNIV com 1,8%. Para os isolados de *C. gattii*, o maior percentual foi observado para o genótipo VGIII (9,1%), seguido do VGII (6,2%), VGI (3,5%) e VGIV (1,5%) (MEYER et al, 2003).

1.2.2. Aspectos clínicos

Cryptococcus spp. pode infectar qualquer órgão do corpo, mas tem uma predileção pelo pulmão e sistema nervoso central. O pulmão é a porta de entrada e os sintomas da

doença variam desde a colonização até a pneumonia grave (BICANIC et al, 2005), sendo que em imunocompetentes com infecção pulmonar os sintomas da criptococose mais comuns são tosse e dor torácica (PAPAS et al, 2001; NADROUS et al, 2003). Os achados pulmonares são, muitas vezes, subvalorizados em pacientes com SIDA, visto que a doença é sintomaticamente dominada pelo comprometimento do SNC (PAPAS et al, 2001).

No único inquérito realizado na Bahia, Darzé e colaboradores (2000), analisando 104 prontuários, encontraram uma média de 27,6 dias entre o início da sintomatologia e o diagnóstico, sendo os sintomas mais freqüentes a cefaléia, seguido de febre e rigidez de nuca.

Os achados clínicos da criptococose são dependentes da condição imune do hospedeiro. A infecção pulmonar é incomum em pacientes com SIDA e frequente em imunocompetentes, e reciprocamente a meningite é mais frequente em pacientes com SIDA, ocorrendo em cerca de 90% dos casos, e menos comum imunocompetentes (30 a 40%) (CHEN, S. et al, 2000; CHEN, Y. et al, 2000).

Na criptococose há uma distinta associação entre o estado imune do hospedeiro e a espécie envolvida; a infecção predominantemente ocorre por *C. gattii* em indivíduos sem imunodepressão e *C. neoformans* em hospedeiros imunocomprometidos (SPEDD; DUNT, 1995; CHEN, S. et al, 2000; CHEN, Y. et al, 2000). Clinicamente, existem também diferenças no curso da infecção. A infecção pelo *C. gattii* resulta em uma alta incidência de granulomas e complicações neurológicas e, muitas vezes, necessita de tratamento prolongado com medicamentos antifúngicos em comparação com aquelas causadas por *C. neoformans* (CHEN, S. et al, 2000; SORREL, 2001). Em pacientes imunocompetentes a formação de criptococomas nos pulmões é 10 vezes mais comum e no cérebro três vezes mais comum do que em pacientes com SIDA, consistente com a resposta imune do hospedeiro visando à contenção da infecção (CHEN, S. et al, 2000).

A meningite, manifestação mais frequente da criptococose, é uma infecção oportunista comum em pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), porém, também, ocorre em pacientes com outras formas de imunossupressão, que inclui o uso de corticosteróides, transplantes de órgãos, leucemias crônicas, linfomas e sarcoidose (MITCHELL et al, 1995; PAPAS et al, 2001).

A manifestação clínica inicial da doença pode durar um mês e envolve cefaléia, febre, alteração do estado mental e vômito, não apresentando diferenças entre pacientes com SIDA e imunocompetentes (LEE et al, 2011). A complicação mais comum é o aumento da pressão intracraniana, que na ausência de dilatação ventricular pode causar perda visual ou auditiva. Menos comumente, os pacientes podem desenvolver imparidade cognitiva e ataxia de marcha devido à hidrocefalia obstrutiva com dilatação ventricular (LEE et al, 2011).

A doença é mais comum em jovens do sexo masculino, população de maior frequência entre o grupo com SIDA. Em pacientes com SIDA, a meningite está associada à imunossupressão profunda, geralmente ocorrendo em contagens de CD4 <100 células/mL. Há uma maior probabilidade de envolvimento fora do SNC e recaída se a terapêutica antifúngica é interrompida antes da eficácia da terapia anti-retroviral. Comparado com os pacientes imunocompetentes, a infecção em pacientes com SIDA tende a uma apresentação mais aguda, com maior envolvimento extraneural e está associada com maiores títulos de antígeno criptocócico no soro e uma pobre resposta inflamatória no líquido (LEE et al, 2011).

1.2.3. Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico da criptococose nem sempre é fácil, principalmente pelas diferentes formas de apresentação da doença. Os espécimes clínicos na maioria das vezes correspondem ao provável sítio de infecção, sendo os mais frequentes: líquido, sangue, secreções do trato respiratório, urina e amostras de tecidos. O diagnóstico laboratorial da criptococose pode ser dado pelo encontro da levedura em exame direto em espécimes clínicos, pelo crescimento em cultura ou pela detecção de antígenos capsulares no soro ou líquido (LACAZ et al, 2002).

Quanto às características do líquido, em geral a contagem de leucócitos é elevada, com predomínio de linfócitos, nos casos de infecção não-associadas a SIDA; porém nos casos de SIDA a contagem pode ser menor ou até se apresentar normal. A taxa protéica é geralmente elevada e a taxa de glicose baixa. A pesquisa direta do patógeno em amostras de líquido é realizada por coloração negativa com tinta da China. A sensibilidade do exame é de 70 a 90% em pacientes infectados pelo HIV e em torno de 50% para aqueles não infectados pelo HIV (BICNIC; HARRISON, 2005).

A pesquisa de anticorpos para *C. neoformans* não são úteis no diagnóstico da doença, porém durante a infecção a detecção de antígenos polissacarídicos em fluidos corporais através de testes rápidos e simples, como de aglutinação em látex ou ensaio imuno-enzimático possuem sensibilidade de até 95% para títulos >1:4 (MICHELL; PERFECT, 1995). Em pacientes portadores pelo HIV, a pesquisa de antígenos pode identificar a forma precoce da doença, requerendo exame do líquido e posterior tratamento (FELDMESSER et al, 1996). Títulos altos no líquido ($\geq 1: 1024$) correlacionam-se com carga alta do microrganismo, bem como marcador de mal prognóstico da doença, por outro lado decréscimo destes indica sucesso terapêutico; porém, a titulação possui valor limitado, não podendo ser utilizada como critério de cura (LU et al, 2005; ANTINORI et al, 2005).

O diagnóstico por detecção de antígeno possui sensibilidade superior (95%) em relação aos exames de cultura (75%) e direto com tinta da China (50%). A maioria dos resultados falsos positivos é causada pelo fator reumatóide, que pode ser eliminado com pré-tratamentos da amostra por enzimas proteolíticas, beta-mercaptoetanol ou por diluições com EDTA (ENG; PERSON, 1981; WHITTIER et al, 1994; STOCKMAN; ROBERTS, 1982; ENGLER; SHEA, 1994). Outras causas de resultados falsos positivos são as reações cruzadas descritas para *Trichosporon beigelii* e outros microrganismos, bem como a contaminação laboratorial (MCMANUS; JONES, 1995; HEELAN et al, 1991; MELCHER et al, 1991). Os resultados falsos negativos, embora menos freqüentes, são bem documentados e pode ocorrer por baixa concentração do antígeno, presença de prozona, infecção por isolados não capsulados ou pela presença de imunocomplexos (HAMILTON et al, 1991; CURRIE et al, 1993).

O diagnóstico pelo exame direto é realizado por preparações de tinta da China, uma coloração negativa, que permite a visualização de leveduras redondas encapsuladas sugestivas do gênero *Cryptococcus* spp. A identificação histopatológica é também baseada nas características micromorfológicas da levedura e inclui técnicas de coloração histoquímicas como hematoxina-eosina e Grocott, bem como técnicas especiais como Mucicarmina de Mayer, que cora a cápsula de magenta e Fontana-Masson, que cora a melanina fúngica de marrom avermelhado (ARTAL, 2004; GAZZONI et al, 2008). Em cortes histológicos, as leveduras encapsuladas de *Cryptococcus* spp. parecem estar rodeadas por grandes espaços vazios, por causa da fraca coloração da cápsula e pela distorção resultante do corte (MICHELL; PERFECT, 1995).

Segundo a classificação de Schuwartz, a reação histopatológica da criptococose pode ser dividida em duas categorias baseadas na reação tecidual. A categoria reativa, que resulta de resposta imune celular ativa, apresenta intensa resposta inflamatória, com presença de macrófagos, células gigantes multinucleadas, linfócitos e as leveduras são encontradas fagocitadas. A categoria paucireativa, indica falta de capacidade do hospedeiro em desencadear resposta inflamatória, onde se observa mínima ou ausência de resposta inflamatória, as células leveduriformes são extracelulares; destruindo a arquitetura tecidual (SCHWARTZ et al, 1982; GAZZONI et al, 2008).

Para o cultivo e isolamento da levedura utiliza-se o meio de ágar Saboraud sem cicloheximida, visto que o microrganismo é sensível a esta droga, ou meios diferenciais como ágar níger, cenoura, L-Dopa e outros que contenham ácido caféico ou compostos di ou polifenólicos, substrato para a enzima fenol-oxidase, que produz colônias com pigmento melanínico, facilitando o reconhecimento de *Cryptococcus* spp. principalmente em amostras não estéreis, tais como escarro e urina (LACAZ et al, 2002).

O aspecto macroscópico das colônias, em ágar Sabouraud, incubado a 25 ou 30°C, em dois a quatro dias, são brilhantes, tipicamente brancas a castanhas, podendo ser amarelas, rosa-claro ou marrom-claro. Se o organismo for capsulado, as colônias apresentam-se mucóides e brilhantes, tomando o aspecto de “leite condensado”. No entanto, podem tornar-se secas e opacas com tempo. A morfologia microscópica revela leveduras arredondadas ou ovais, isoladas ou aos pares, de paredes finas e de tamanhos variados, não ocorrendo pseudo-hifas e hifas verdadeiras. O brotamento pode ser simples ou duplo, com pontos de ligação estreitos entre as células-mãe e filha. As células são, usualmente, envoltas por cápsulas, que variam em espessura, especialmente em preparações feitas diretamente a partir de amostras clínicas (FISHER; COOK, 2001, p.210).

Bioquimicamente, todas as espécies do gênero *Cryptococcus* são não-fermentadoras de carboidratos e a maioria dos isolados produzem as enzimas urease e fenol-oxidase. Diferente das outras espécies, *C. neoformans* e *C. gattii* possuem habilidade de crescer a temperatura de 37°C e diferem entre si pela resistência natural do *C. gattii* a presença de L-canavanina. O teste de Canavanina-Glicina-azul de Bromotimol (CGB) explora essa característica, separando as duas espécies, sendo o crescimento e aparecimento de coloração azul cobalto caracterizado como prova positiva e indicativa da identificação do *C. gattii* (KWON-CHUNG et al, 1982). Outra característica bioquímica que diferencia as espécies é a inibição da enzima urease pelo EDTA nos isolados de *C. gattii*, sendo, portanto a prova da urease acrescida de EDTA sendo positiva para os isolados de *C. neoformans* (KWON-CHUNG, 1987).

1.2.4. Tratamento

Em 2000, a Sociedade Americana de Doenças Infecciosas publicou o primeiro guia para manejo da doença criptocócica e, em 2010, disponibilizou a atualização desse documento, trazendo recomendações para o tratamento da criptococose. O esquema sugerido para o tratamento da meningite criptocócica em pacientes HIV-infectados é dividido em fases. A terapia primária ou de indução e a de consolidação consistem na administração de anfotericina B mais 5-flucitosina por duas semanas, seguida de fluconazol por, no mínimo, oito semanas. Na fase supressiva ou de manutenção, bem como na terapia profilática é indicado o uso de fluconazol ou itraconazol (PERFECT et al, 2010).

A profilaxia antifúngica primária para criptococose não é recomendada rotineiramente para pacientes com SIDA nos Estados Unidos e na Europa, porém existe evidência moderada para sua utilização em áreas onde a HAART não está disponível, com elevados níveis de resistência a drogas antiretrovirais e onde há aumento da incidência da doença, bem como na estratégia preventiva para pacientes com antigenemia assintomática (PERFECT et al, 2010).

O tratamento para pacientes imunocompetentes consiste também em uma terapia inicial de indução com uso de anfotericina B e 5-flucitosina por quatro semanas para pacientes sem complicação neurológica, cuja cultura de líquido é negativa. Após duas

semanas de tratamento, é sugerida a substituição pela formulação lipídica de anfotericina B por mais duas semanas. Já em pacientes com complicações neurológicas, deve-se considerar o prolongamento da terapia de indução por seis semanas, utilizando a formulação lipídica de anfotericina B nas quatro últimas semanas. Após a indução, a consolidação com fluconazol é iniciada por oito semanas, seguida da terapia de manutenção com fluconazol, ou outro antifúngico azólico, como o itraconazol, por seis a doze meses (PERFECT et al, 2010).

Na persistência da doença o esquema acima citado é alterado a depender do caso, com ajuste de doses. Na recidiva, comum em pacientes com meningite por *C. gattii*, é sugerido o reinício da terapia de indução. Para ambas as situações são recomendadas a avaliação *in vitro* da susceptibilidade aos antifúngicos para verificar alterações na Concentração Inibitória Mínima (CIM) do isolado original. Uma diferença de três ou mais vezes da CIM sugere desenvolvimento de resistência, devendo ser considerado o uso de agentes antifúngicos alternativos (PFALLER et al, 2010; REX; PFALLER, 2002).

1.3. Testes de susceptibilidade antifúngica

O crescente número de infecções fúngicas invasivas e a introdução constante de novos medicamentos, bem como o aumento de micro-organismos resistentes, estimularam o interesse e a necessidade clínica de testes de avaliação de sensibilidade (ARIKAN et al, 2000; REX et al., 2001).

O desenvolvimento de testes de susceptibilidade foi objeto de diversos trabalhos na última década. O “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI) disponibiliza método de referência para determinação de sensibilidade antifúngica de leveduras no documento M27-A3, que se baseia em macro ou microdiluição em caldo (CLSI, 2008). Testes baseados em difusão em ágar, como disco difusão e E-test, têm sido o foco de interesse de alguns pesquisadores, por serem atrativos pela simplicidade de execução, reprodutibilidade e por não requererem equipamentos para sua execução e leitura (REX et al, 2001; LASS-FLORL et al, 2010).

A realização de testes de susceptibilidade é indicada para estudos de vigilância epidemiológica, com objetivo de conhecer os perfis de susceptibilidade e resistência; determinar o nível de resistência frente a novos compostos com atividade antifúngica e prever a resposta clínica, além de otimizar a terapia de pacientes hospitalizados que não respondem ao tratamento, e que apresentam infecções fúngicas invasivas ou por isolados com elevada taxa de resistência a antifúngicos (REX et al, 2001; PAREDES, 2009)

Métodos de diluição em caldo constituem o padrão ouro para determinação de susceptibilidade *in vitro*, tanto para leveduras quanto para fungos filamentosos. A resistência

antifúngica é usualmente quantificada usando a CIM, na qual o crescimento do micro-organismo na presença de uma faixa de concentrações da droga é mensurado após um período de tempo definido de acordo com protocolo padrão. A menor concentração da droga que resulta em significativa redução ou completa ausência de crescimento do micro-organismo é definida como a CIM (CLSI, 2008).

Atualmente, duas metodologias internacionais estão disponíveis para determinar a susceptibilidade de fungos a agentes antifúngicos estão disponíveis. A primeira foi publicada pelo CLSI e a segunda desenvolvida pelo subcomitê de testes de susceptibilidade antifúngica do “European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing” (EUCAST). Ambos apresentam alta reprodutibilidade entre laboratórios, diferenciando populações com altos e baixos valores de CIM para drogas antifúngicas. Essas metodologias diferem quanto ao inóculo, meio e critérios de leitura dos testes, sugerindo que os pontos de corte do CLSI não podem ser extrapolados para o método EUCAST e vice-versa (CLSI, 2008; EUCAST, 2008).

As desvantagens dos testes baseados em microdiluição são: a necessidade de longo período de tempo para determinar os resultados (24 a 72 horas); falha na detecção de isolados resistentes para alguns antifúngicos; ausência de pontos de corte para combinações de microrganismo x droga; difícil interpretação de leitura para isolados que apresentam efeito “trailing”; além de serem trabalhosos, requererem pessoal qualificado, infra-estrutura mais complexas e custo elevado (ARIKAN, 2007; PAREDES, 2009).

Os métodos disponíveis para avaliação da susceptibilidade por difusão em ágar são o disco difusão e o método E-test. O método E-test é um método comercial, que consiste em uma fita plástica impregnada com concentrações crescentes da droga a qual é dispensada em uma placa de ágar inoculada com o micro-organismo teste onde, após o período de incubação, ocorre a formação de uma elipse e a CIM é determinada a partir do ponto de inserção da zona de inibição do crescimento microbiano na fita.

O método de disco difusão é considerado simples, econômico e conveniente para a implantação na rotina laboratorial, visto que já é bem estabelecido em laboratórios de microbiologia para avaliar sensibilidade bacteriana. O CLSI traz no Documento M44-A3 padronização para avaliação de sensibilidade de leveduras por essa metodologia, com interpretação para azóis, fluconazol, posaconazol e voriconazol e para a equinocandina caspofungina, porém, é apenas validado para leveduras do gênero *Candida* spp (CLSI, 2009).

Diversos trabalhos avaliando a correlação entre as metodologias de disco difusão e microdiluição em caldo, mostram excelente concordância entre os resultados, para diversos antifúngicos (MATAR et al, 2003; BARRY et al, 2002; PFALLER et al, 2004; ESPINELL-INGROFF et al, 2007). Esse método mostrou acurácia e precisão quando comparado com a

técnica padrão para avaliação da susceptibilidade de leveduras, entretanto, são necessárias avaliações de pontos de corte para antifúngicos ainda não padronizados pelo CLSI, bem como avaliações com um maior número de isolados resistentes (BARRY et al, 2002; PFALLER et al, 2004).

1.4. Resistência antifúngica dos *Cryptococcus* spp.

O termo resistência é utilizado para descrever relativa insensibilidade de um microrganismo a uma droga antimicrobiana avaliada *in vitro* quando comparado com outros isolados da mesma espécie. Falha terapêutica se refere ao fracasso de uma terapêutica adequada para uma determinada indicação clínica. As razões para tal podem ser a resistência antifúngica, função imune comprometida, baixa biodisponibilidade ou metabolismo acelerado da droga (REX et al, 1997).

A resistência primária ou intrínseca ocorre em microrganismos nunca antes expostos a droga de interesse e, em *Cryptococcus* spp., esse tipo de resistência é observado frente a drogas da classe das equinocandinas, visto que a constituição de sua parede celular contém polissacarídeos α -glucana ao invés de polissacarídeos β -glucana, sítio alvo das equinocandinas (MESSER et al, 2004). Já a secundária, referente à aquisição de resistência, surge após a exposição do organismo à droga. A resistência secundária em isolados de *Cryptococcus* spp. é incomum para drogas padrão como polienos, azóis e 5-flucitosina, entretanto, é maior frente aos azóis (REX et al, 1997).

Os mecanismos de resistência a azóis descritos para leveduras incluem alteração de afinidade pela P450 lanosterol 14 α -desmetilase, sítio alvo deste antifúngico, devido a mutações no gene ERG11, que se relacionam com baixo nível de resistência a fluconazol em *Cryptococcus* spp. e hiper-expressão de bombas de efluxo que diminuem o acúmulo dessas drogas intracelular, e estão associado com alto nível de resistência (PFALLER et al, 2009; SANGLARD et al, 1998; VENKATESWARLU et al, 1997; LAMB et al, 1995).

Outro mecanismo, ainda não elucidado, é a heteroresistência a azóis. Alguns autores supõem que a dissomia do cromossomo 1, que carrega os genes ERG11 e AFR1, se relaciona com este fenômeno (SIONOV et al, 2010). A heteroresistência é definida como a habilidade de uma sub-população em se adaptar a concentrações crescentes da droga, resultando em populações homogêneas resistentes. É considerado um mecanismo inato e adaptativo do complexo *C. neoformans* - *C. gattii*, visto que não há diferenças de heteroresistência quanto a isolados ambientais e clínicos, porém, estes variam quanto à espécie envolvida. A avaliação quanto ao nível de heteroresistência a azóis é recomendada para casos de criptococose em que se faz necessária a terapia por longo período com azóis (MORDON et al, 1999; SIONOV et al, 2009; VARMA et al, 2010; YAMAZUMI et al, 2003).

Relatos de resistência a anfotericina são raros, no entanto a resistência secundária é ocasionalmente descrita em isolados de *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp. A resistência a anfotericina B em *Cryptococcus* spp. foi inicialmente descrita em um isolado de paciente com recidiva da doença após tratamento para meningite criptocócica. A alteração que conferia resistência específica a droga foi encontrada na enzima esterol $\Delta 8 \rightarrow 7$ isomerase (KELLY et al, 1994). Mutações na via da biossíntese do ergosterol, como na enzima $\Delta 5,6$ desnaturase, também conferem resistência a anfotericina B, com resistência cruzada a antifúngicos azóis (JOSEPH-HORNE et al, 1995).

A monoterapia é um fator de risco para aquisição de resistência a 5-flucitosina e há falha terapêutica em 57% dos casos, sendo desaconselhada sua prática (HOSPENTHAL; BENNETT, 1998; PERFECT et al, 2010). Pouco se conhece sobre o real mecanismo de ação da 5-flucitosina, sabe-se que a droga entra na célula pela ação da citosina permease, após sua entrada é desaminada pela citosina desaminase em 5-fluorouracil e é convertida pelo processamento celular de pirimidinas em 5-fluorodeoxiuridina monofosfato que inibe a timidilato sintetase e a 5-fluorouridina trifosfato interrompendo a síntese de RNA e, por conseguinte, a síntese protéica (BENNETT, 1977). A aquisição de resistência ocorre devido a mutações pontuais nos genes envolvidos na biotransformação da droga (HOSPENTHAL; BENNETT, 1998).

1.5. Justificativa

Pouco se conhece sobre a epidemiologia e microbiologia dos *Cryptococcus* spp. no estado da Bahia e apoiado no aumento do número de casos da doença no mundo, principalmente em indivíduos imunocompetentes torna o conhecimento acerca da frequência das espécies e genótipos, do perfil de susceptibilidade antifúngica e da virulência de isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. uma importante e inicial contribuição no entendimento da doença no nosso estado.

2.0. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Caracterizar fenotípica e genotipicamente os *Cryptococcus* spp. isolados de casos de meningite diagnosticados no Hospital Especializado Couto Maia, no estado da Bahia, Brasil no período de 2006 a 2010, bem como avaliar o desempenho dos testes de susceptibilidade antifúngica.

2.2. Objetivos específicos

1. Descrever a frequência das espécies de *Cryptococcus* spp. nos isolados clínicos oriundos de casos de meningite diagnosticados no Hospital Especializado Couto Maia, na Bahia durante o período de 2006 a 2010;
2. Determinar os genótipos dos isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. na Bahia por meio da técnica de Reação de Polimerização em Cadeia associado ao Polimorfismo do Tamanho do Fragmento de Restrição “polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism” (PCR-RFLP) do gene URA5;
3. Investigar a presença de fatores de virulência de isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. como: produção das enzimas proteinase, fosfolipase e urease, habilidade de crescimento a 37°C e produção de melanina;
4. Determinar o perfil de susceptibilidade antifúngica (anfotericina B, fluconazol, itraconazol e 5-flucitosina) de isolados clínicos de *Cryptococcus* spp., pela técnica de microdiluição em caldo;
5. Avaliar o desempenho da técnica de disco difusão frente a técnica padrão de microdiluição em caldo através da análise de correlação e concordância de pontos de corte para os isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. frente a antifúngicos.

3.1. Micro-organismos

3.1.1. Isolados Clínicos

Foram utilizados *Cryptococcus* spp. isolados 62 casos de meningite, diagnosticados no Hospital Especializado Couto Maia, Salvador-BA no período de 2006 a 2010. As leveduras foram isoladas e identificadas no laboratório do hospital, e enviadas ao Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Clínica (LPMC) da Faculdade de Farmácia da UFBA, onde tiveram sua viabilidade, pureza e identificação confirmadas.

3.1.2. Cepas padrão

Leveduras padrão de referência da “American Type Culture Collection” (ATCC): *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *C. albicans* ATCC 90028 e *C. krusei* ATCC 6258, da coleção de cultura do LPMC, bem como os padrões moleculares de *Cryptococcus* spp. WM 148 (VNI), WM 626 (VNII), WM 628 (VNIII), WM629 (VNIV), WM 179 (VGI), WM 178 (VGII), WM 175 (VGIII), e WM 779 (VGIV), gentilmente cedidas pelo Laboratório de Micologia do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), foram utilizadas para estabelecimento de controles de qualidade.

3.1.3. Estoque e manutenção dos isolados

Depois de confirmada a identificação, viabilidade e pureza, os isolados foram repicados em Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) e incubados a temperatura de 28°C por 48-72h em estufa de Demanda Biológica de Oxigênio (BDO) e, em seguida, foram conservados à temperatura de -20°C, em caldo Sabouraud acrescido de 20% de glicerol e glicerol puro, e em geladeira, por repiques sucessivos em ASD.

3.2. Caracterização Fenotípica

3.2.1. Identificação fúngica

A identificação do gênero *Cryptococcus* spp. foi realizada por meio de características morfológicas, em preparações de tinta da China, e bioquímicas, pelas provas de assimilação (auxanograma) e fermentação (zimograma) de carboidratos (LARONE, 1995; LACAZ et al, 2002).

3.2.1.1. Presença de cápsula

Para visualização da cápsula foi utilizada a técnica da tinta da China, onde uma preparação de lâmina-lamínula, realizada a partir de uma gota da suspensão da levedura em solução salina acrescida de uma gota da tinta, foi visualizada por microscopia ótica em

objetiva de 40X. A presença de leveduras redondas encapsuladas foi considerada um achado sugestivo do gênero *Cryptococcus* spp. (LACAZ et al, 2002).

3.2.1.2. Auxanograma

A prova de assimilação de carboidratos, auxanograma, foi realizada utilizando a técnica de “pour-plate”, onde em uma placa de Petri estéril foram misturados 20 mL do meio Yeast Nitrogen Base (YNB) fundido e resfriado à 45°C a 1 mL de uma suspensão aquosa de levedura ajustada à escala 5,0 McFarland. Após a solidificação do meio, pequenas quantidades dos carboidratos (dextrose, sacarose, lactose, galactose, rafinose, inositol, xilose, celobiose, trealose, maltose e dulcitol) foram adicionadas em posições previamente marcadas. As placas foram incubadas por 48 horas à 28°C. A assimilação foi observada através do aparecimento de halo de crescimento, na área correspondente a cada fonte de carboidrato. A dextrose foi utilizada como controle de viabilidade da levedura, visto que todas as leveduras assimilam esse carboidrato (LARONE, 1995).

A assimilação de fontes de nitrogênio foi realizada pela mesma técnica utilizada para a assimilação de carboidratos, porém o meio base utilizado foi o Yeast Carbon Base (YCB), e como fontes de nitrogênio foram utilizados a peptona e o nitrato de potássio (LARONE, 1995).

3.2.1.3. Zimograma

A prova foi realizada inoculando 1 mL da suspensão aquosa da levedura ajustada à escala 5,0 de McFarland, em um tubo contendo 3 mL de caldo basal (azul de bromotimol 0,03g; extrato de levedura 2,7g; peptona 4,5g; etanol a 95% 1,8 mL em água destilada 600 mL) para fermentação e um tubo de Durham invertido. A este foi adicionado 1 mL de uma solução de dextrose a 10%, esterilizada por filtração. A prova foi realizada utilizando apenas um carboidrato, visto que o gênero *Cryptococcus* spp. não utiliza carboidratos por esta via. Um tubo com apenas a suspensão da levedura foi utilizada como controle negativo. Os tubos foram incubados à 28°C por até 14 dias. A prova positiva foi atribuída ao aparecimento de gás, detectado pela presença de bolhas no interior do tubo de Durham (LARONE, 1995).

3.2.2. Quimiotipagem

Para diferenciação das espécies de *C. neoformans* e *C. gattii*, isolados de *Cryptococcus* spp. foram semeados em ágar Canavanina-Glicina-Azul de Bromotimol (CGB) (100 mL de solução A: glicina 10 g; KH_2PO_4 1 g; MgSO_4 1 g; sulfato de L-canavanina 30 mg em 1.000 mL de água destilada; 20 mL de solução B: azul de bromotimol 0,4 g; NaOH 0,01N 64 mL; em 36 mL de água destilada) e incubados a 28°C por 48 horas. O aparecimento de coloração azul no meio de cultura, após crescimento fúngico, indicou metabolização da L-canavanina e utilização de glicina cujos produtos alcalinos alteraram o pH do meio

identificando a espécie *gattii*. A identificação da espécie *neoformans* foi dada pelo resultado inalterado da prova (KWON-CHUNG et al, 1982). *C. gattii* WM 779 e *C. neoformans* WM 628 foram utilizados como controles de qualidade foram utilizados

3.3. Pesquisa dos fatores de virulência

3.3.1. Pesquisa de fosfolipase e proteinase

Para a pesquisa das enzimas fosfolipase e proteinase, suspensões equivalentes à escala 1,0 McFarland foram inoculadas em placas contendo ágar proteinase (extrato de levedura 11,7g; albumina bovina 2 g; protovit 3 gotas; ágar 18 g e água 1000 mL) (RUCHEL et al, 1982) e ágar fosfolipase (ágar Sabouraud 65 g; NaCl 57,3 g; CaCl₂ 0,55 g; gema de ovo 40 g em 1000 mL água) (PRICE et al, 1983), e então incubadas a 35°C, respectivamente, por 15 e 7 dias, sendo realizadas em triplicatas.

A presença da enzima fosfolipase foi observada pela formação de uma zona opaca ao redor da colônia do isolado e a atividade enzimática (PZ) foi medida dividindo-se o valor do diâmetro da colônia pelo valor do diâmetro da colônia mais a zona de precipitação. O isolado teve sua atividade classificada como: não produtoras desta enzima (PZ = 1), atividade média (PZ $\geq 0,64 < 1,0$) e atividade enzimática elevada (PZ $\leq 0,63$). Já a enzima proteinase foi detectada pela formação de um halo transparente ao redor da colônia do isolado. A atividade da enzima proteinase foi interpretada como: sem atividade ou negativa para a ausência de halo; fraca quando o halo foi menor que 1 mm de raio; média, quando o halo esteve entre 1 a 2 mm de raio e forte quando maior que 2 mm de raio (CHEN, S. et al, 1997). A cepa padrão de *C. albicans* ATCC 90028 foi utilizada como controle de reprodutibilidade foi utilizado.

3.3.2. Presença de urease

Para a pesquisa da urease, uma UFC foi repicada em ágar urease de Christensen (0,1 g extrato de levedura, 91 mg KH₂PO₄, 95 mg Na₂HPO₄, 20 g uréia, 0,01 g vermelho de fenol 1,5% ágar em 1000 mL de água destilada, pH 7,0) e incubada a temperatura de 28°C pelo período de 48 a 72 horas. A reação positiva foi indicada pelo aparecimento de cor rosa no meio de cultura devido a degradação da uréia a amônia que alterou o indicador de pH para alcalino. A prova negativa foi dada pela coloração inalterada do meio (COX et al, 2000). As cepas padrão ATCC de *C. albicans* 22018 e *C. krusei* ATCC 6258 foram utilizadas como controles negativo e positivo, respectivamente.

3.3.3. Habilidade de crescimento a 37°C

Uma UFC foi repicada em ASD e o crescimento colonial indicou termotolerância após incubação a 37°C pelo período de 48 a 72 horas (LAR ONE et al, 2002).

3.3.4. Produção de melanina

Após crescimento em ASD, uma UFC (Unidade Formadora de Colônia) foi repicada para a superfície de uma placa contendo o meio mínimo (10 g glicose, 780 mg creatinina, 200 mL extrato de semente de níger (*Guizottia abyssinica*), 20 g ágar bacteriológico, 800 mL água destilada) e após 48 horas de incubação a 28°C, foi avaliada a presença de pigmento colonial marrom indicando a produção de melanina (SIDRIM, 1995 - modificado). Foram utilizadas como controle de qualidade do meio de cultura as cepas *C. neoformans* WM 628, para controle positivo, e *C. albicans* ATCC 22018 para controle negativo.

3.4. Determinação da Sensibilidade a antifúngicos

A sensibilidade aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol, itraconazol e 5-flucitosina foi avaliada através da técnica de disco difusão, descrita no protocolo M44-A2 (CLSI, 2009) e da técnica da microdiluição em caldo, descrita no protocolo M27-A3 (CLSI, 2010).

3.4.1. Disco Difusão

3.4.1.1. Técnica

A sensibilidade por meio da técnica de disco difusão foi avaliada frente aos antifúngicos fluconazol (25 µg), itraconazol (10 µg), anfotericina B (100 µg) e 5-flucitosina (1 µg) (CECON). Para este teste foram utilizadas placas de Petri contendo ágar Mueller-Hinton (Acumedia, New York, NY) suplementado com 2% de glicose e 0,5 µg/mL de azul de metileno (MHGM) com espessura de quatro milímetros e pH 7,2. De um crescimento de 48 horas, três a quatro colônias de semelhante morfologia foram suspensas em solução salina 0,85% estéril e, em seguida, a suspensão foi ajustada a escala padrão de turbidez 0,5 McFarland e, com auxílio de swab estéril, foi semeada na superfície do ágar em estrias e em três diferentes direções. O discos de antifúngicos foram assepticamente dispensados e as placas foram incubadas a 35°C por 48 horas e, após o período de incubação, os halos de inibição de crescimento fúngico ao redor dos discos foram medidos em milímetros de

diâmetro. Foram utilizados as cepas padrão *Candida albicans* ATCC 90028 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019 como controles de qualidade e reprodutibilidade

3.4.1.2. Critérios de interpretação de resultados

O documento M44-A (2004) traz apenas critérios interpretativos para os azóis, fluconazol e voriconazol e o suplemento de atualização do protocolo (2009) acrescenta critérios para a equinocandina, caspofungina e posaconazol. Portanto, apenas os resultados para fluconazol foram interpretados baseados neste documento e para os demais antifúngicos foram utilizados critérios sugeridos pelo fabricante dos discos (CECON) e o Neo-Sensitabs® (Rosco Diagnostica, Deumark, DK). Os critérios interpretativos utilizados estão sumarizados na Tabela 01.

Tabela 01. Critérios de interpretação de resultados para metodologia de disco difusão (mm).

Antifúngico	CLSI, 2009			NeoSensitabs			CECON		
	S	S-DD	R	S	S-DD	R	S	S-DD	R
Fluconazol	≥19	18-15	≤14	≥19	18 - 15	≤14	>19	18-15	≤14
Itraconazol	-	-	-	≥23	22 - 14	≤13	≥20	19 - 12	≤11
Anfotericina B	-	-	-	≥15	14 - 12	≤11	>10	-	≤10
5-Flucitosina	-	-	-	≥20	19 - 12	≤11	>20	19 - 10	<10

S - sensível; S-DD - Sensível-dose dependente; R - Resistente

3.4.2. Microdiluição em Caldo

3.4.2.1. Técnica

As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) para o fluconazol, itraconazol, anfotericina B e 5-flucitosina (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo.) foram determinadas utilizando faixas de concentrações finais de 0,03 a 64 µg/mL para fluconazol e 5-flucitosina, de 0,03 a 16 µg/mL para itraconazol e anfotericina B.

Para os antifúngicos fluconazol e 5-flucitosina foi utilizado água destilada estéril como solvente para a obtenção das soluções iniciais testadas (128 µg/mL), já para a anfotericina B e itraconazol, a solução inicial foi obtida solubilizando o pó em DMSO seguida de diluição em solução 1:10 de DMSO: RPMI, obtendo solução de concentração 160 µg/mL com posterior diluição para obtenção da solução teste de 32 µg/mL .

Em uma placa de microdiluição com múltiplos poços (96 poços com fundo em formato de U) foram feitas diluições a partir de uma solução de 128 µg/mL para fluconazol e 5-flucitosina e de 32 µg/mL para itraconazol e anfotericina B em caldo RPMI 1640 suplementado com 2% de glicose e tamponado com MOPS (3-N-morfolinopropano-ácido sulfônico) a pH 7,0. Uma suspensão da levedura ajustada a escala padrão de turbidez 0,5 McFarland, como descrita no item 4.1.1, foi diluída a 1:50 e, em seguida, diluída 1:20, em caldo RPMI 1640, de forma a atingir 1 a 5 X 10³ UFC/mL. Em 100 µL de cada diluição do antifúngico foram adicionados 100 µL da suspensão fúngica e, então, as placas foram incubadas a 35°C por 72-74 horas. Após o período de incubação, 15 µL de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) a 0,5% em água destilada foram adicionados por toda a placa e a presença de crescimento fúngico visível foi observada através de coloração vermelha. A CIM foi definida como a menor concentração que inibiu 100% do crescimento fúngico para a anfotericina B e 50% para os azóis e 5-flucitosina, quando comparado ao controle de crescimento. Os testes foram conduzidos em duplicata. As cepas padrão *Candida krusei* ATCC 6258 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019 foram utilizadas para realização dos controles de: qualidade, reprodutibilidade, crescimento fúngico e esterilidade do meio.

3.4.2.2. Critérios de interpretação de resultados

O protocolo M27-A2 (CLSI, 2008) estabelece pontos de corte para interpretação dos resultados somente para algumas combinações organismo-droga e de acordo com esses critérios os isolados foram considerados: sensíveis ao fluconazol quando as CIMs foram ≤ 8 µg/mL, sensíveis dose-dependentes quando ficaram entre 16-32 µg/mL e resistentes os que apresentaram valores ≥ 64 µg/mL; para o itraconazol foram sensíveis os com CIM ≤ 0,125 µg/mL, sensíveis dose-dependentes com CIM entre 0,25 e 0,5 µg/mL e resistentes ≥ 1 µg/mL; isolados foram sensíveis a 5-flucitosina quando apresentaram valores de CIM ≤ 4 µg/mL, com sensibilidade intermediária valores entre 8 e 16 µg/mL e resistentes com valores de CIM ≥ 32 µg/mL; por fim, para a anfotericina B o CLSI considera prováveis isolados resistentes com CIMs >1µg/mL (Tabela 02). Quando as CIMs apresentaram valores entre uma e outra categoria, a sensibilidade do isolado foi classificada na categoria imediatamente superior ao valor encontrado.

Tabela 02. Diretrizes de interpretação dos testes de sensibilidade *in vitro* para metodologia de diluição em caldo.

Antifúngico	Sensível	Sensibilidade Dose-Dependente	Resistente
Fluconazol	≤ 8 µg/mL	16 - 32 µg/mL	≥ 64 µg/mL
Itraconazol	≤ 0.125 µg/mL	0.25 - 0.5 µg/mL	≥ 1 µg/mL
Anfotericina B	-	-	> 1 µg/mL
5-Flucitosina	≤ 4 µg/mL	8 - 16 µg/mL	≥ 32 µg/mL

Fonte: Documento M27-A3, CLSI, 2008.

3.5. Análise Estatística

As análises de correlação entre os resultados obtidos pelas técnicas de disco difusão e microdiluição em caldo foram realizadas por regressão linear e *t* de Student; enquanto a significância dos resultados foi obtida pelo método dos mínimos quadrados utilizando o software SPSS 17.0. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando o valor de *p* foi < 0,05

Foram avaliadas as concordâncias globais e categóricas entre os pontos de corte sugeridos pelo fabricante dos discos (CECON), os descritos pela NeoSensitabs (Rosco Diagnostica – Deumark, DK), bem como aquele sugerido pelo CLSI, para a interpretação dos halos de inibição obtidos pela técnica de disco difusão, com os resultados de CIM obtidos pela técnica padrão de microdiluição em caldo.

Através do coeficiente de concordância, os resultados foram classificados como maiores erros quando o isolado mostrou-se resistente pela técnica de disco difusão e sensível pelo método da microdiluição em caldo; erros muito maiores quando foi sensível pela técnica de disco difusão e resistente pelo método da microdiluição em caldo e classificados como menores erros quando o resultado de uma das técnicas foi resistente ou sensível e o outro dose-dependente (BARRY et al, 2002).

3.6. Caracterização Genotípica de *Cryptococcus* spp.

3.6.1. Técnica de extração do DNA genômico

Para obtenção do DNA genômico foi utilizado o método descrito por Bolano e colaboradores (2001). Após 48 horas de crescimento, 3 a 4 alçadas da levedura foram transferidas para 2 mL de tampão uréia (Uréia 8M, NaCl 0,5M, Tris 20mM, EDTA 20 mM,

SDS 2%, pH 8,0) os quais foram incubados por 4 horas sob agitação de 60 rpm a temperatura ambiente. Após o período de incubação as células foram recuperadas por centrifugação a 4.000 x g por 2 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 400 µL de tampão de lise (SDS 0,5%, sarkosyl 0,5% em TE (EDTA 1 mM, Tris-HCl 1 mM, pH 8,0), pH 8,0) e a estes foram adicionados 400 µL fenol:clorofórmio:álcool isopropílico e 400 µL de pérolas de vidro de 212-300 µM de diâmetro. Então as células foram submetidas à lise mecânica por 3 ciclos de agitação a 420 x g por 3 minutos, com intervalos de 3 minutos de incubação a 4°C. O extra to resultante foi centrifugado a 1.360 x g por 15 minutos e o sobrenadante transferido para um novo tubo de 1,5 mL. A precipitação foi realizada com 400 µL de isopropanol gelado “over night”, e então foram centrifugados por 10 minutos a 6.720 x g. Após descarte do sobrenadante, o sedimento foi lavado com 400 µL de álcool 70° gelado e novamente centrifugado por 10 min a 6.720 x g. O sedimento foi seco por 15 minutos e ressuspenso em 100 µL de TE. As soluções de DNA foram conservadas a -20°C até a quantificação.

3.6.2. Quantificação do DNA genômico.

O volume de 1 µL do DNA extraído teve sua concentração estimada por comparação de bandas com 0,1 µg do marcador de peso molecular do DNA do fago λ restringido pela *HindI* (Invitrogen) em gel de agarose a 0,8%, submetido a corrida eletroforética de 80V por 50 min. Após a corrida, o gel foi corado com brometo de etídio, e examinado sob luz Ultra Violeta (UV) (Tabela 03).

Tabela 03. Estimativa de massa (ng) por fragmento de 0,1 µg de DNA do fago λ digerido pela enzima *HindIII*.

Fragmento	Tamanho (bp)	Massa (ng)
1	23,13	47,7
2	9,416	19,4
3	6,557	13,5
4	4,361	9
5	2,322	4,8
6	2,027	4,2
7	564	1,2
8	125	0,3

3.6.3. Técnica de Reação em Cadeia da Polimerase associado ao Polimorfismo do Tamanho do Fragmento de Restrição (PCR-RFLP) do gene URA5

O PCR do gene URA5 foi realizado como descrito por Meyer e colaboradores (2003). Para um volume reacional final de 50 μ L, foram utilizados 50 ng do DNA genômico, 150 ng de cada primer, URA5 (5' ATGTCCTCCCAAGCCCTCGACTCCG 3') e SJ01 (5' TTAAGACCTCTGAACACCGTACTC3'), 0,2 nM de cada dNTP, 3 mM de cloreto de magnésio, 1,5 U de Taq Polimerase (Promega) e 10 μ L de 5X Green buffer (GoTaq® - Invitrogen).

O PCR foi realizado em 35 ciclos no Termociclador (Bio Rad) utilizando as seguintes condições: 2 minutos de desnaturação inicial a 94°C, seguido de 35 ciclos de 45 segundos de desnaturação a 94°C, 1 minuto de pareamento a 61°C, 2 minutos de extensão a 72°C, com extensão final de 10 minutos a 72°C. O produto amplificado foi visualizado em gel de agarose a 1,5% em tampão Tris-borato EDTA (TBE), numa corrida eletroforética de 100 V por 2 horas e, em seguida, corado em brometo de Etídio. Um volume de 15 μ L do amplificado foram digeridos simultaneamente com as enzimas *Sau96I* (10 U/L) (New England – BioLabs) e *HhaI* (20 U/L) (Invitrogen) por toda a noite e separado por eletroforese em gel de agarose a 3% a 100V por 2 horas. Os fragmentos gerados foram observados sob luz UV após coloração com brometo e fotodocumentados.

Os perfis de restrição gerados foram comparados àqueles obtidos pelas cepas de referencia de *Cryptococcus* spp. WM 148 (VNI), WM 626 (VNII), WM 628 (VNIII), WM629 (VNIV), WM 179 (VGI), WM 178 (VGII), WM 175 (VGIII), e WM 779 (VGIV), bem como pelo mapa de restrição.

3.6.3.1. Construção do mapa de restrição

Seqüência de nucleotídeos do gene de orotidina-monofosfato pirofosforilase (URA5) de *Cryptococcus* sp. dos tipos moleculares WM 148, WM161, WM 178, WM 179, WM 628, WM 629, WM 626 e WM 779 foram obtidas do Genbank (Pubmed): WM148 (AJ555621); WM161 (AJ555833); WM178 (AJ555832); WM179 (AJ555831); WM628 (AJ555829); WM626 (AJ555828); WM629 (AJ555830); WM779 (AJ555834) e, então, localizados os pontos de restrição para as enzimas *HhaI* e *Sau96I* a partir da especificidade destas (Figura 04).

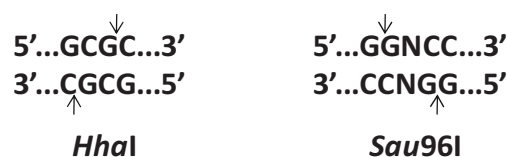


Figura 04. Sítios de restrição das enzimas *Sau96I* e *HhaI*.
Fonte: A AUTORA.

3.7. Aspectos éticos

O projeto referente a este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Especializado Couto Maia (ANEXO A).

4.1. Caracterização Fenotípica

4.1.1. Identificação

Todos os 62 isolados foram identificados como pertencentes ao gênero *Cryptococcus* spp. a partir das características bioquímicas, através da assimilação de carboidratos específicos e ausência de fermentação de dextrose; pelas características morfológicas, através da observação de células leveduriformes redondas e encapsuladas em preparações de tinta da China (Figura 05).

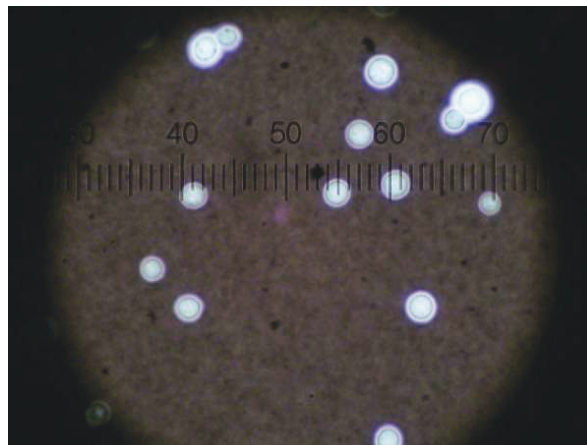


Figura 05. Cápsula de *Cryptococcus* spp. observada pelo contraste da preparação de tinta da China. (Aumento de 400X). Fonte: A AUTORA.

4.1.2. Quimiotipagem

A quimiotipagem caracterizou 21% (13/62) dos isolados como *C. gattii* e 79% (49/62) como *C. neoformans* (Figura 06).

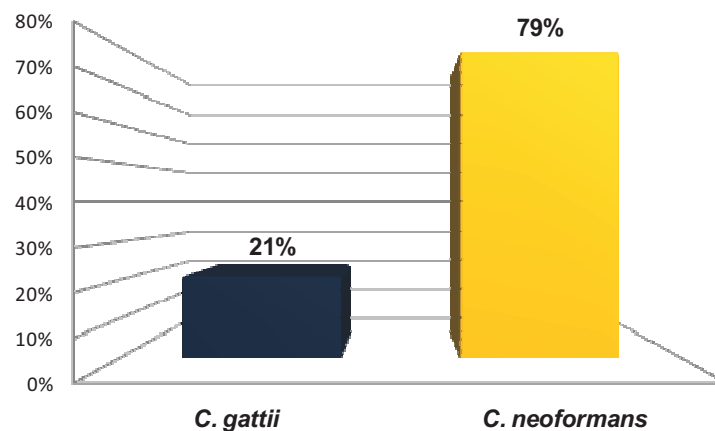


Figura 06. Frequência das espécies de *Cryptococcus* spp. isolados de casos de meningite diagnosticados no Hospital Especializado Couto Maia em Salvador, BA.

4.1.3. Fatores de virulência

A enzima proteinase não foi detectada nos isolados pela metodologia utilizada, porém, em apenas um isolado de *C. neoformans* não foi detectada a enzima fosfolipase. A atividade elevada para enzima fosfolipase foi detectada em 63% dos isolados e atividade moderada em 35,5%, quando estratificado por espécie, não foram encontradas diferenças significativas quanto à atividade enzimática (Tabela 04). A habilidade de crescimento a 37°C e a produção de melanina foram observadas em todos os isolados, e a ausência da enzima urease foi detectada em um isolado de *C. gattii*.

Tabela 04: Atividade Enzimática de Proteinase e Fosfolipase de isolados de *Cryptococcus* spp.

Espécies	Proteinase		Fosfolipase				Total		p valor*	
	Sem atividade		Sem atividade		Atividade média		Atividade elevada			
	n	%	n	%	n	%	n	%		
<i>C. gattii</i>	13	100	0	0	6	46	7	54	0,568	
<i>C. neoformans</i>	49	100	1	2	16	32,6	32	65,4		
Total	62	100	1	1,5	22	35,5	39	63		62

(*) Teste de Qui-quadrado

4.1.4. Perfil de susceptibilidade antifúngica

4.1.4.1. Disco Difusão

Utilizando a interpretação descrita pelo NeoSensitabs, 96,8% (60/62), 74,2% (46/62) e 45,2% (28/62) dos isolados foram classificados como sensíveis a anfotericina B, fluconazol e itraconazol, respectivamente. Quando interpretados pelos critérios da CECON, houve alteração do resultado para o fluconazol para 71% (44/62) e itraconazol para 72,6% (45/62). Nenhum isolado demonstrou sensibilidade a 5-flucitosina, sendo que 83,6% (51/61) apresentaram resistência a esta droga para ambos os critérios. Com relação a anfotericina B, também, houve um isolado resistente detectado independente do critério analisado (Tabela 05).

Tabela 05. Perfil de susceptibilidade antifúngica de isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. pelo método de disco difusão avaliado por diferentes critérios de interpretação.

Antifúngico	CECON								NeoSensitabs							
	S		S-DD		R		Total		S (%)		S-DD (%)		R (%)		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Fluconazol	71	71	17,7	18	11,3	11	62	100	46	74	9	15	7	11	62	100
Itraconazol	72,6	73	25,8	26	1,6	1,6	62	100	28	45	33	53	1	1,6	62	100
Anfotericina B	98,4	98	0	0	1,6	1,6	62	100	61	98	0	0	1	1,6	62	100
5-Flucitosina	0	0	16,4	16	83,6	84	62	100	0	0	10	16	52	84	62	100

S - sensível; S-DD - Sensível-dose dependente; R - Resistente

4.1.4.2. Microdiluição em caldo

A susceptibilidade dos 62 isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. determinada pela técnica padrão de microdiluição está sumarizada na Tabela 06. Para o fluconazol e o itraconazol, 74,2% (46/62) e 80,6% (50/62) dos isolados foram sensíveis respectivamente, já três 4,8% (3/62) dos isolados apresentaram resistência a Fluconazol. Nenhum demonstrou resistência a itraconazol e 19,4% (12/62) apresentaram sensibilidade dose-dependente a este antifúngico. A 5-flucitosina foi o antifúngico com o menor percentual de isolados sensíveis 30,6% (19/62), e maior quanto à sensibilidade dose-dependente 67,8% (42/62). A resistência a anfotericina B foi detectada em 3,2% (2/62).

Tabela 06. Perfil da susceptibilidade antifúngica de isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. pela metodologia de microdiluição em caldo (M27-A3).

Antifúngico	S		S-DD		R		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Fluconazol	46	74	13	21	3	4,8	62	100
Itraconazol	50	81	12	19	0	0	62	100
Anfotericina	60	97	0	0	2	3,2	62	100
5-Flucitosina	19	31	42	68	1	1,6	62	100

S - sensível; S-DD - Sensível-dose dependente; R - Resistente

A estratificação dos resultados de sensibilidade pelo método de microdiluição por espécie mostrou diferenças significativas para os antifúngicos azólicos. Os isolados de *C. gattii* se mostraram cerca de oito vezes mais resistentes ao fluconazol quando comparado com os isolados de *C. neoformans*, apresentando resistência em 15,5% dos isolados. A

resistência a anfotericina B e 5-flucitosina só foi observada em isolados de *C. neoformans*, com respectivamente 4% e 2% (Tabela 07).

Tabela 07. Perfil de susceptibilidade antifúngica por espécie de *Cryptococcus* spp.

Antifúngico	Espécies	S		SDD		R		Total		p valor*
		n	%	n	%	n	%	n	%	
Fluconazol	<i>C. neoformans</i>	41	84	7	14	1	2	49	100	0,013
	<i>C. gattii</i>	5	39	6	46	2	16	13	100	
Itraconazol	<i>C. neoformans</i>	44	90	5	10	0	0	49	100	0,001
	<i>C. gattii</i>	6	46	7	54	0	0	13	100	
Anforericina B	<i>C. neoformans</i>	48	96	0	0	2	4	49	100	0,622
	<i>C. gattii</i>	13	100	0	0	0	0	13	100	
5-Flucitosina	<i>C. neoformans</i>	12	25	36	74	1	2	49	100	0,163
	<i>C. gattii</i>	7	54	6	46	0	0	13	100	

S - sensível; S-DD - Sensível-dose dependente; R -

* Teste de Qui-quadrado

A distribuição dos valores de CIM apresentada na Tabela 08 mostra que para o fluconazol os isolados *C. neoformans* mostraram maior variação (1 – 64 µg/mL), porém, os *C. gattii* apresentaram um maior valor de média geométrica. Os isolados foram muito sensíveis ao itraconazol, com os menores valores observados. Dois isolados de *C. neoformans* apresentaram CIM de 2 µg/mL para anfotericina B, a qual apresentou maior número de isolados de ambas espécies quando o valor de CIM foi de 0,5 µg/mL. Para 5-flucitosina foi encontrado o valor de CIM mais elevado (>64 µg/mL) em um isolado de *C. neoformans* (Tabela 08).

Tabela 08. Valores de CIM de antifúngicos de isolados clínicos de *Cryptococcus* spp.

Antifúngico	Espécies	Média Geométrica	Números de isolados inibidos por CIM ($\mu\text{g/mL}$)											Total		
			> 64	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125		0,06	0,03
Fluconazol	<i>C. neoformans</i>	7,06	1		7	26	12	2	1							49
	<i>C. gattii</i>	18,77	2	4	2	5										13
Itraconazol	<i>C. neoformans</i>	0,096									1	4	25	15	4	49
	<i>C. gattii</i>	0,2									2	5	5	1		13
Anforericina B	<i>C. neoformans</i>	0,37							2		19	14	7	1		49
	<i>C. gattii</i>	0,47								2	9	2				13
5-Flucitosina	<i>C. neoformans</i>	6,92	1		6	30	8	4								49
	<i>C. gattii</i>	5,22				6	6	1								13

CIM - Concentração Inibitória Mínima

4.1.4.3. Avaliação da concordância entre os resultados de susceptibilidade antifúngica

Os resultados para o fluconazol apresentaram concordância em 75,8% dos isolados, com 20,9% de discrepâncias classificadas como menores e 1,6% como maiores. Para o itraconazol não foram observadas discrepâncias maiores e muito maiores, entretanto 40,3% dos resultados foram classificados com menores discordâncias, com concordância global de 59,6%. A menor concordância foi observada para 5-flucitosina (9,8%). Esse antifúngico apresentou maior percentual de erros quando comparado aos demais e a melhor concordância foi observada para a anfotericina B (98,4%), porém, apresentou 1,6% de erros considerados como muito maiores. A concordância entre os resultados de susceptibilidade antifúngica obtidos pela técnica de disco difusão e o de microdiluição em caldo, utilizando os critérios de interpretação descrito pela NeoSensitabs estão apresentados na Tabela 09.

A concordância entre os resultados utilizando os pontos de corte baseados na interpretação proposta pela CECON foi, respectivamente, de 98,4%, 83,9% e 75,8% para anfotericina B, itraconazol e fluconazol, não sendo observadas discrepâncias muito maiores para fluconazol e itraconazol. A avaliação também demonstrou elevada discordância para os resultados da 5-flucitosina para ambos os critérios avaliados (Tabela 10).

Tabela 09. Concordância entre os resultados de susceptibilidade antifúngica obtidos pela técnica de disco difusão e de microdiluição em caldo utilizando o critério proposto pelo NeoSensitabs.

Antifúngico	Método	Isolados por categoria								Resultados discrepantes			% de Concordância global
		S		S-DD		R		Total		Menor	Maior	Muito Maior	
		n	%	n	%	n	%	n	%				
Fluconazol	MDC	46	74	13	21	13	4,8	62	100				75,8%
	DD	46	74	9	15	9	11	62	100	20,9	1,6	0	
Itraconazol	MDC	50	81	12	19	12	0	62	100				59,6%
	DD	28	45	33	53	33	1,6	62	100	40,3	0	0	
Anfotericina	MDC	60	97	0	0	2	3,2	62	100				98,4%
	DD	61	98	0	0	1	1,6	62	100	0	0	1,6	
5-Flucitocina	MDC	19	31	42	68	42	1,6	62	100				9,8%
	DD	0	0	10	16	10	84	62	100	62,9	27,4	0	

S - Sensível; S-DD - Sensível dose-dependente; R - Resistente.

MDC - Microdiluição em caldo

DD - Disco difusão

Tabela 10. Concordância entre os resultados de susceptibilidade antifúngica obtidos pela técnica de disco difusão e de microdiluição em caldo utilizando o critério proposto pela CECON.

Antifúngico	Método	Isolados por categoria								Resultados discrepantes			% de Concordância global
		S		S-DD		R		Total		Menor	Maior	Muito Maior	
		n	%	n	%	n	%	n	%				
Fluconazol	MDC	46	74	13	21	3	4,8	62	100				75,8%
	DD	44	71	11	18	7	11	62	100	22,6	1,6	0	
Itraconazol	MDC	50	81	12	19	0	0	62	100				83,9%
	DD	45	73	16	26	1	1,6	62	100	16	0	0	
Anfotericina	MDC	60	97	0	0	2	3,2	62	100				98,4%
	DD	61	98	0	0	1	1,6	62	100	0	0	1,6	
5-Flucitocina	MDC	19	31	42	68	1	1,6	62	100				11,3%
	DD	0	0	10	16	52	84	62	100	61,3	25,8	0	

S - Sensível; S-DD - Sensível dose-dependente; R - Resistente.

MDC - Microdiluição em caldo

DD - Disco difusão

4.1.4.4. Análise de Correlação dos diâmetros dos halos de inibição e os valores de CIM

A análise de correlação entre os diâmetros dos halos de inibição de crescimento fúngico obtidos pelo método de disco difusão e os valores de CIM obtidos pela microdiluição em caldo mostrou significância estatística para os antifúngicos fluconazol, itraconazol e anfotericina B. Não foi obtida correlação significativa para a 5-flucitosina, sendo menos de 2% dos resultados através da regressão linear.

A Figura 07 mostra o diagrama de dispersão da correlação entre os valores em milímetros dos halos de inibição e a concentração inibitória mínima em $\mu\text{g/mL}$ para o fluconazol frente aos isolados de *Cryptococcus* spp. No modelo de regressão linear foi observada significância estatística ($p < 0,001$), com 43% das associações explicadas pela equação da reta ($y = 38,4 - 1,13x$).

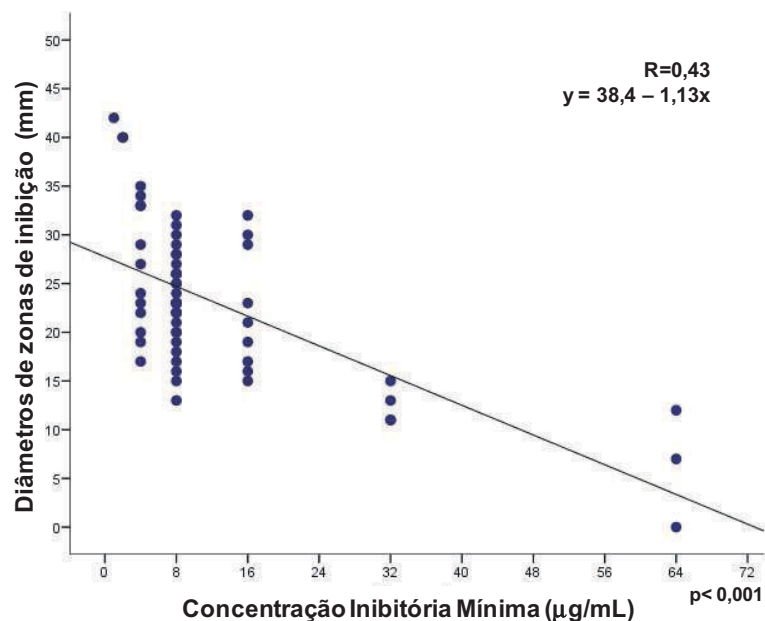


Figura 07. Diagrama de dispersão entre diâmetros de zonas de inibição e CIM frente a Fluconazol. Correlação dos diâmetros das zonas de inibição de crescimento fúngico obtidos pela técnica de disco difusão com os valores de CIM obtidos pela técnica da microdiluição em caldo dos isolados de *Cryptococcus* spp. pela regressão linear.

A Figura 08 traz a concordância categórica entre os métodos avaliados, onde o método de disco difusão interpretado pelo critério sugerido pela CECON melhor classificou os isolados como sensíveis e sensíveis dose-dependente, do que aquele proposto pelo CLSI e NeoSensitabs.

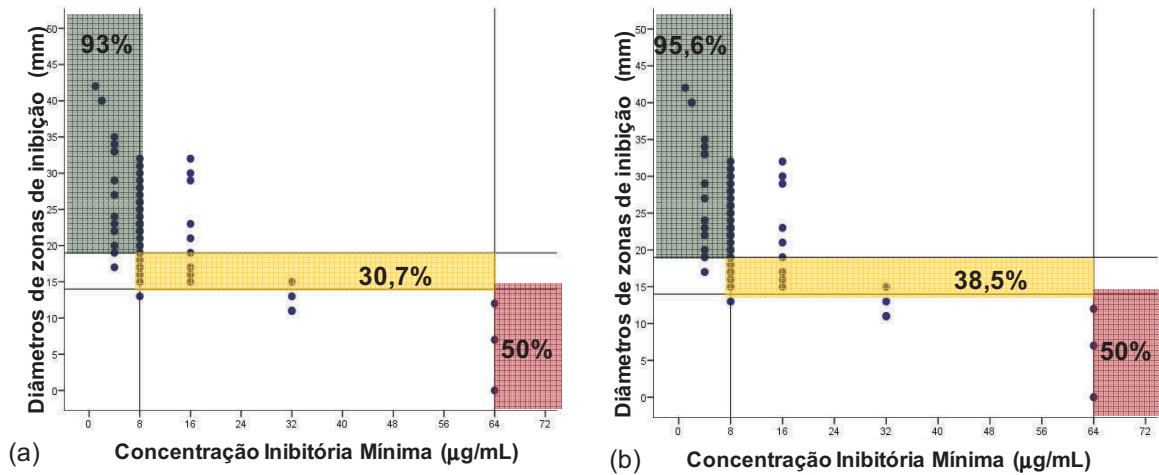





Figura 08. Concordância categórica do perfil de susceptibilidade frente a Fluconazol. Concordância por categoria entre os métodos de disco difusão e microdiluição em caldo frente ao Fluconazol utilizando pontos de corte sugeridos pelo NeoSensitabs/CLSI, 2008 (a) e CECON (b); sensível ; sensível dose-dependente ; resistente 

A avaliação categórica para o itraconazol mostrou que o ponto de corte sugerido pela CECON foi superior quanto à classificação de isolados como sensíveis (86%), quando comparado com aqueles sugeridos pelo NeoSensitabs (54%), sendo observado o inverso quando a categoria foi sensibilidade dose-dependente (Figura 09).

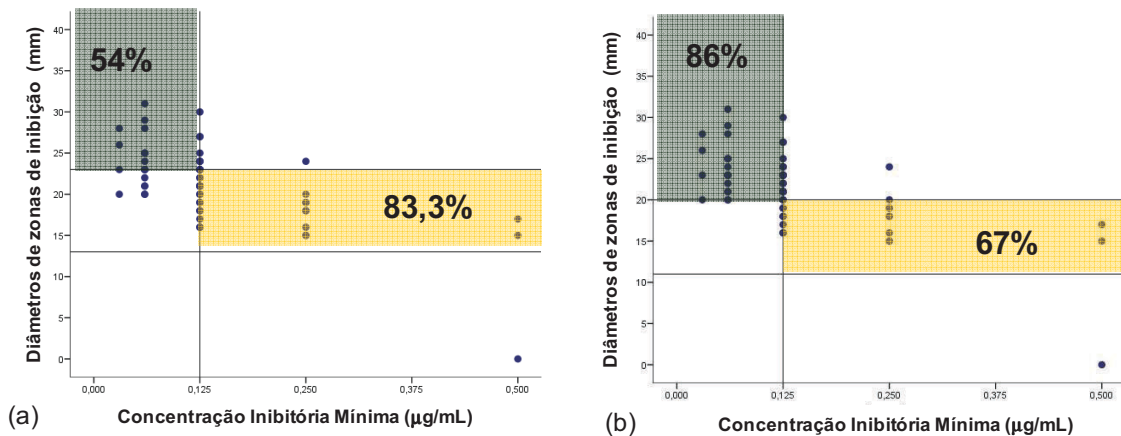




Figura 09. Concordância categórica do perfil de susceptibilidade frente a Itraconazol. Concordância por categoria entre os métodos de disco difusão e microdiluição em caldo frente à Itraconazol utilizando pontos de corte sugeridos pelo NeoSensitabs (a) e CECON (b); sensível ; sensível dose-dependente 

A regressão linear mostrou, com significância estatística 44,2% de associação entre os resultados obtidos pela reta ($y = 0,46 - 0,015x$) ($p < 0,001$) (Figura 10).

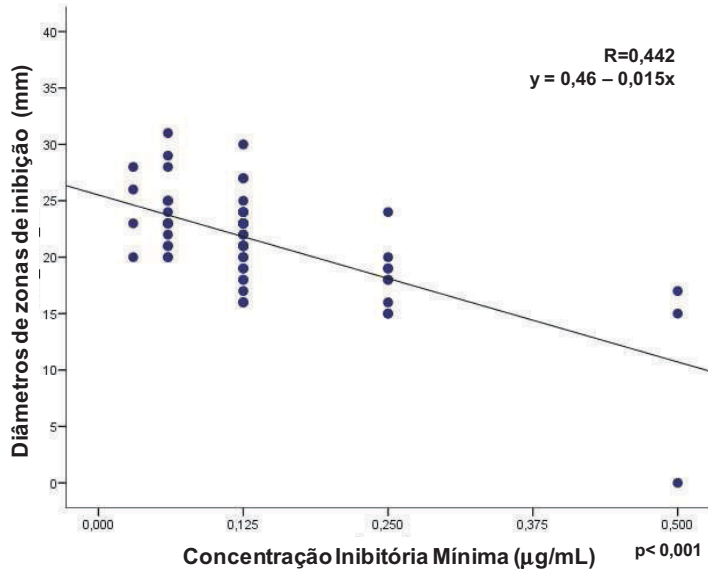


Figura 10. Diagrama de dispersão entre diâmetros de zonas de inibição e CIM frente a Itraconazol. Correlação dos diâmetros das zonas de inibição de crescimento fúngico obtidos pela técnica de disco difusão com os valores de CIM obtidos pela técnica da microdiluição em caldo dos isolados de *Cryptococcus* spp. pela regressão linear..

A análise por categoria para a anfotericina B mostrou que ambos os critérios avaliados classificaram corretamente 98,4% dos isolados como sensíveis, porém um dos isolados foi resistente (Figura 11).

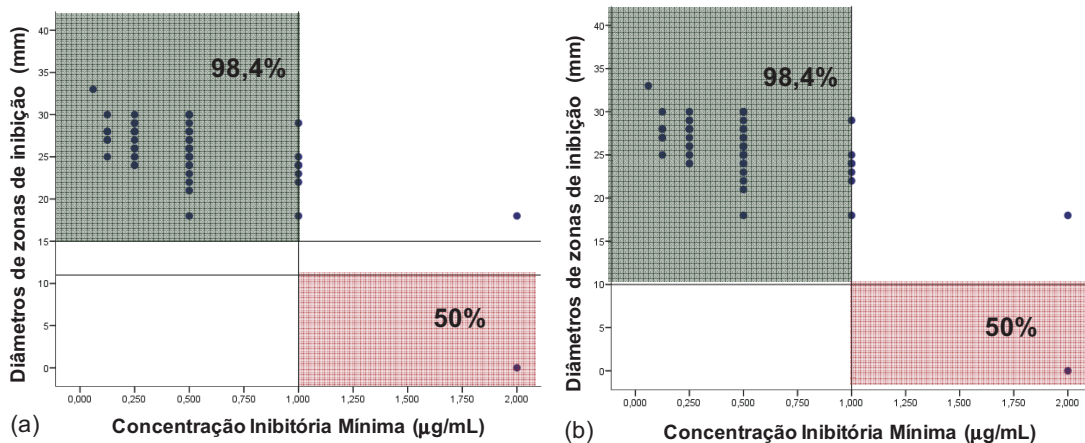




Figura 11. Concordância categórica do perfil de susceptibilidade frente a Anfotericina B. Concordância por categoria entre os métodos de disco difusão e microdiluição em caldo frente à Anfotericina B utilizando pontos de corte sugeridos pelo NeoSensitabs (a) e CECON (b) sensível  resistente 

A análise de correlação explicou 49% das associações utilizando o modelo de regressão linear ($y = 2,02 - 0,059x$), com significância estatística ($p < 0,001$) (Figura 12).

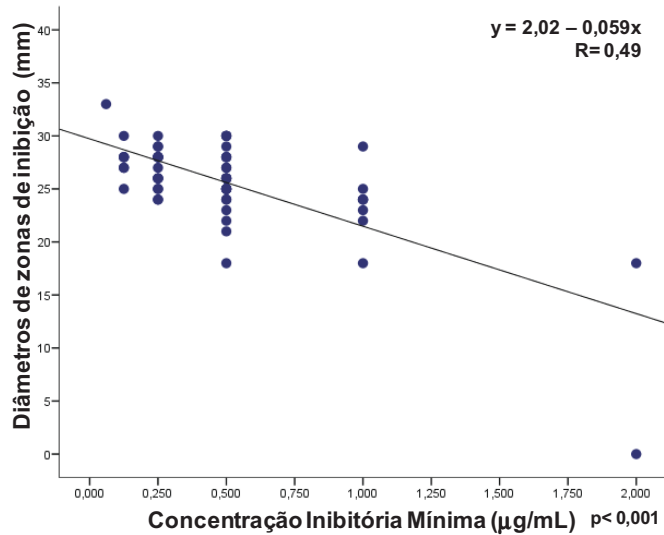


Figura 12. Diagrama de dispersão entre diâmetros de zonas de inibição e CIM frente a Anfotericina B. Correlação dos diâmetros das zonas de inibição de crescimento fúngico obtidos pela técnica de disco difusão com os valores de CIM obtidos pela técnica da microdiluição em caldo dos isolados de *Cryptococcus* spp. pela regressão linear..

Em relação a 5-flucitosina, as concordâncias categóricas mostraram que nenhum isolado sensível foi detectado, e que para resultados classificados como resistentes, os critérios utilizados classificaram corretamente menos de 2%, visto que somente um isolado resistente foi detectado pela microdiluição (Figura 13).

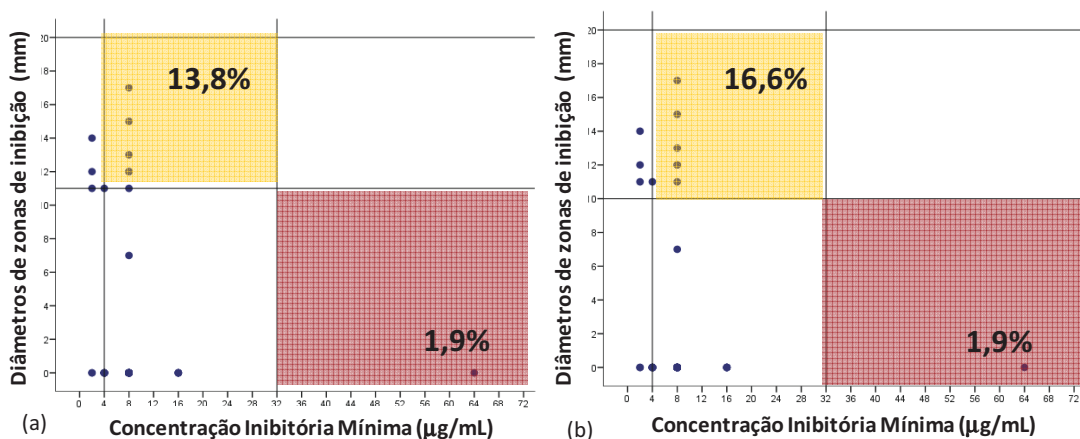




Figura 13. Concordância categórica do perfil de susceptibilidade frente a 5-Flucitosina. Concordância por categoria entre os métodos de disco difusão e microdiluição em caldo frente a 5-Flucitosina utilizando pontos de corte sugeridos pelo NeoSensitabs (a) e CECON (b); sensível dose-dependente  resistente 

A análise para a 5-flucitosina não apresentou significância estatística na análise de correlação ($p = 0,318$), mostrando apenas 1,7% da dispersão dos dados analisados (Figura 14).

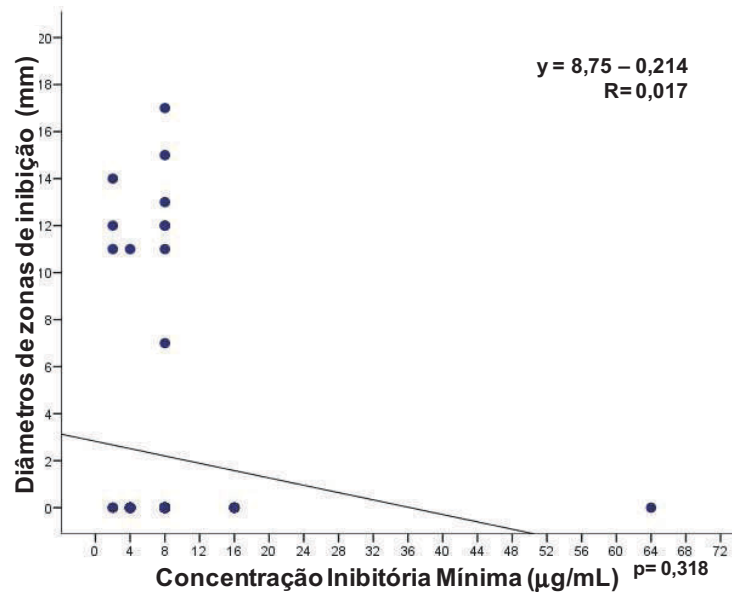


Figura 14. Diagrama de dispersão entre diâmetros de zonas de inibição e CIM frente a 5-Flucitosina. Correlação dos diâmetros das zonas de inibição de crescimento fúngico obtidos pela técnica de disco difusão com os valores de CIM obtidos pela técnica da microdiluição em caldo dos isolados de *Cryptococcus* spp. pela regressão linear.

4.2. Caracterização Genotípica

4.2.1. Extração e quantificação de DNA

Foram obtidos DNAs genômicos dos 62 isolados de *Cryptococcus* spp. e das oito cepas padrão, cuja integridade pode ser observada na Figura 15. As concentrações estimadas de DNA em gel de eletroforese variaram entre 13,5 - >47,7 ng/ μ L.

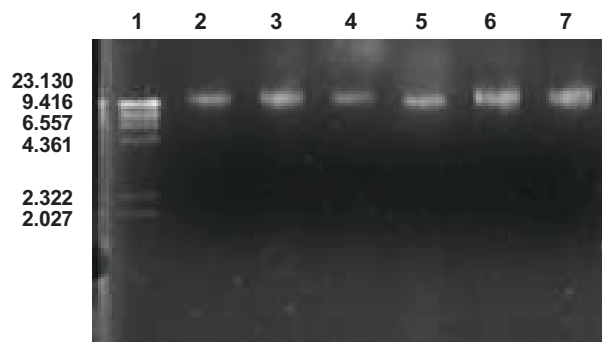


Figura 15. Integridade do DNA genômico de isolados de *Cryptococcus* spp, em gel de agarose a 1%. Linha 1 - Marcador molecular: DNA λ digerido com HindI (Invitrogen). Linhas 2 – 7: DNA dos isolados de *Cryptococcus* spp.

4.2.2. Reação em Cadeia da Polimerase associado ao Polimorfismo do Tamanho do Fragmento de Restrição (PCR-RFLP) do gene URA5

A reação de PCR foi realizada a partir dos DNAs extraídos dos 62 isolados de *Cryptococcus* spp. amplificando um produto do gene URA5 de aproximadamente 780 pares de base (pb) (Figura 16).

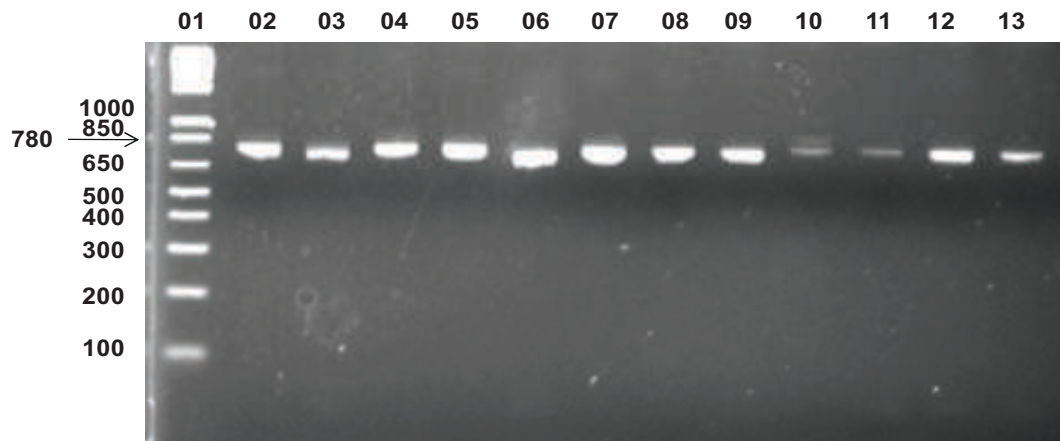


Figura 16. Fragmento de DNA correspondente ao produto de amplificação do gene URA5 de isolados clínicos de *Cryptococcus* spp., em gel de agarose a 3%. Linha 01: Marcador de peso molecular (Invitrogen – 1Kb); Linhas 02 – 13: Isolados clínicos de *Cryptococcus* spp.

Após a restrição dupla com *Sau96I* e *HhaI*, os perfis de restrição gerados foram comparados com os padrões, bem como com o esquema de mapa de restrição (Figura 17).

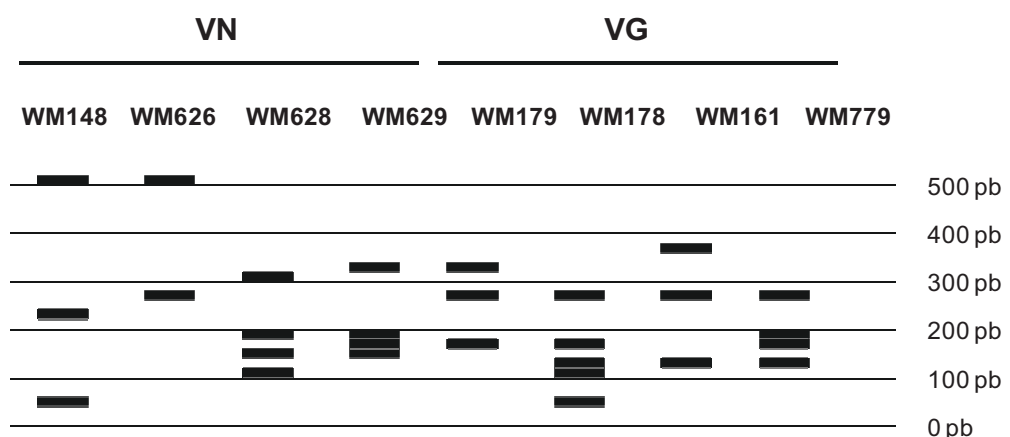


Figura 17. Mapa de restrição do produto de PCR do gene URA5 pelas enzimas *Sau96I* e *HhaI* dos padrões moleculares de *Cryptococcus* spp. WM 148 (VNI), WM 626 (VNII), WM 628 (VNIII), WM629 (VNIV), WM 179 (VGI), WM 178 (VGII), WM 175 (VGIII), e WM 779 (VGIV). Fonte: A AUTORA.

A análise genotípica mostrou que 98% (48/49) dos *C. neoformans* geraram perfis moleculares semelhantes ao genótipo VNI apresentando três bandas de aproximadamente 503, 231 e 61 pb, e 2% (01/49) semelhante ao genótipo VNII, com duas bandas de aproximadamente 503 e 274 pb; enquanto 100% (13/13) dos *C. gattii* geraram perfis semelhantes ao genótipo VGII, com cinco bandas de aproximadamente 275, 179, 138, 128 e 60 pb. A Figura 18 mostra um gel representativo dos perfis de restrição gerados pelos padrões de *Cryptococcus* spp. e a Figura 19 dos isolados clínicos.

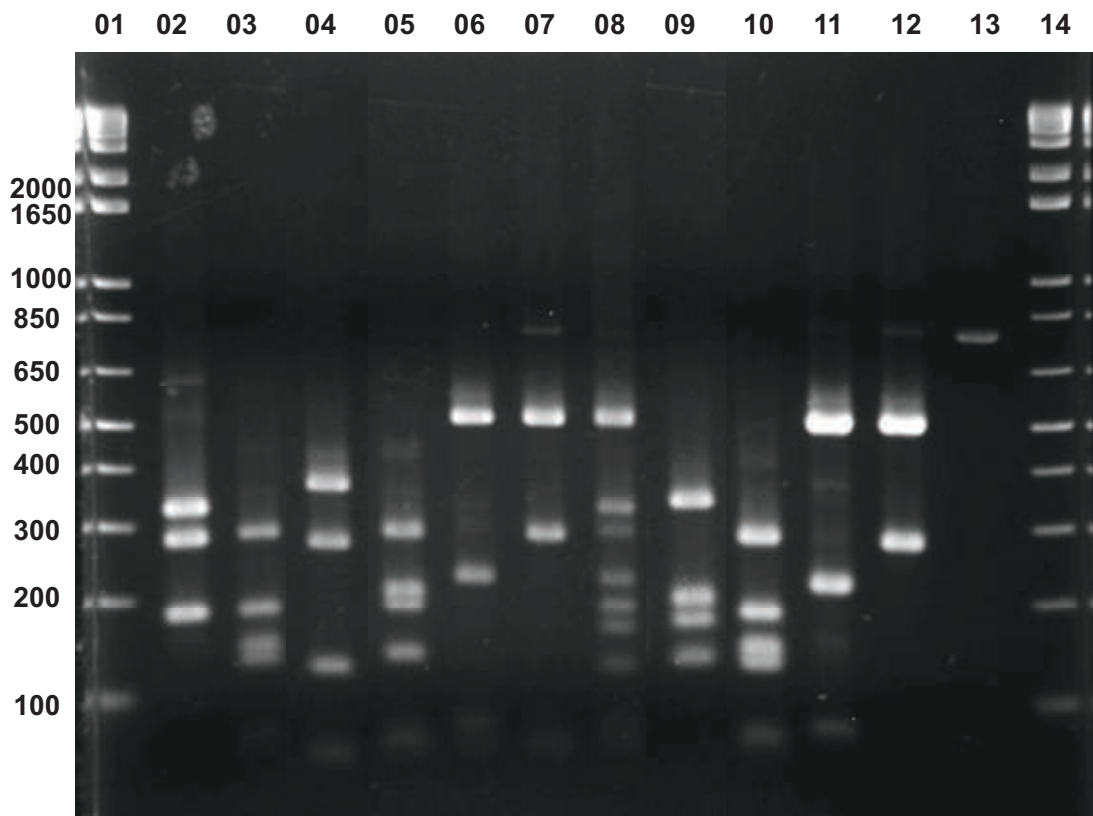


Figura 18. Perfil de RFLP do gene URA5 obtido por restrição dupla com *Sau96I* e *HhaI* de *Cryptococcus* spp. em gel de agarose a 3%. Linha 01 e 14 – marcador molecular; linhas 02 a 05 - genótipos VG I, VG II, VG III e VG IV; linhas 06 a 09; genótipos VNI, VNII, VNII e VNII; linha 10 – isolado clínico de *C. gattii*; Linhas 11 e 12 – isolados clínicos de *C. neoformans*; linha 13 – produto amplificado do gene URA5.

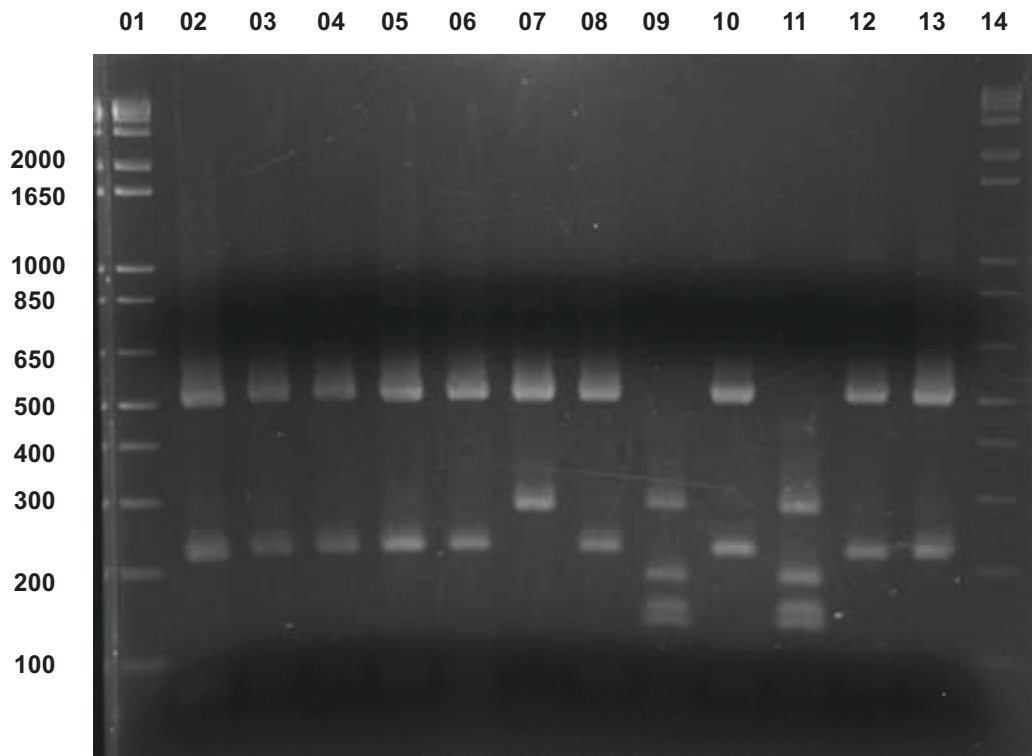


Figura 19. Perfis moleculares gerados por RFLP do gene URA5 de isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. em gel de agarose a 3%. Linhas: 1 e 14 - Marcador molecular 1Kb (Invitrogen). Linhas: 02-06, 08, 10, 12 e 13 – VNI. Linhas: 07 – VNII. Linhas: 09 e 11 – VGII.

A epidemiologia do *Cryptococcus* spp. tem sido amplamente estudada, principalmente após o aumento do número de casos devido à epidemia da SIDA no início dos anos 80. Apesar de sua incidência ter diminuído no mundo ocidental em meados da década de 90 devido ao uso da HAART, a meningite criptocócica é ainda uma das infecções fúngicas oportunistas com maior risco de vida em pacientes imunocomprometidos, sobretudo na África subsaariana e na Ásia (BICANIC et al, 2005; PARK et al, 2009). Recentemente, o aumento do número de casos sucedido pelo surto de criptococose em pacientes sem imunodepressão ocorrido no Canadá chamou a atenção da comunidade científica para a importância de se conhecer melhor a epidemiologia deste patógeno emergente (KIDD et al, 2004; CDC, 2010; GALANIS; MACDOUGALL, 2010).

No Brasil, os estudos que elucidam a distribuição e frequência de isolados de *Cryptococcus* spp. estão concentrados na região sudeste e centro-oeste do país. No Sul, Alves e colaboradores (2001) detectaram somente a espécie *C. neoformans* em 53 amostras isoladas de 38 pacientes na cidade de Porto Alegre (RS); já Casali e colaboradores (2003) analisando 105 isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. de diversos hospitais do estado do Rio Grande do Sul identificaram 8,6% de *C. gattii*. Na região sudeste, no estado de São Paulo, o estudo de Matsumoto e colaboradores (2007) relata *C. neoformans* como a única espécie dentre os 47 isolados de 35 pacientes; enquanto Almeida e colaboradores (2007), analisando 83 amostras clínicas sequenciais, encontraram 78 *C. neoformans* oriundos de 37 pacientes e quatro isolados de *C. gattii* de apenas um paciente. Já no estado de Minas Gerais, Da Silva e colaboradores (2008) isolaram 11,4% da espécie *C. gattii* nos 35 isolados pertencentes aos 35 pacientes do estudo.

Em relação à região centro-oeste, um estudo realizado com amostras do estado de Mato Grosso mostrou que 16,6% dos 26 isolados de 26 casos de criptococose, diagnosticados no Hospital Universitário Julio Müller da Universidade Federal de Mato Grosso, foram identificados como *C. gattii* (FAVALESSA et al, 2009); Souza e colaboradores (2009) encontraram apenas 4,8% de *C. gattii* quando avaliaram 84 isolados de 74 pacientes da cidade de Goiás. Por fim, no estado do Pará, região Norte, os dados de Dos Santos e colaboradores (2008) são os mais diferenciados do país mostrando um percentual de 50% de *C. gattii* em 56 isolados de 43 pacientes com meningite (Figura 20).

O nosso estudo é o primeiro a descrever a frequência das espécies, o perfil de sensibilidade e a determinação do genótipo de isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. no nordeste do Brasil. A distribuição encontrada na Bahia, 21% de *C. gattii* e 79% de *C. neoformans*, corrobora os achados descritos por Nishikawa e colaboradores (2003) que demonstraram *C. gattii* como a espécie mais predominante no norte-nordeste e *C. neoformans* no sul-sudeste do país. O percentual de 21% (13/62) de isolamento de *C. gattii* determinado pelo nosso estudo sugere, aparentemente, estar acima dos percentuais

encontrados nos estudos realizados das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste. No entanto, não nos é permitido inferir se este de fato é superior, pois a inclusão de isolados nos estudos descritos não foi realizada pela inclusão de pacientes. Acreditamos que a freqüência encontrada no nosso estudo seja mais representativa, visto que foi avaliado apenas um isolado de *Cryptococcus* spp. de cada paciente não havendo, portanto, repetições.

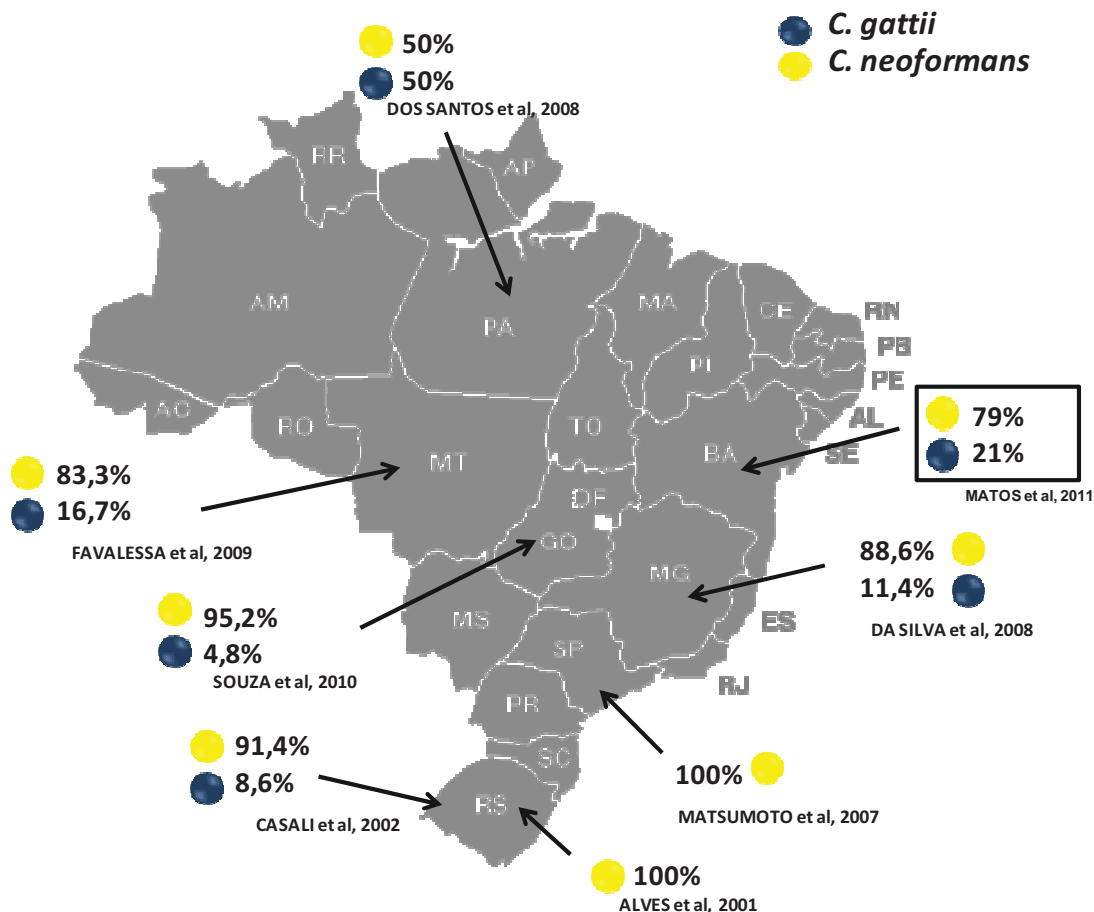


Figura 20. Distribuição da frequência de espécies de *Cryptococcus* spp. no Brasil. Mapa esquematizado apresentando a distribuição de espécies de isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. no Brasil pelos trabalhos publicados. Esferas amarelas: *Cryptococcus neoformans*; Esferas azuis: *Cryptococcus gattii*.

Além da distribuição fenotípica da população de *Cryptococcus* spp., a compreensão da distribuição da estrutura genotípica dessas leveduras, seja clínica ou ambiental, é mais uma ferramenta para o entendimento dos fatores de risco que estão associados a genótipos específicos, e para auxiliar a identificação da emergência de isolados altamente virulentos. Estudos com este escopo visam contribuir para uma resposta adequada de saúde pública, o que pode permitir uma intervenção rápida e eficaz para prevenir um surto da doença.

A avaliação genotípica dos nossos isolados através da técnica de RFLP do gene URA5 mostra a predominância do genótipo VNI entre os isolados de *C. neoformans*. Meyer e Trilles (2010) analisando a distribuição mundial dos tipos moleculares do complexo *C. neoformans* - *C. gattii* mostram que a infecção pelos quatro tipos moleculares existentes de *C. gattii* é substancialmente menos comum, em torno de 20%, enquanto que as infecções causadas pelos também quatro tipos moleculares de *C. neoformans*, se distribuí nos outros 80%. Os autores também publicaram dados demonstrando que o tipo molecular VNI do *C. neoformans* é o responsável pela maioria das infecções no mundo em pacientes imunocomprometidos e os tipos moleculares VGI e VGII de *C. gattii* como os mais frequentemente associados à infecção em imunocompetentes, compatível com este estudo.

Em um estudo avaliando a distribuição dos tipos moleculares de *Cryptococcus* spp. no Brasil, a partir de isolados de trabalhos já publicados no país e de coleções de microrganismos, mostrou que a distribuição dos genótipos em nosso país é semelhante aquela descrita mundialmente, com um maior percentual de tipos moleculares da espécie *C. neoformans* (72%), sendo o tipo molecular mais frequente o VNI, com 64%, seguido por VGII (21%), VNII (5%), VGIII (4%), VGI e VNIV (3% cada), e VNIII (<1%) (TRILLES et al, 2008).

Vários autores através da técnica de “PCR-fingerprinting” utilizando seqüências microsatélite-específicas do fago M13 e GACA, e RFLP do gene URA5 também demonstraram que o genótipo VNI é o padrão mais frequentemente encontrado nos isolados testados em seus respectivos países: Escandón e colaboradores (2006) na Colômbia, Morera-López e colaboradores (2005), na Espanha; Liaw e colaboradores (2009), em Taiwan; Chem e colaboradores (2010) na China e Choi e colaboradores (2010), na Coréia. No Brasil, através da mesma técnica, Casali e colaboradores (2003), no estado do Rio Grande do Sul; Igreja e colaboradores (2004) no Rio de Janeiro; Matsumoto e colaboradores (2007) no estado de São Paulo e Souza e colaboradores (2009) em Goiás, descrevem o VNI com o mesmo padrão dos isolados testados. No entanto, a presença de um isolado pertencente ao genótipo VNII em nossos resultados corroboram com os dados de Liaw e colaboradores (2009), Igreja e colaboradores (2004) e Matsumoto e colaboradores (2007) que demonstram a presença desse genótipo, porém, em menor percentual.

Quanto à genotipagem dos *C. gattii*, todos os nossos isolados foram classificados como pertencente ao genótipo VGII. Genótipo, que também, já foi relatado na Oceania (CHEN, S. et al, 2000) e Ásia (CHOI et al, 2010) e, atualmente, é considerado um patógeno emergente na América do Norte (BYRNES III et al, 2009) após a disseminação do surto ocorrido em indivíduos imunocompetentes na Ilha de Vancouver (Canadá), cuja origem remete ao continente australiano, onde a doença é endêmica. (KIDD et al, 2004; FRASER et al, 2003; DATTA et al, 2009; NGAMSKULRUNGROJ et al, 2011).

No Brasil, o tipo molecular VGII foi descrito como o segundo mais comum no país, sendo sua ocorrência mais frequente na macro região norte, que compreende as regiões, norte, nordeste e centro-oeste do país (TRILLES et al, 2008). No estado do Pará, Dos Santos e colaboradores (2008) demonstraram a ocorrência do genótipo VGII em 44,64% dos casos e o genótipo VGI em 5,26%, e apontaram o VGII como a maior causa de micose endêmica primária em indivíduos imunocompetentes, principalmente em crianças. A emergência mundial da infecção criptocócica por *C. gattii*, bem como os estudos que mostram a predileção aumentada do referido genótipo (VGII) em causar infecção em mamíferos, ratificam o potencial de virulência desta espécie e tornam a determinação de fatores de virulência importantes para o entendimento da patobiologia deste patógeno (LOCKHART; HARRIS, 2010; NGAMSKULRUNGROJ et al, 2011).

A infecção fúngica é determinada pela combinação de fatores que predisõem o hospedeiro e os que favorecem a sobrevivência e disseminação do patógeno. Quanto ao hospedeiro, já está bem estabelecido que a diminuição da capacidade imunológica é um fator determinante para o estabelecimento de infecções oportunistas; enquanto que, do ponto de vista do patógeno, os fatores de virulência são importantes para seu mecanismo de patogenicidade (MENDES-GIANNINI et al, 1996).

Dentre os fatores de virulência já descritos para *Cryptococcus* spp. estão à presença de cápsula polissacarídica, habilidade de crescimento a temperatura de 37°C, produção de melanina e expressão das enzimas proteinases, fosfolipases e urease (BUCHANAN; MURPHY, 1998; COX et al, 2001). Em nosso estudo detectamos alguns fatores de virulência que estão relacionados à patogênese da criptococose que contribuem tanto para colonização, quanto à invasão e evasão das defesas do hospedeiro.

Todos os isolados apresentaram crescimento a 37°C e produziram melanina após crescimento em ágar Níger. Em 1995, Wang e Casadevall associaram a produção de melanina de *Cryptococcus* spp. à capacidade da levedura de atuar como antioxidante, mas também de protegê-la quanto a integridade da sua parede celular na interferência da susceptibilidade aos antifúngicos e a temperatura extremas. No surto na ilha de Vancouver, no Canadá, a produção de melanina a 37°C foi um fator de virulência fortemente associado ao genótipo isolado (NGAMSKULRUNGROJ et al, 2009). A habilidade de crescimento na temperatura fisiológica humana também é determinante da virulência do complexo *C. neoformans* - *C. gattii* (PERFECT, 2006), visto que outras espécies do gênero, apesar de possuírem cápsula e/ou produzirem melanina, não são capazes de causar doença em mamíferos pela ausência desta habilidade.

Somente um dos 62 isolados avaliados, da espécie *C. gattii*, não apresentou a enzima urease. Até o momento, apenas cinco relatos na literatura reportam esse fenótipo, sendo dois ambientais e três isolados de indivíduos com SIDA (RUANE et al, 1988; LI; WU,

1992; BAVA et al, 1993; TANAKA et al, 2003; VARMA et al, 2006). Estudos recentes apontam a urease como um importante fator de disseminação da levedura, principalmente no mecanismo de transmigração para o SNC e alguns autores também associam a inibição dessa enzima com o aumento da sobrevivência em modelos animais, sendo assim um alvo candidato para o desenvolvimento de novos fármacos (OLSZEWSKI et al, 2004; SHI et al, 2010).

A contribuição das proteinases para a virulência microbiana está relacionada à destruição dos tecidos do hospedeiro e à digestão de proteínas imunologicamente importantes, como anticorpos e constituintes do complemento (KAMINISHI et al, 1995). O método utilizado para a pesquisa da enzima nos isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. no nosso estudo tem sido amplamente utilizado para isolados clínicos de *Candida* spp foi o ágar albumina bovina descrita por Ruchel e colaboradores (1982), porém, não detectamos qualquer atividade proteolítica.

A literatura traz conflitos quanto à presença de proteinases em *Cryptococcus* spp. e poucos são os trabalhos publicados que avaliam a presença desta enzima nessa levedura. Staib e colaboradores (1964) estudando a atividade proteolítica de 32 isolados não encontraram a atividade utilizando ágar com soro humano. Ahearn e colaboradores (1986) avaliando a presença de proteinase em leveduras de diversos gêneros, encontraram baixa atividade proteolítica em apenas 3 isolados de *Cryptococcus* spp. dos 8 testados utilizando três metodologias (liquefação de gelatina, hidrólise de albumina bovina e hidrólise de caseína). No entanto, Ruma-Hyanes e colaboradores (2000) encontraram atividade proteolítica utilizando ágar albumina bovina em todos os 32 isolados testados. Vidotto e colaboradores (2000) observaram a presença da enzima em 15 dos 19 isolados clínicos e 13 dos 16 isolados ambientais, bem como Chan e Tay (2009) que apenas não encontraram atividade em 4,2% dos isolados ambientais e 9,6% dos clínicos, ambos pela mesma metodologia. Já Chen e colaboradores (1996) comprovaram a presença desta enzima utilizando o sobrenadante de culturas, pois acreditam que atividade proteolítica em sobrenadantes pode ser o resultado da secreção de proteases extracelulares e/ou a liberação de proteases intracelulares.

A enzima fosfolipase está associada à virulência de *Cryptococcus* spp. pela sua participação na adesão e invasão tecidual através da destruição das membranas das células do hospedeiro (BARRETT-BEE et al, 1985; GANENDREN et al, 2006). A atividade fosfolipásica foi encontrada em 98,5% dos isolados, sendo observada uma alta atividade em 63% dos isolados e moderada em 35,5%, sem diferenças estatisticamente significativas entre as espécies. Nossos isolados demonstraram uma maior atividade fosfolipásica em relação aos 59% encontrados por Liaw e colaboradores (2009) em Taiwan e aos 42,5% descritos por Chan e Tay (2009) na Malásia. Os resultados destes últimos corroboram com

os nossos, uma vez que também não encontraram diferenças significativas da atividade de fosfolipase entre os isolados de *C. gattii* e *C. neoformans*.

Os fatores de virulência, além de aumentar a resistência do fungo *in vivo* ao sistema imune, podem impedir a ação de agentes antimicrobianos. No entanto, essa resistência, em sua maioria, não é detectada pelos testes de sensibilidade convencionais (COX et al, 2000; KWON-CHUNG et al, 2006; SINOVA et al, 2009).

Testes de susceptibilidade *in vitro* para isolados de *Cryptococcus* spp. não são rotineiramente recomendados durante a terapia inicial por duas principais razões: a resistência primária às drogas antifúngicas de primeira escolha não é um problema clínico significativo e os testes de susceptibilidade *in vitro*, incluindo métodos e pontos de corte para as espécies de *Cryptococcus*, ainda não foram validados. A resistência secundária a fluconazol é um problema emergente em algumas áreas do mundo, especialmente na África, onde este azol é amplamente prescrito e utilizado como terapia primária para a criptococose. Em geral os testes de sensibilidade devem ser reservados àqueles pacientes cuja terapia primária é falha, ou quando existe a exposição previa a droga antifúngica (PERFECT et al, 2010).

Apesar de ainda não serem recomendados na rotina laboratorial, os testes de susceptibilidade antifúngica são importantes ferramentas no conhecimento do perfil de sensibilidade aos antifúngicos, bem como para a vigilância das tendências das taxas de resistência. Os esforços no sentido de padronizar pontos de corte e metodologias para avaliação de sensibilidade de fungos frente aos antifúngicos são crescentes para leveduras não-*Candida*, sendo a maioria dos testes baseada nas técnicas de microdiluição e disco difusão, buscando uma melhor correlação clínico-laboratorial (GHANNOUM et al, 1996; PFALLER et al, 2004; 2011; ESPINELL-INGROFF et al, 2007).

O percentual de sensibilidade ao fluconazol encontrado em nosso estudo (74,2%) foi inferior aos descritos por outros trabalhos no Brasil, com percentuais de 100%, 97,1% e 78%, para os estados de Goiás (SOUZA et al, 2009), Minas Gerais (DA SILVA et al, 2008) e São Paulo (ALMEIDA et al, 2006), respectivamente. Porém, superior ao percentual descrito por Favalessa e colaboradores (2009) no estado do Mato Grosso, com apenas 72% de sensibilidade ao fluconazol, detectada pelo método do E-test. Esses resultados ressaltam a importância de uma vigilância das taxas de susceptibilidade a este antifúngico, visto sua ampla utilização no tratamento de infecções fúngicas mais frequentes.

Já com relação à sensibilidade ao itraconazol, o percentual de 80,6% encontrado no nosso estudo justifica a possibilidade de manutenção deste antifúngico como alternativa terapêutica, visto que a sensibilidade encontrada foi superior àquela obtida pelo fluconazol. Nossos dados se mostraram superiores aos 35% relatados por Almeida e colaboradores (2006) em avaliação de 83 isolados do estado de São Paulo e aos 76,9% descritos por

Favalessa e colaboradores (2009) de isolados de pacientes imunocompetentes no estado do Mato Grosso; no entanto, inferiores ao percentual de 94,3% dos 35 isolados do triângulo mineiro (DA SILVA et al, 2008) e aos 100% da cidade de Goiânia (SOUZA et al, 2009).

Portanto, de acordo com os números apresentados na determinação do perfil de susceptibilidade foi possível constatar a presença de resistência ao fluconazol e sensibilidade dose-dependente ao fluconazol e ao itraconazol em isolados de *Cryptococcus* spp. na região nordeste, mais especificamente no estado da Bahia. A partir da estratificação dos resultados de sensibilidade, foram encontradas diferenças significativas dessa resistência para os isolados da espécie *C. gattii*, quando comparado com os isolados de *C. neoformans*. Khan e colaboradores (2009) também encontraram diferenças entre isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* frente à voriconazol e fluconazol. Torres-Rodriguez e colaboradores (2008) concluíram que *C. gattii* é menos susceptível a azóis, principalmente fluconazol, quando comparado a isolados da espécie *C. neoformans*. Gomez-Lopez e colaboradores (2008) mostraram valores de CIM significativamente mais baixos para azóis nos *C. neoformans* do que os observados para *C. gattii*. Porém, Thompson III e colaboradores (2009) não encontraram diferenças entre as espécies. Esses dados corroboram com os achados descritos no nosso estudo e advertem quanto à importância do conhecimento da espécie envolvida na infecção.

Ainda são poucos os trabalhos que descrevem resistência a azóis em isolados clínicos de *Cryptococcus* spp., contudo, o que se observa é que esses relatos estão crescendo anualmente. Fernandes e colaboradores (2003) relataram um isolado de *C. neoformans* e três de *C. gattii* resistentes ao fluconazol em Goiânia; Chandénier e colaboradores (2004), na África e Cambodja, encontraram respectivamente, apenas 3 e 7 isolados com CIM ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$; Pfaller e colaboradores (2004) descrevem *C. neoformans* resistentes ao fluconazol, em Iowa; Favalessa e colaboradores (2009) relatam isolados dose-dependentes, tanto *C. neoformans* quanto *C. gattii*, e um isolado de *C. neoformans* com resistência tanto ao fluconazol quanto ao itraconazol. Apesar da tendência global na susceptibilidade antifúngica de *Cryptococcus* spp. sugerir um aumento das taxas de sensibilidade ao fluconazol no período de 1990 a 2004 de 72% para 96% (PFALLER et al, 2005), resultados mais atuais obtidos pelo grupo de vigilância global ARTEMIS DISCK, avaliando a susceptibilidade de 11.240 isolados de leveduras não-*Candida* por 10 anos, constataram uma resistência emergente ao fluconazol que aumentou durante o período de 1997 a 2007, de 7,3% para 11,7% entre os isolados de *Cryptococcus* spp., sendo as maiores taxas de resistência encontradas na América Latina com 13,6% (PFALLER et al, 2009). Alguns fatores poderiam estar associados ao aumento na resistência aos antifúngicos azólicos e que por sua vez são relacionados a situação socioeconômica de

determinados países, ou pelo uso freqüente e indiscriminado de fluconazol e a falta de acesso ao HAART (PFALLER et al, 2005)

O CLSI não traz diretrizes para interpretação de susceptibilidade a anfotericina B, entretanto, considera como prováveis isolados resistentes aqueles com CIM superiores a 1,0 µg/mL. Com base nessa interpretação foram detectados dois isolados de *C. neoformans* prováveis resistentes com valores de CIM de 2,0 µg/mL. Não foram encontradas diferenças de sensibilidade entre as espécies, e esta foi superior (96,8%), porém, próximo a taxa descrita por Da Silva e colaboradores (2008) de 94,3%, no triângulo mineiro, e inferior aos 100% de sensibilidade dos isolados de *Cryptococcus* dos estado de Goiás (SOUZA et al, 2009), São Paulo (ALMEIDA et al, 2006) e Mato Grosso (FAVALESSA et al, 2009). São poucos os relatos de resistência a anfotericina B em isolados de *Cryptococcus* spp., no entanto, no estado de Minas Gerais, Da Silva e colaboradores (2008) também relataram dois isolados de *C. neoformans* resistentes a droga.

Não foram encontradas diferenças de sensibilidade a 5-flucitosina entre as espécies. Este resultado foi discordante do encontrado por Gomez-Lopez e colaboradores (2008) na Espanha, cuja avaliação da atividade antifúngica frente a isolados de *Cryptococcus* spp. revelaram valores de CIM significativamente maiores entre isolados de *C. neoformans* quando comparados com aos obtidos pelo *C. gattii*, sendo a resistência observada em um isolado de *C. neoformans*. A avaliação da susceptibilidade de *Cryptococcus* spp. frente a 5-flucitosina é pouco documentada. No Brasil, dos trabalhos revisados somente o estudo realizado por Almeida e colaboradores (2009) avalia a sensibilidade de isolados de *Cryptococcus* spp., encontrando 29% de sensibilidade no estado de São Paulo, porém, nenhum isolado resistente, resultado semelhante ao encontrado em nosso estudo.

Apesar de apenas um isolado apresentar resistência a 5-flucitosina no nosso estudo, um percentual elevado de isolados (58%) foi classificado como sensíveis dose-dependente, com valor de CIM igual a 8,0 µg/mL. Resultado muito superior ao descrito por Pfaller e colaboradores (2005) que avaliaram a tendência global de susceptibilidade antifúngica no período de 1990 a 2004, quando o resultado acumulativo do período mostrou a CIM de 8 µg/mL em apenas 11% dos 1.811 isolados testados e 2% de resistência para a 5-flucitosina.

A avaliação da susceptibilidade, *in vitro*, por técnicas de diluição em caldo é considerada por diversos comitês como padrão ouro na determinação de sensibilidade de microrganismos, incluindo leveduras. No entanto, uma alternativa para a avaliação *in vitro* da sensibilidade de leveduras foi sugerida pelo CLSI em 2004, no documento M44, baseando-se no método de disco difusão, o que torna a determinação de susceptibilidade rápida, simples e viável de implantar na rotina laboratorial (PFALLER et al, 2004; BARRY et al, 2002; LASS-FLORT et al, 2010).

A concordância de resultados entre as técnicas de microdiluição e disco difusão tem sido mais frequentemente relatada para o fluconazol, e considerada satisfatória, utilizando os pontos de corte sugeridos pelo CLSI. A concordância global encontrada para o fluconazol, no nosso estudo, diferiu daquelas encontradas por outros autores. Espinel-Ingroff e colaboradores (2007) encontraram 96,4% de concordância avaliando 90 isolados de *Candida* spp., e 20 de *C. neoformans*, com 4,5% de erros classificados como menores. Já Pfaller e colaboradores (2004) avaliando o método para determinar a sensibilidade de 276 isolados clínicos de *Cryptococcus* spp., encontraram 86% de concordância, com 12% dos resultados discrepantes sendo considerados menores e 2% maiores. Matar e colaboradores (2003) avaliando 400 isolados de *Candida* spp. encontraram 89,9% de concordância, com 6,7% de discrepâncias consideradas menores e apenas 1% maiores. Semelhantes resultados foram encontrados por Barry e colaboradores (2002) com 93,5% de concordância, porém, aproximadamente 2% dos erros foram maiores.

Ao compararmos os resultados de sensibilidade apresentados no nosso estudo pelas duas técnicas executadas, a concordância global encontrada para o fluconazol foi de 75,8% sendo inferior a de outros trabalhos acima descritos, apresentando 20,9% dos erros considerados como menores e 1,6% como maiores. Esse resultado se deve, possivelmente, pelo percentual de isolados não sensíveis encontrados, bem como pelo número de isolados testados no nosso estudo. Apesar de utilizar como modelo para avaliação das técnicas de susceptibilidade aos antifúngicos, leveduras do gênero *Candida*, nosso estudo apresentou resultado semelhante ao descrito por Morace e colaboradores (2002), que encontraram 77,6% de concordância, avaliando 800 leveduras do gênero *Candida* spp, sendo 10,6% dos isolados não sensíveis a esta droga. Já os dados de Kiraz e colaboradores (2010) são diferentes com apenas 8% de concordância avaliando isolados de *C. glabrata*, espécie frequentemente associada com resistência inata ao fluconazol, corroborando com a idéia de que o percentual de isolados não sensíveis seria uma possível explicação para a diminuição da concordância entre os pontos de corte.

Outra consideração pertinente é que o documento M44, o qual propõe o protocolo para avaliação de sensibilidade antifúngica de leveduras por disco difusão, traz apenas pontos de corte para *Candida* spp., sem nenhuma diferenciação de interpretação de resultados para *Cryptococcus* spp., apesar de haver recomendação, no documento, de tempo de incubação para essas leveduras. Alguns autores relatam falhas na detecção de resistência a azóis e ressaltam diferenças de concordância para diferentes espécies de *Candida* spp., sendo as menores observadas para isolados de *C. glabrata* e *C. krusei*, no entanto, não existem relatos mostrando essa diferença quanto ao gênero em estudo (RUBIO et al, 2003; PFALLER et al, 2004; SIMS et al, 2006; KIRAZ et al, 2010).

Quanto à análise realizada para o itraconazol, observamos diferenças de concordância para os critérios de interpretação utilizados. Na avaliação dos pontos de corte descritos pelo NeoSensitabs encontramos concordância de 59,6%, com 40,3% dos erros classificados como menores, porém, sem erros maiores e muito maiores. Utilizando os mesmos critérios, Espinell-Ingroff e colaboradores (2007) encontraram 92,7% de concordância para este antifúngico e Kiraz e colaboradores (2010) avaliando outros pontos de corte, diferentes destes aqui avaliados (sensível = ≥ 15 mm; sensível dose-dependente = 10 – 14 mm e resistente = < 10 mm), encontraram apenas 14% de concordância entre as técnicas. Quando os resultados foram avaliados utilizando a interpretação proposta pela CECON, obtivemos um melhor desempenho, com 83,9% de concordância, e 16% dos erros considerados menores. Os dados acima descritos mostram a necessidade de estudos que avaliem pontos de corte para a técnica de disco difusão que melhor se adequem a resposta laboratorial obtida pela microdiluição em caldo.

Os melhores resultados de concordância global e de concordância categórica foram demonstrados pela avaliação da anfotericina B, com uma concordância de 98,4% entre as técnicas, percentual pouco menor daqueles obtidos por Espinel-Ingroff e colaboradores (2007) e Kiraz e colaboradores (2010) que encontraram concordância de 100% entre os resultados e nenhum erro de classificação. Apesar de 96,7% dos resultados classificados corretamente como sensíveis pela disco difusão no nosso estudo, os pontos de corte avaliados não foram discriminatórios para os isolados resistentes, sendo estes classificados erroneamente como sensíveis, responsáveis pelas discrepâncias observadas como muito maiores.

Os resultados menos favoráveis foram encontrados para a 5-flucitosina, visto que foi encontrada concordância em apenas 9,8% dos resultados. O guia de uso do NeoSensitabs não recomenda o uso do meio MHGM para avaliação por disco difusão pela presença de inibidores. Porém, não foram encontrados resultados discordantes destes quando a avaliação foi realizada utilizando outros meios indicados por outros autores como ágar Shadomy modificado, ágar RPMI acrescido com glicose e YNB acrescido com glicose, nem quando alterada a concentração dos discos para 10 vezes (dados não apresentados). Não foram encontrados estudos que avaliassem a concordância entre as técnicas para 5-flucitosina, apenas um trabalho avaliou a correlação entre resultados de CIM com diâmetros de halos de inibição, utilizando o ágar para morfologia de leveduras suplementado com tiamina, onde a regressão linear dos resultados explicou até 92,5% das associações, os resultados aqui apresentados foram bem discordantes, pois a correlação encontrada demonstrou associação em apenas 1,7%. No entanto, a técnica não foi avaliada no referido meio (UTZ; SHADOMY, 1977).

A correlação entre os valores de CIM e os diâmetros de halo de inibição para os antifúngicos testados, observada pelos valores de R, explicam menos de 50% da distribuição dos nossos resultados. Porém, a significância estatística só não foi observada para a 5-flucitosina. Espinel-Ingroff e colaboradores (2007) encontraram valores de R superiores aos encontrados no nosso estudo com 0,87 para fluconazol, 0,84 para itraconazol e 0,68 para anfotericina B, contudo, avaliaram 110 isolados, sendo 90 isolados de *Candida* spp. e apenas 20 de *Cryptococcus neoformans*.

A partir dos resultados encontrados na avaliação das concordâncias categóricas e na literatura anteriormente reportada, concluímos que os resultados classificados como sensíveis pela técnica de disco difusão possuem um melhor poder preditivo, mostrando que na ausência de falha metodológica, como a observada para a 5-flucitosina, o resultado classificado como sensível é melhor discriminado pela técnica de disco difusão quando comparado com as demais categorias, e apontamos a necessidade de adequação e avaliação de novos pontos de corte para leveduras do gênero *Cryptococcus* spp. pelos comitês para testes de sensibilidade, visto a emergente importância deste patógeno.

Os resultados pela técnica de disco difusão sofrem influencia de fatores técnicos, como concentração do inóculo fúngico, composição e pH do meio, temperatura e tempo de incubação. No entanto, esse método tem mostrado, além de boa acurácia e precisão, boa concordância como método de microdiluição em caldo (BARRY et al, 2002; LASS-FLORT et al, 2010). Apesar dos resultados satisfatórios obtidos nas análises de correlação e concordância, a avaliação aqui realizada é um estudo preliminar sendo necessários novos trabalhos no sentido de avaliar um maior número de isolados bem como encontrar soluções metodológicas para determinação da susceptibilidade frente a 5-flucitosina.

5.0. CONCLUSÕES

1. A frequência das espécies de *Cryptococcus* isolados de 62 casos de meningite criptocócica diagnosticados durante o período 2006 a 2010, no Hospital Especializado Couto Maia, mostrou 21% de *C. gattii* e 79% da espécie *C. neoformans*;
2. A diferenciação de genótipos durante os quatro anos do estudo mostrou que 100% dos isolados de *C. gattii* pertencem ao genótipo VGII, e 95,1% e 4,9% dos *C. neoformans*, respectivamente, ao genótipo VNI e VNII;
3. Todos os isolados de *Cryptococcus* spp. apresentaram pigmento melanínico e cresceram a 37°C, porém, um isolado da espécie *C. gattii* foi urease negativo. Em 63% dos isolados foi encontrada alta atividade fosfolipásica, no entanto, em nenhum foi detectada a atividade proteolítica, não apresentando diferenças para as espécies;
4. A avaliação da susceptibilidade detectou 4,8%, 3,2% e 1,6% de isolados de *Cryptococcus* spp. resistentes ao fluconazol, anfotericina B e 5-flucitosina, respectivamente, porém, nenhum resistente ao itraconazol;
5. A estratificação dos resultados de sensibilidade enfatiza a importância do conhecimento da espécie envolvida na infecção, visto que isolados de *C. gattii*, demonstraram uma menor susceptibilidade a antifúngicos azólicos, quando comparados a isolados da espécie *C. neoformans*;
6. A análise da correlação entre os valores de diâmetros de halos de inibição e concentração inibitória mínima associou menos de 50% dos resultados, no entanto, a significância estatística só não foi observada para a 5-flucitosina;
7. A técnica de disco difusão discrimina os isolados de *Cryptococcus* spp. sensíveis, todavia, recomendamos que o resultado diferente deste, apresentado por esta técnica, seja avaliado pela metodologia padrão de microdiluição em caldo.
8. Na avaliação da concordância dos pontos de corte para interpretação dos resultados de susceptibilidade, não foram encontradas diferenças para anfotericina B e 5-flucitosina, porém, para o itraconazol e fluconazol os pontos de corte sugeridos pela CECON foram superiores aos sugerido pelo NeoSensitabs.

6.0. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos de vigilância epidemiológica e microbiológicos se fazem necessários para compreensão da distribuição do *Cryptococcus* spp. na população, visando esclarecer fatores de risco para aquisição da infecção, bem como a associação dos genótipos específicos. A elucidação de nichos ecológicos desses microrganismos em nosso estado poderá delimitar regiões de risco para exposição de *C. gattii*, possibilitando assim contribuir com uma resposta adequada de saúde pública, que permita uma intervenção rápida e eficaz na prevenção de casos da doença na Bahia.

A análise de concordância e correlação entre as técnicas de avaliação de susceptibilidade refere-se a um estudo preliminar. Torna-se, portanto, indispensável à continuidade do estudo no sentido de avaliar um maior número de isolados e outros pontos de corte para interpretação de resultados de disco difusão, além da investigação de soluções metodológicas para avaliação da susceptibilidade frente a 5-flucitosina.

1. Incluir dados referentes ao pacientes e seu perfil clínico – laboratorial, afim de melhor compreender a distribuição da doença no nosso estado;
2. Determinar os tipos seqüências dos nossos isolados pela técnica de MLST (“Multilocus Sequence Typing”);
3. Determinar a proximidade clonal e a variabilidade genética de todos os isolados do estudo, através de técnicas de “Fingerprinting”;
4. Determinar os nichos ecológicos das espécies *C. gattii* e *C. neoformans* no nosso estado;
5. Definir os sorotipos dos isolados de *Cryptococcus* spp. por técnicas moleculares;
6. Discriminar o “mating type” dos isolados;
7. Monitorar as tendências de susceptibilidade dos isolados clínicos de *Cryptococcus* spp.;
8. Definir os mecanismos de resistência encontrada nos isolados *Cryptococcus* spp. aqui avaliados;
9. Incluir mais isolados na avaliação de concordância e correlação entre as técnicas de disco difusão e microdiluição em caldo;
10. Avaliar novos pontos de corte para interpretação de resultados da técnica de disco difusão;
11. Buscar soluções metodológicas para a avaliação *in vitro* da susceptibilidade a 5-flucitosina frente a leveduras.

AHEARN, D. G.; MEYERS, S. P.; NICHOLS, A. Extracellular Proteinases of Yeasts and Yeastlike Fungi. *Applied Microbiology*, v. 16, n. 9. p. 1370-1374, 1968.

ALMEIDA, A. M.F.; MATSUMOTO, M. T.; BAEZA, L. C.; OLIVEIRA E SILVA, R. B.; KLEINER, A. A. P.; MELHEM, M. S. C.; GIANNINI, M. J. S. M. Molecular typing and antifungal susceptibility of clinical sequential isolates of *Cryptococcus neoformans* from Sao Paulo State, Brazil. *FEMS Yeast Reseach*. n. 7, p. 152–164, 2007.

ALVES, S. H.; OLIVEIRA, L. T.; COSTA, J. M.; LUBECK, I.; CASALI, A. K.; VAINSTEIN, M. H. In vitro susceptibility to antifungal agents of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolated in southern of Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.43, n. 5, p. 267-270, 2001.

ANTINORI, S.; RADICE, A.; GALIMBERTI, L.; MAGNI, C.; FASAN, M.; PARRAVICINI, C. The Role of Cryptococcal Antigen Assay in Diagnosis and Monitoring of Cryptococcal Meningitis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, n.11, p. 5828–5829, 2005.

ARIKAN, S. Current status of antifungal susceptibility testing methods. *Medical Mycology*, v. 45, n.7, p. 569-587, 2007.

ARTAL, E. M. Diagnóstico histopatológico de las micosis. *Revista Iberoamericana de Micología*, v.21, p.1-9, 2004.

BARRETT-BEE, K.; HAYES, Y.; WILSON, R. G.; RYLEY, J. F. A Comparison of Phospholipase Activity, Cellular Adherence and Pathogenicity of Yeasts. *Journal of General Microbiology*. v.131,p. 1217-1221, 1985.

BARRY, A. L.; PFALLER, M. A.; RENNIE, R. P.; FUCHS, P. C.; BROWN, S. D. Precision and accuracy of fluconazole susceptibility testing by broth microdilution, estest, and disk diffusion methods. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 46, n. 6, p. 1781–1784, 2002.

BAVA, A.J.; NEGRONI, R.; BIANCHI, M. Cryptococcosis produced by a urease negative strain of *Cryptococcus neoformans*. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 41, n. 4, p. 428-32, 1995.

BENNETT, J. E. Flucytosine. *Annals of Internal Medicine*, n. 86, p. 260-264, 1977.

BICANIC, T.; HARRISON, T. S. Cryptococcal meningitis. *British Medical Bulletin*, v.72, p. 99-118, 2004.

BICANIC, T.; WOOD, R.; BEKKER, L. G.; DARDER, M.; MEINTJES, G.; HARRISON, T. S. Antiretroviral roll-out, antifungal roll-back: access to treatment for cryptococcal meningitis. *Lancet Infectious Diseases*. n. 5, p. 530–531, 2005.

BOEKHOUT, T.; BELKUM, A. V.; LEENDERS, A. C. A. P.; VERBRUGH, H. A.; MUKAMURANGWA, P.; SWINNE, D.; SCHEFFERS, W. A. Molecular Typing of *Cryptococcus neoformans*: Taxonomic and Epidemiological Aspects. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 47, n. 2, p. 432-442, 1997.

BOEKHOUT, T.; THEELEN, B.; DIAZ, M.; FELL, J. W.; HOP, W. C. J.; ABELN, E. C. A.; DROMER, F.; MEYER, W. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology*, v. 147, p. 891–907, 2001.

BOLANO, A.; STINCHI, S.; PREZIOSI, R.; BISTONI, F.; ALLEGRUCCI, M.; BALDELLI, F.; MARTINI, A.; CARDINALI, G. Rapid methods to extract DNA and RNA from *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Yeast Research*, v.1, p. 221-224, 2001.

BOTTS, M. R.; GILES, S. S.; GATES, M. A.; KOZEL, T. R.; HULL, C. M. Isolation and Characterization of *Cryptococcus neoformans* Spores Reveal a Critical Role for Capsule Biosynthesis Genes in Spore Biogenesis. *Eukaryotic Cell*, v. 8, n. 4, p. 595–605, 2009,

BOTTS, M. R.; HULL, C. M. Dueling in the lung: how *Cryptococcus* spores race the host for survival. *Current Opinion in Microbiology*, v. 13, n. 4, p. 437-442, 2010.

BUCHANAN, K. L.; MURPHY, J. W. What Makes *Cryptococcus neoformans* a Pathogen? *Emerging Infectious Diseases*, v. 4, n. 1, p. 71-83, 1998.

BYRNES III, E. J.; BILDFELL, R.; FRANK, S. A.; MITCHELL, T. G.; MARR, K.; HEITMAN, J. Molecular Evidence that the Vancouver Island *Cryptococcus gattii* Outbreak has Expanded into the United States Pacific Northwest. *Journal Infectious Diseases*. n. 199, p. 1081–1086, 2009.

BYRNES III, E. J.; LI, W.; LEWIT, Y.; MA, H.; VOELZ, K.; REN, P.; CARTER, D. A.; CHATURVEDI, V.; BILDFELL, R. J.; MAY, R. C.; HEITMAN, J. (2010) Emergence and Pathogenicity of Highly Virulent *Cryptococcus gattii* Genotypes in the Northwest United States. *PLoS Pathogens*, v.6, n.4, 2010.

CAMPBELL, L. T.; CARTER, D. A. Looking for sex in the fungal pathogens *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *FEMS Yeast Research*, v. 6, p. 588–598, 2006.

CASALI, A. K.; GOULART, L.; ROSA E SILVA, L. K.; RIBEIRO, A. M.; AMARAL, A. A.; ALVES, S. H.; SCHRANK, A.; MEYER, W.; VAINSTEIN, H. Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state of Rio Grande do Sul. *FEMS Yeast research*. n. 3, p. 405-415, 2003.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Emergence of *Cryptococcus gattii* — Pacific Northwest, 2004–2010. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, v. 59, p. 865-868, 2010.

CHAN, M. Y.; TAY, T. Enzymatic characterisation of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii* and other environmental *Cryptococcus* spp. *Mycoses*, v. 53, p. 26–31, 2009.

CHANDENIER, J.; ADOU-BRYN, K. D.; DOUCHET, C.; SAR, B.; KOMBILA, M.; SWINNE, D.; THERIZOL-FERLY, M.; BUISSON, Y.; RICHARD-LENOVLE, D. In vitro activity of amphotericin B, fluconazole, and voriconazole against 162 *Cryptococcus neoformans* isolates from Africa and Cambodia. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, n. 23, p. 506–508, 2004.

CHANG, Y. C.; STINS, M. F.; MCCAFFERY, F. M. J.; MILLER, G. F.; PARE, D. R.; DAM, T.; PAUL-SATYASEE, M. Cryptococcal Yeast Cells Invade the Central Nervous System via Transcellular Penetration of the Blood-Brain Barrier. *Infection and Immunity*, v. 72, n. 9, p. 4985–4995, 2004.

CHANG, Y.C.; WICKES, B.L.; MILLER, G.F.; PENOYER, L. A.; KWON-CHUNG, K. J. *Cryptococcus neoformans* STE12 a Regulates Virulence but Is Not Essential for Mating. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 191, n. 5, p. 871–881, 2000.

- CHARIYALERTSAK, S.; SIRISANTHANA, T.; SAENGWONLOEY, O.; NELSON, K. Clinical presentation and risk behaviors of patients with acquired immunodeficiency syndrome in Thailand, 1994–1998: Regional variation and temporal trends. *Clinical Infectious Disease*, v. 32, p. 955–962, 2001.
- CHARLIER, C.; NIELSEN, K.; DAOU, S.; BRIGITTE, M.; CHRETIEN, F.; DROMER, F. Evidence of a Role for Monocytes in Dissemination and Brain Invasion by *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity*, v. 77, n. 1, p. 120–127, 2009.
- CHARLIER, C.; NIELSEN, K.; DAOU, S.; BRIGITTE, M.; CHRETIEN, F.; DROMER, F. Evidence of a Role for Monocytes in Dissemination and Brain Invasion by *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity*, v.77, n. 1, p. 120–127, 2009.
- CHEM, M.; LI, C. Y.; WU, S. X.; TANG, X. T.; FENG, B.; YAO, Z. R.; PAN, W. H.; LIAO, H. Q.; QUAN, Z. X. Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* species complex isolates from HIV-positive and HIV-negative patients in southeast China. *Frontiers of Medicine in China*. n. 4, p. 117–126, 2010.
- CHEN, L.; BLANK, E. S.; CASADEVALL, A. Extracellular Proteinase Activity of *Cryptococcus neoformans*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 3, n. 5, p. 570–574, 1996.
- CHEN, S. C. A.; MULLER, M.; JIN ZHONG, Z.; WRIGHT, L. C.; SORRELL, T. C. Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*: A new virulence factor? *Journal Infectious Disease*, v. 175, p.414–420, 1997.
- CHEN, S.; SORRELL, T.; NIMMO, G.; SPEED, B.; CURRIE, B. et al. Epidemiology and host- and variety-dependent characteristics of infection due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zealand. *Clinical Infectious Disease*, v. 31, p. 499–508, 2000.
- CHEN, Y. C.; CHANG, S. C.; SHIH, C. C.; HUNG, C. C.; LUHBD, K. T.; PAN, Y. S. Clinical features and in vitro susceptibilities of two varieties of *Cryptococcus neoformans* in Taiwan. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. n. 36, p. 175–83, 2000.
- CHERNIAK, R.; VALAFAR, H.; MORRIS, L. C.; VALAFAR, F. *Cryptococcus neoformans* Chemotyping by Quantitative Analysis of 1H Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Glucuronoxylomannans with a Computer-Simulated Artificial Neural Network *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 5, n.2, p. 146–159, 1998.
- CHOI Y. H.; NGAMSKULRUNGROJ, P.; VARMA, A.; SIONOV, E.; HWANG, S. M.; CARRICONDE, F.; MEYER, W.; LITVINTSEVA, A. P.; LEE, W. G.; SHIN, J. H.; KIM, E. C.; LEE, K. W.; CHOI, T. Y.; LEE, Y. L.; KWON-CHUNG, K. J. Prevalence of the VN1c genotype of *Cryptococcus neoformans* in non-HIV-associated cryptococcosis in the Republic of Korea. *FEMS Yeast Reseach*, v. 10, p. 769–778, 2010.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved standard-Third Edition. CLSI document M27-A3. Wayne, PA, 2008.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Guideline- Second Edition. CLSI document M44-A2, Wayne, PA 2009.
- COLLINS, H. L.; BANCROFT, G. J. Encapsulation of *Cryptococcus neoformans* impairs antigen-specific T-cell responses. *Infection and Immunity*, v. 59, p. 3883–3888, 1991.

COX, G. M.; MCDADE, H. C.; CHEN, S. C. A.; TUCKER, S. C.; GOTTFREDSSON, M.; WRIGHT, L. C.; SORRELL, T. C.; LEIDICH, S. D.; CASADEVALL, A.; GHANNOUM, M. A.; PERFECT, J. R. Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology*, v. 39, n. 1, p. 166-175, 2001.

COX, G. M.; JEE, J. M.; COLE, G. T.; CASADEVALL, A.; PERFECT, J. R. Urease as a Virulence Factor in Experimental Cryptococcosis. *Infection and Immunity*, v. 68, n.2, p. 443-448, 2000.

CRÍPTOCOCOSE. [2009?]. Figura colorida. Disponível em: < http://criptococosenaenfermagem.blogspot.com/2009_11_01_archive.html>. Acesso em: 13 de jan. 2010.

CURRIE, B. P.; FREUNDLICH, L. F.; SOTO, M. A.; CASADEVALL, A. False-Negative Cerebrospinal Fluid Cryptococcal Latex Agglutination Tests for Patients with Culture-Positive Cryptococcal Meningitis. *Journal of Clinical Microbiology*, v.31, n.9, p. 2519-2522, 1993.

D'SOUZA, C. A.; J. W. KRONSTAD; G. TAYLOR; R. WARREN; M. YUEN, et al. 2011. Genome variation in *Cryptococcus gattii*, an emerging pathogen of immunocompetent hosts. *mBio*, v. 2, n. 1, 2011.

DARZÉ, C.; LUCENA, R.; GOMES, I.; MELO, A. Características clínicas laboratoriais de 104 casos de meningoencefalite criptocócica. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 33, n.1, p. 21-26, 2000.

DA SILVA, P. R.; RABELO, R. A. S.; TERRA, A. P. S.; TEIXEIRA, D. N. S. Susceptibility to antifungal agents among *Cryptococcus neoformans* varieties isolated from patients at a university hospital. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, n. 41, p. 158-162, 2008.

DATTA, K.; BARTLETT, K. H.; BAER, R.; BYRNES, E.; GALANIS, E.; HEITMAN, J.; HOANG, L.; LESLIE, M. J.; MACDOUGALL, L.; MAGILL, S. S.; MORSHED, M. G.; MARR, K. A. Spread of *Cryptococcus gattii* into Pacific Northwest Region of the United States. *Emerging Infectious Diseases*, v. 15, n. 8, p. 1185-1191, 2009.

DEL AGUILA, E. M.; SILVA, J. T.; PASCHOALIN, V. M. F.. Expression of the yeast calcineurin subunits CNA1 and CNA2 during growth and hyper-osmotic stress. *FEMS Microbiology Letters*, v. 221, p.197-202, 2003.

DOS SANTOS, W. R.; MEYER, W.; WANKE, B.; COSTA, S. P. S. E.; TRILLES, L.; NASCIMENTO, J. L. M.; MEDEIROS, R.; MORALES, B. P.; BEZERRA, C. C. F.; MACÊDO, R. C. L.; FERREIRA, S. O.; BARBOSA, G. G.; PEREZ, M. A.; NISHIKAWA, M. M.; LAZÉRA, M. S. Primary endemic *Cryptococcus gattii* by molecular type VGII in the state of Pará, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. n. 103, p. 813-818, 2008.

ENG, R. K.; PERSON, A. Serum Cryptococcal Antigen Determination in the Presence of Rheumatoid Factor. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 14, n. 6, p. 700-70, 1981.

ENGLER, H. D.; SHEA, Y. R. Effect of Potential Interference Factors on Performance of Enzyme Immunoassay and Latex Agglutination Assay for Cryptococcal Antigen. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 32, n. 9, p. 2307-2308, 1994.

ESCANDÓN, P.; SÁNCHEZ A.; MARTÍNEZ, M.; MEYER, W.; CASTAÑEDA, E. Molecular epidemiology of clinical and environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex reveals a high Genetic diversity and the presence of the molecular type VGII mating type a in Colombia. *FEMS Yeast Research*, v. 6, p. 625-635, 2006.

ESPINELL-INGROFF, A.; CANTON, E.; GIBBS, D.; WANG, A. Correlation of Neo-Sensitabs Tablet Diffusion Assay Results on Three Different Agar Media with CLSI Broth Microdilution M27-A2 and Disk Diffusion M44-A Results for Testing Susceptibilities of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans* to Amphotericin B, Caspofungin, Fluconazole, Itraconazole, and Voriconazole. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 45, n. 3, p. 858–864, 2007.

EUCAST. Subcommittee of antifungal susceptibility testing of the European Committee for Susceptibility Testing of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Disease. EUCAST Definitive Document EDef7: Method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeast. *Clinical Microbiology Infection*, v. 14, p.398-405, 2008.

FAVALESSA, O. C.; RIBEIRO, L. C.; TADANO, T.; FONTES, C. J. F.; DIAS, F. B.; COELHO, B. P. A.; HAHN, R. C. First description of phenotypic profile and *in vitro* drug susceptibility of *Cryptococcus* spp yeast isolated from HIV-positive and HIV-negative patients in State of Mato Grosso. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, n. 42, p. 661-665, 2009.

FELDMESSER, M.; HARRIS, C.; REICHBERG, S.; KHAN, S.; CASADEVALL, A. Serum cryptococcal antigen in patients with AIDS. *Clinical Infectious Disease*, v. 23, p. 827–830, 1996.

FERNANDES, O. D. F.; PASSOS, X. S.; SOUZA, L. K. H.; MIRANDA, A. T. B.; CERQUEIRA, C. H. P.; SILVA, M. D. R. In vitro susceptibility characteristics of *Cryptococcus neoformans* varieties from AIDS patients in Goiânia, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, n. 98, p. 839–41, 2003.

FINDLEY, K.; RODRIGUEZ-CARRES, M.; METIN, B.; KROISS, J.; FONSECA, A.; VILGALYS, R.; HEITMAN, J. Phylogeny and phenotypic characterization of pathogenic *Cryptococcus* species and closely related saprobic taxa in the Tremellales., *Eukaryotic Cell*, v. 8, n. 3, p. 353-361, 2009.

FISHER, F.; COOK, N. B. *Micologia: fundamentos e diagnóstico*. Rio de Janeiro: Revinter, 2001. p. 210.

FRANZOT, S. P.; FRIES, B. C.; CLEARE, W.; CASADEVALL, A. Genetic Relationship between *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* Strains of Serotypes A and D. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 36, n. 8, p. 2200–2204, 1998.

FRANZOT, S. P.; SALKIN, I. F.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: Separate Varietal Status for *Cryptococcus neoformans* Serotype A Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 37, n. 3, p. 838–840, 1999.

FRASER, J. A.; SUBARAN, R. L.; NICHOLS, C. B.; HEITMAN, J. Recapitulation of the sexual cycle of the primary fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*: implications for an outbreak on Vancouver Island, Canada. *Eukaryotic Cell*, v.2, p.1036–1045, 2003.

FRIES, B. C.; CHEN, F.; CURRIE, B. P.; CASADEVALL, A. Karyotype Instability in *Cryptococcus neoformans* Infection. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 34, n.6, p. 1531–1534, 1996.

GALANIS, E.; MACDOUGALL, L. Epidemiology of *Cryptococcus gattii*, British Columbia, Canada, 1999–2007. *Emerging Infectious Diseases*, v. 16, n. 2, p. 251-257, 2010.

GALITSKI, T.; SALDANHA, A. J.; STYLES, C. A.; LANDER, E. S.; FINK, G. R. Ploidy regulation of gene expression. *Science*, n. 285, p. 251–254, 1999.

GANENDREN, R.; CARTER, E.; SORRELL, T.; WIDMER, F.; WRIGHT, L. Phospholipase B activity enhances adhesion of *Cryptococcus neoformans* to a human lung epithelial cell line. *Microbes Infection*, v. 8, p. 1006–1015, 2006.

GAZZONI, A. F.; PEGAS, K. L.; SEVERO, L. C. Técnicas histopatológicas no diagnóstico de criptococose por *Cryptococcus* deficiente de cápsula: relato de caso. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 41, n.1, p. 76-78, 2008.

GHANNOUM, M.A.; REX, J. h.; GALGIANI, J. N. Susceptibility Testing of Fungi: Current Status of Correlation of In Vitro Data with Clinical Outcome. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 34, n. 3, p. 489–495, 1996.

GHANNOUM, M. A. Potential Role of Phospholipases in Virulence and Fungal Pathogenesis *Clinical Microbiology Reviews*, v. 13, n. 1, p. 122–143, 2000.

GILES, S. S.; DAGENAIS, T. R. T.; BOTTS, M. R.; KELLER, N. P.; HULL, C. M. Elucidating the Pathogenesis of Spores from the Human Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans* *Infection and Immunity*, v. 77, n.8, p. 3491–3500, 2009.

GOMES-LOPEZ, A.; ZARAGOZA, O.; DOS ANJOS MARTINS, M.; MELHEM, M. C.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; CUENCA-ESTRELLA, M. *In vitro* susceptibility of *Cryptococcus gattii* clinical isolates. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 14, n.7, p.716-730, 2008.

GRANADOS, D. P.; CASTANEDA, E. Isolation and characterization of *Cryptococcus neoformans* varieties recovered from natural sources in Bogotá, Colombia, and study of ecological conditions in the area. *Microbial Ecology*, v. 49, n. 2, p. 282–290, 2005.

HAMILTON, J. R.; NOBLE, A.; DENNING, D. W.; STEVENS, D. A. Performance of *Cryptococcus* Antigen Latex Agglutination Kits on Serum and Cerebrospinal Fluid Specimens of AIDS Patients before and after Pronase Treatment. *Journal of Clinical Microbiology*, v.29, n. 2, p. 333-339, 1991.

HEELAN, J. S.; CORPUS, L.; KESSIMIAN, N. False-Positive Reactions in the Latex Agglutination Test for *Cryptococcus neoformans* Antigen. *Journal of Clinical Microbiology*, v.29, n. 6, p. 1260-1261, 1991.

HOLMES, C. B.; LOSINA, E.; WALENSKY, R. P.; YAZDANPANA, Y.; FREEDBERG, K. Review of human immunodeficiency virus type 1-related opportunistic infections in Sub-Saharan Africa. *Clinical Infectious Disease*, v. 36, p. 652–662, 2003.

HOSPENTHAL, D. R.; BENNETT, J. E. Flucytosine Monotherapy for Cryptococcosis. *Clinical Infectious Diseases*, v. 23, p. 260–4, 1998.

IGREJA, R. P.; LAZERA, M. S.; WANKE, B.; GALHARDO, M. C.; KIDD, S. E.; MEYER, W. Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients of the Brazilian city, Rio de Janeiro. *Medical Mycology*, n. 42, p. 229–238, 2004.

JACOBSON, E. S.; TINNELL, S. B. Antioxidant Function of Fungal Melanin. *Journal of Bacteriology*, v.175, n.21, p. 7102-7104, 1993.

JOHNSTON, S. A.; MAY, R. C. The Human Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans* Escapes Macrophages by a Phagosome Emptying Mechanism That Is Inhibited by Arp2/3 Complex-Mediated Actin Polymerisation. *PLoS Pathogens*, v. 6, n. 8, 2010.

JOSEPH-HORNE, T.; HOLLOMON, D.; LOEFFLER, R. S. T; KELLY, S. Cross-Resistance to Polyene and Azole Drugs in *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 39, n. 7, p. 1526–1529, 1995.

KAMINISHI, H.; MIYAGUCHI, H.; TAMAKI, T.; SUENAGA, N.; HISAMATSU, M.; MIHASHI, I.; MATSUMOTO, H.; MAEDA, H.; HAGIHARA, Y. Degradation of Humoral Host Defense by *Candida albicans* Proteinase. *Infection and Immunity*, v. 63, n. 3, p. 984–988, 1995.

KELLY, S. L.; LAMB, D. C.; TAYLOR, M.; CORRAN, A. J.; BALDWIN, B. C.; POWDERLY, W. G. Resistance to amphotericin B associated with defective sterol delta 8-7 isomerase in a *Cryptococcus neoformans* strain from an AIDS patient. *FEMS Microbiology Letters*, v. 122, p. 39-42, 1994.

KHAN, Z. U.; RANDHAWA, H. S.; CHEHADEH, A.; KOWSHIK, T.; CHANDY, R. *Cryptococcus neoformans* serotype A and *Cryptococcus gattii* serotype B isolates differ in their susceptibilities to fluconazole and voriconazole. *International Journal of Antimicrobial Agents*. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2008.11.007, 2009.

KIDD, S. E.; HAGEN, F.; TSCHARKE, R. L.; HUYNH, M.; BARTLETT, K. H.; FYFE, M. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia Canada). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v. 101, n. 17, p. 258–63, 2004.

KIERTIBURANAKUL, S.; WIROJTANANUGOON, S.; PRACHARKTAM, R.; SUNGKANUPARPH, S. Cryptococcosis in human immunodeficiency virus-negative patients. *International Journal of Infectious Disease*. v. 10, p. 72-78, 2006.

KIRAZ, N.; DAG, I.; OZ, Y.; YAMAC, M.; KIREMITCI, A.; KASIFOGLU, N. Correlation between broth microdilution and disk diffusion methods for antifungal susceptibility testing of caspofungin, voriconazole, amphotericin B, itraconazole and fluconazole against *Candida glabrata*. *Journal of Microbiological Methods*, v. 82, n.2, p. 136-140, 2010.

KRONSTAD, J. W.; ATTARIAN, R.; CADIEUX, B.; CHOI, J.; D'SOUZA, C. A.; GRIFFITHS, E. J.; GEDDES, J. M. H.; HU, G.; JUNG, W. H.; KRETSCHMER, M.; SAIKIA, S.; WANG, J. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. *Nature reviews. Microbiologia*, v.9, p. 193-203, 2011.

KWON-CHUNG, K. J. A new genus, *Filobasidiella*, the perfect state of *Cryptococcus neoformans*. *Mycologia*, n. 67, p. 1197–200, 1975.

KWON-CHUNG K. J. A new species of *Filobasidiella*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans* B and C serotypes. *Mycologia*, v. 68, n. 4, 1976a.

KWON-CHUNG, K. J. Morphogenesis of *Filobasidiella neoformans*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans*. *Mycologia*, v.68, p. 821-833, 1976b.

KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. Distribution of alpha and a mating types of *Cryptococcus neoformans* among natural and clinical isolates. *American Journal of Epidemiology*, v. 108, p. 337-340, 1978.

KWON-CHUNG, K. J.; POLACHECK, I.; BENNETT, J. E. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C). *Journal Clinical Microbiology*, n. 15, p. 535 -537, 1982.

KWON-CHUNG, K. J.; WICKES, B. L.; BOOTH, J. L.; VISHNIAC, H. S.; BENNETT, J. E. Urease Inhibition by EDTA in the Two Varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity*, v. 55, n.8, p. 1751-1754, 1987.

KWON-CHUNG, K. J.; EDMAN, J. C.; WICKES, B. L. Genetic association of mating types and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity*, v. 60, p. 602–5, 1992.

KWON-CHUNG, K. J.; VARMA, A. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? *FEMS Yeast Research*, n. 6, p. 574–587, 2006.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. *Tratado de Micologia Médica*, Sarvier, São Paulo, 2002.

LAMB, D.C.; CORRAN, A.; BALDWIN, B.C.; KWON-CHUNG, J.; KELLYA, S. L. Resistant P45051A1 activity in azole antifungal tolerant *Cryptococcus neoformans* from AIDS patients. *FEBS Letters*, v. 368, p. 326-330, 1995

LARONE, D. H. *Medical important fungi: a guide to identification*. 4 ed. ASM Press, Washington, 1995.

LARSSON, B. S. Interaction Between Chemicals and Melanin. *Pigment cell Resch*, v. 6, p. 127-133, 1993.

LASS-FLÖRL, C.; PERKHOFER, S.; MAYR, A. *In vitro* susceptibility testing in fungi: a global perspective on a variety of methods. *Mycoses*, v.53, n.1, p.1-11, 2010.

LAZÉRA, M. S.; IGREJA, R. P. WANKE, B. Criptococose. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. *Micologia Médica à luz de autores contemporâneos*. 1 ed. Rio de janeiro: Guanabara Koogan, 2004. cap. 24, p. 252-264

LEE, Y.; WANG J.; SUN, H.; CHEN, Y. Comparisons of clinical features and mortality of cryptococcal meningitis between patients with and without human immunodeficiency virus infection. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, p. 1-8, 2011.

LENGELER, K. B.; FOX, D. S.; FRASER, J. A.; ALLEN, A.; FORRESTER, K.; DIETRICH, F. S.; HEITMAN, J. Mating-type locus of *Cryptococcus neoformans*: a step in the evolution of sex chromosomes. *Eukaryotic Cell*, v. 1, p. 704-718, 2002.

LESTER, S. J.; MALIK, R.; BARTLETT, K. H.; DUNCAN, C. G. Cryptococcosis: update and emergence of *Cryptococcus gattii*. *Veterinary Clinical Pathology*, p.1-14, 2011.

LI, A.; WU, S. An urease negative *Cryptococcus neoformans*. *Wei Sheng Wu Xue Bao*, v. 32, n. 1, p. 68-71, 1992.

LIAW, S. J.; WU, H. C.; HSUEH, P.R. Microbiological characteristics of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* in Taiwan: serotypes, mating types, molecular types, virulence factors, and antifungal susceptibility. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 16, p. 696–703, 2010.

- LIN, X.; HEITMAN, J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annual Review of Microbiology* n. 60, p. 69–105, 2006.
- LIN, X.; HULL, C. M.; HEITMAN, J. Sexual reproduction between partners of the same mating type in *Cryptococcus neoformans*. *Nature*, v. 434, p. 1017- 1021, 2005.
- LOCKHART, S. R.; HARRIS, J. *Cryptococcus gattii*: Clinical Importance and Emergence in North America. *Current Fungal Infections*. Rep. doi:10.1007/s12281-010-0021-y, 2010.
- LU, H.; ZHOU, Y.; YIN, Y.; PAN, X.; WENG, X. Cryptococcal Antigen Test Revisited: Significance for Cryptococcal Meningitis Therapy Monitoring in a Tertiary Chinese Hospital *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, n. 6, p. 2989–2990, 2005.
- MA, M.; CROUDACE, J. E.; LAMMAS, D. A.; MAY, R. C. Expulsion of Live Pathogenic Yeast by Macrophages. *Current Biology*, v. 16, p. 2156–2160, 2006.
- MA, M.; HAGENB, F.; STEKEL, D. J.; JOHNSTON, S. A.; SIONOV, E.; FALK, R.; POLACHEK, I.; BOEKHOUT, T.; MAYA, R. C. The fatal fungal outbreak on Vancouver Island is characterized by enhanced intracellular parasitism driven by mitochondrial regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 106, n. 31, p. 12980-12985, 2009.
- MARTINEZ, L.R.; GARCIA-RIVERA, J.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotype D) strains are more susceptible to heat than *C. neoformans* var. *grubii* (serotype A) strains. *Journal Clinical Microbiology*, v. 39, n. 9, p. 3365–3367, 2001.
- MATAR, M. J.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; PAETZNICK, V. L.; RODRIGUEZ, J. R.; CHEN, E.; REX, J. H. Correlation between E-Test, Disk Diffusion, and Microdilution Methods for Antifungal Susceptibility Testing of Fluconazole and Voriconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 47, n.5, 2003.
- MATSUMOTO, M. T.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; BAZEA, L. C.; MELHEM, M. S. C.; MENDES GINNINI, M. J. S. Genotyping, serotyping and determination of mating-type of *Cryptococcus neoformans* clinical isolates from São Paulo state, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, n.49, p. 41-47, 2007.
- MCCLELLAND, C. M.; CHANG, Y. C.; VARMA, A.; KWON-CHUNG, K. J. Uniqueness of the mating system in *Cryptococcus neoformans*. *Trends in Microbiology*, v. 12, n. 5, p. 208-212, 2004.
- MCMANUS, E. J.; JONES, J. M. Detection of a *Trichosporon beigelii* Antigen Cross-Reactive with *Cryptococcus neoformans* Capsular Polysaccharide in Serum from a Patient with Disseminated *Trichosporon* Infection. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 21, n.5, p. 681-685, 1985.
- MELCHER, G. P.; REED, K. D.; RINALDI, M. G.; LEE, J. W.; PIZZO, P. A.; WALSH, T. J. Demonstration of a Cell Wall Antigen Cross-Reacting with Cryptococcal Polysaccharide in Experimental Disseminated *Trichosporon* Infection. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 29, n. 1, p. 192-196, 1991.
- MENDES-GIANNINI, M. J. S.; RICCI, T. A.; HANNA, S. A.; SALINA, M. A. Fatores envolvidos na patogênese fúngica. *Revista de Ciências Farmacêuticas*, v. 18, n.2, p.207-299, 1997.

MESSER, S. A.; KIRBY, J. T.; SADER, H. S.; FRITSCHER, T. R.; JONES, R. N. initial results from a longitudinal international surveillance programme for anidulanfungin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 54, n. 6, p.1051-1056, 2004.

MEYER, W.; CASTANEDA, A.; JACKSON, S.; HUYNH, M.; CASTANEDA, E. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerging Infectious Disease*, n. 9, p. 189–195, 2003.

MEYER, W.; MARSZEWSKA, K.; AMIRMOSTOFINA, M.; IGREJA, R. P.; HARDTKE, C.; METHLING, K.; et al. Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by PCR-fingerprinting and RAPD. A pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. *Electrophoresis*. v. 20, p.1790–9, 1999.

MEYER, W.; TRILLES, L. Genotyping of the *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* species complex. *Australian Biochemistry*, v. 41, n.1, p. 11-15, 2010.

MICHELL, T. G.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis in the Era of AIDS—100 Years after the Discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 8, n. 4, p. 515–548, 1995.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Dados e pesquisa em DST e AIDS. Coordenação do programa nacional de DTS/AIDS. Brasília, 2002. Disponível em: <www.aids.gov.br> Acesso em: 20 set. 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Dados e pesquisa em DST e AIDS. Coordenação do programa nacional de DTS/AIDS. Brasília, 2010. Disponível em: <www.aids.gov.br/pagina/aids-no-brasil> Acesso em: 06 jul. 2011.

MIRZA, S. A.; PHELAN, M.; RIMLAND, D.; GRAVISS, E.; HAMILL, R.; BRANDT, M. E.; GARDNER, T.; SATTAH, M.; LEON, G. P.; BAUGHMAN, W.; HAJJEH, R. A. The Changing Epidemiology of Cryptococcosis: An Update from Population-Based Active Surveillance in 2 Large Metropolitan Areas, 1992–2000. *Clinical Infectious Diseases*, v.36, p. 789–94, 2003.

MITCHELL, D. H.; SORRELL, T. C.; ALLWORTH, A. M. Cryptococcal disease of the CNS in immunocompetent hosts: influence of cryptococcal variety on clinical manifestations and outcome. *Clinical Infectious Disease*, v.20, p. 611–6, 1995.

MONDON, P.; PETTER, R.; AMALFITANO, G.; LUZZATI, R.; CONCIA, E.; POLACHECK, I.; KWON-CHUNG, K. J. Heteroresistance to Fluconazole and Voriconazole in *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 43, n.8, p. 1856–1861, 1999.

MORACE, G. et al. Multicenter Comparative Evaluation of Six Commercial Systems and the National Committee for Clinical Laboratory Standards M27-A Broth Microdilution Method for Fluconazole Susceptibility Testing of *Candida* Species. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, n. 8, 2002.

MORERA-LÓPEZ, Y.; TORRES-RODRÍGUEZ, J. M.; JIMÉNEZ-CABELLO, T.; BARÓ-TOMÁS, T.; ALÍA-APONTE, C.; LÁZERA, M. S. DNA fingerprinting pattern and susceptibility to antifungal drugs in *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* isolates from Barcelona city and rural environmental samples. *Mycopathologia*, v. 160, p. 9-14, 2005.

NADROUS, R. H. F.; ANTONIOS, V. S.; TERRELL, C. L.; JAY, H. Nonimmunocompromised Patients Pulmonary. *Chest*, v. 124, p. 2143-2147, 2003.

NASLUND, P. K.; MILLER, W. C.; GRANGER, D. L. *Cryptococcus neoformans* Fails To Induce Nitric Oxide Synthase in Primed Murine Macrophage-like Cells. *Infection and Immunity*, v. 63, n. 4, p. 1298–1304, 1995.

NGAMSKULRUNGROJ, P.; MEYER, W. Melanin production at 37°C is linked to the high virulent *Cryptococcus gattii* Vancouver Island outbreak genotype VGIIa. *Australasian Mycologist*. v. 28, p. 9–14, 2009.

NGAMSKULRUNGROJ, P.; SERENA, C.; GILGADO, F.; MALIK, R.; MEYER, W. Global VGIIa isolates are of comparable virulence to the major fatal *Cryptococcus gattii* Vancouver Island outbreak genotype. *Clin Microbiol Infect*; v. 17, p. 251–258, 2011.

NIELSEN, K.; COX, G. M.; LITVINTSEVA, A. P.; MYLONAKIS, E.; MALLIARIS, S. D. *Cryptococcus neoformans* α strains preferentially disseminate to the central nervous system during coinfection. *Infection and Immunity*, v. 73, p. 4922–33, 2005

NISHIKAWA, M. M.; LAZÉRA, M. S.; BARBOSA, G. G.; TRILLES, L.; BALASSIANO, B. R.; MACEDO, R. C. L.; BEZERRA, C. C. F.; PÉREZ, M. A.; CARDARELLI, P.; WANKE, B. Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Brazil: analysis of host and regional patterns. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 73-74, 2003.

NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. Cellular Charge of *Cryptococcus neoformans*: Contributions from the Capsular Polysaccharide, Melanin, and Monoclonal Antibody Binding. *Infection and Immunity*, v. 65, n.5, p. 1836–1841, 1997.

NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F.; TOBÓN, A. M.; RESTREPO, A.; COLOMBO, A. L. Epidemiology of Opportunistic Fungal Infections in Latin America. *Clinical Infectious Diseases*, v. 51, n.5, p. 561–570, 2010.

ODOM, A.; MUIR, S.; LIM, E.; TOFFALETTI, D. L.; PERFECT, J.; HEITMAN, J. Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. *The EMBO Journal*, v.16 n.10 p.2576–2589, 1997.

OKAGAKI, L. H.; STRAIN, A. K.; NIELSEN, J. N.; CHARLIER, C.; BALTES, N. J. et al. Cryptococcal Cell Morphology Affects Host Cell Interactions and Pathogenicity. *PLoS Pathogens*, v. 6, n. 6, 2010.

OLSZEWSKI, M. A.; NOVERR, M. C.; CHEN, G.; TOEWS, G. B.; COX, G. M.; PERFECT, J. R.; HUFFNAGLE, G. B. Urease Expression by *Cryptococcus neoformans* Promotes Microvascular Sequestration, Thereby Enhancing Central Nervous System Invasion. *American Journal of Pathology*, v. 164, n. 5, p.1761 -1771, 2004.

PAPPAS, P. G.; PERFECT, J. R.; CLOUD, G. A.; LARSEN, R. A.; PANKEY, G. A.; LANCASTER, D. J.; HENDERSON, H.; KAUFFMAN, C. A.; HAAS, D. W.; SACCENTE, M.; HAMILL, R. J.; HOLLOWAY, M. S.; WARREN, R. M.; DISMUKES, W. E. Cryptococcosis in Human Immunodeficiency Virus–Negative Patients in the Era of Effective Azole Therapy. *Clinical Infectious Diseases*, v.33, p. 690–9, 2001.

PAREDES, C. V. T. Actualización en pruebas de susceptibilidad antifúngica. *Revista Chilena de Infectología*, v. 26, n. 2, p. 144-150, 2009.

PARK, J. B.; WANNEMUEHLER, K. A.; MARSTON, N. G.; PAPPAS, P. G.; CHILLER, T. M. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among person living with HIV/AIDS. *AIDS*, n. 23, p. 525-530, 2009.

PERFECT, J. R.; DISMUKES, W. E.; DROMER, F.; GOLDMAN, D. L.; GRAYBILL, J. R.; HAMILL, R. J.; HARRISON, T. S.; LARSEN, R. A.; LORTHOLARY, O.; NGUYEN, M.; PAPPAS, P. G.; POWDERLY, W. G.; SINGH, N.; SOBEL, J. D.; SORRELL, T. C. Clinical Practice Guidelines for the Management of Cryptococcal Disease: 2010 - Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, n. 50, p. 291–322, 2010.

PERKINS, A.; GOMEZ-LOPEZ, A.; MELLADO, E.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; CUENCA-ESTRELLA, M. Rates of antifungal resistance among Spanish clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*. *Journal Antimicrobial and Chemotherapy*, n. 56, p. 1144–1147, 2005.

PFALLER A. M.; DIEKEMA, D. J.; GIBBS, D. L.; NEWELL, V. A.; BIJIE, H.; DZIERZANOWSKA, D.; KLIMKO, N. N.; LETSCHER-BRU, V.; LISALOVA, M.; MUEHLETHALER K.; RENNISON, C.; ZAIDI, M.; Global Antifungal Surveillance Group. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: 10.5-Year Analysis of Susceptibilities of Noncandidal Yeast Species to Fluconazole and Voriconazole Determined by CLSI Standardized Disk Diffusion Testing. *Journal of Clinical Microbiology*, n.47, p.117–123, 2009.

PFALLER, M. A.; MESSER, S. A.; BOYKEN, L.; RICE, C.; TENDOLKAR, S.; HOLLIS, R. J.; DOERN, G. N.; DIEKEMA, D. J. Global trends in the antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* (1990 to 2004). *Journal of Clinical Microbiology*, 43:2163–2167, 2005.

PFALLER, M. A.; CASTANHEIRA, M.; MESSERA, S. A.; GARMOETA G. J.; JONES, R. N. Echinocandin and triazole antifungal susceptibility profiles for *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus fumigatus*: application of new CLSI clinical breakpoints and epidemiologic cutoff values to characterize resistance in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2009). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 69, p. 45–50, 2011.

PFALLER, M. A.; MESSER, S. A.; BOYKEN, L.; RICE, C.; TENDOLKAR, S.; HOLLIS, R. J.; DIEKEMA, D. J. Evaluation of the NCCLS M44-P Disk Diffusion Method for Determining Susceptibilities of 276 Clinical Isolates of *Cryptococcus neoformans* to Fluconazole. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, n. 1, 2004.

POLACHECK, I.; HEARING, V. J.; KWON-CHUNG, K. J. Biochemical Studies of Phenoloxidase and Utilization of Catecholamines in *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Bacteriology*, v. 150, n.3, p. 1212-1220, 1982.

PRINCE, M.F.; WILKINSON, I.D.; GENTRY, L.O. Plate methods for detection of phospholipase activity in *C. albicans*. *Sabouraudia*, v. 20, p. 15-20, 1982.

REX, J. H.; PFALLER, M. A. Has Antifungal Susceptibility Testing Come of Age? *Clinical Infectious Diseases*, v. 35, p. 982–9, 2002

REX, J. H.; PFALLER, M. A.; GALGANI, J. H.; BARTLETT, M. S.; ESPINEL-INGROFF, A.; GHANNOUM, M. A.; LANCASTER, M.; ODDS, F. C.; RINALDI, M. G.; WALSH, T. J.; BARRY, A. L. Development of Interpretive Breakpoints for Antifungal Susceptibility Testing: Conceptual Framework and Analysis of In Vitro—In Vivo Correlation Data for Fluconazole, Itraconazole, and Candida Infections. *Clinical Infectious Diseases*, v. 24, p. 235-47, 1997.

REX, J. H.; PFALLER, M. H.; WALSH, T. J.; CHATURVEDI, V.; ESPINEL-INGROFF, A.; GHANNOUM, M. A.; GOSEY, L. L.; ODDS, F. C.; RINALDI, M. G.; SHEEHAN, D. J.;

WARNOCK, D. W. Antifungal Susceptibility Testing: Practical Aspects and Current Challenges *Clinical Microbiology Reviews*, v. 12, n.4, p. 643–658, 2001.

ROBINSON, P. A.; BAUER, M.; LEAL, M. E. et al. Early mycological treatment failure in AIDS associated cryptococcal meningitis. *Clinical Infection Disease*, v. 28, p. 82–92, 1999.

RUANE, P. J.; WALKER, L. J.; GEORGE, W. L. Disseminated Infection Caused by Urease-Negative *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 26, n. 10, p. 2224-2225, 1988.

RUBIO, M. C.; GIL, J.; OCÁRIZ, I. R.; BENITO, R.; REZUSTA, A. Comparison of Results Obtained by Testing with Three Different Agar Media and by the NCCLS M27-A Method for In Vitro Testing of Fluconazole against *Candida* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 41, n. 6, p. 2665–2668, 2003.

RUCHEL, R.; TESELLER, R.; TROST, M. A comparison of secretory proteinases from different strains of *C. albicans*. *Sabouraudia*, v. 20, p. 233-244, 1982.

RUMA-HAYNE, P.; BROWNLEE, A. G.; SORREL, C. T. A rapid method for detecting extracellular proteinase activity in *Cryptococcus neoformans* and a survey of 63 isolates. *Journal Medical Microbiology*, v. 49, p. 733-737, 2000.

SANGLARD, D.; ISCHER, F.; KOYMANS, L.; BILLE, J. Amino acid substitutions in the cytochrome P-450 lanosterol 14 α -demethylase (CYP51A1) from azole-resistant *Candida albicans* clinical isolates contribute to resistance to azole antifungal agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v. 42, p. 241–253, 1998.

SANTANGELO, R. T.; NOURI-SORKHABI, M. H.; SORRELL, T. C.; CAGNEY, M.; SHARON, M.; CHEN, C. A.; KUCHEL, P. W.; WRIGHT, L. C. Biochemical and functional characterisation of secreted phospholipase activities from *Cryptococcus neoformans* in their naturally occurring state. *Journal of Medical Microbiology*, v. 48, p. 731-740, 1999.

SANTOS, W. R.; MEYER, W.; WANKE, B.; COSTA, S. P. S. E.; TRILLES, L.; NASCIMENTO, J. L. M.; MEDEIROS R.; MORALES, B. P.; BEZERRA, C. C. F.; MACÊDO, R. C. L.; FERREIRA, S. O.; BARBOSA, G. G.; PEREZ, M. A.; NISHIKAWA, M. M.; LAZÉRA, M. S. Primary endemic *Cryptococcus gattii* by molecular type VGII in the state of Pará, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 103, p. 813-818, 2008.

SCHWARTZ, J. The diagnosis of deep mycoses by morphologic methods. *Human Pathology*, v. 13, p. 519-533, 1982.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. *Micologia Médica à luz de autores contemporâneos*. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

SHEN, W. C.; DAVIDSON, R. C.; COX, G. M.; HEITMAN, J. Pheromones stimulate mating and differentiation via paracrine and autocrine signaling in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell*, v.1, p. 366-377, 2002.

SHI, M.; LI, S. S.; ZHENG, C.; JONES, G. J.; KIM, K. S.; ZHOU, H.; KUBES, P.; MODY, C. H. Real-time imaging of trapping and urease dependent transmigration of *Cryptococcus neoformans* in mouse brain. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 120, n. 5, p.1683–1693, 2010.

- SHIH, C. C.; CHEN, Y. C.; CHANG, S. C.; LUH, K. T.; HSIEH, W. C. Cryptococcal meningitis in non-HIV-infected patients. *QJM: An International Journal of Medicine*, v. 93, p. 245–251, 2000.
- SIMS, C. R.; PAETZNICK, V. L.; RODRIGUEZ, J. R.; CHEN, E.; OSTROSKY-ZEICHNER, L. Correlation between Microdilution, E-test, and Disk Diffusion Methods for Antifungal Susceptibility Testing of Posaconazole against *Candida* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, n. 6, p. 2105–2108, 2006.
- SIONOV, E.; CHANG, Y. C.; GARRAFFO, H. M.; KWON-CHUNG, K. J. Heteroresistance to Fluconazole in *Cryptococcus neoformans* Is Intrinsic and Associated with Virulence. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 53, n.7, p. 2804–2815, 2009.
- SIONOV, E.; LEE, H.; CHANG, Y. C.; KWON-CHUNG, K. J. *Cryptococcus neoformans* Overcomes Stress of Azole Drugs by Formation of Disomy in Specific Multiple Chromosomes. *Plos Pathogens*, v. 6, n.4, 2010.
- SORRELL, T. C.; BROWNLIE, A. G.; RUMA, P.; MALIK, R.; PFEEIFFER, T. J.; ELLIS, D. H. Natural Environmental Sources of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 34, n. 5, p. 1261–1263, 1996.
- SORRELL, T. C. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. *Medical Mycology*, v.39, p.155–168, 2001.
- SOUZA, L. K. H.; SOUZA JUNIOR, A. H.; COSTA, C. R.; FAGANELLO, M. H.; VAINSTEIN, A. L. B.; CHAGAS, A. C. M.; SOUZA AND M. R. R.; SILVA. Molecular typing and antifungal susceptibility of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* species complex isolates in Goiania, Brazil. *Mycoses*, v. 53, p. 62–67, 2009.
- SPEED, B. R.; DUNT, D. Clinical and hosts differences between infections with the two varieties of *C. neoformans*. *Clinical Infectious Disease*, v. 21, p. 28–34, 1995.
- SPRINGER, J. D.; CHATURVEDI, V. Projecting Global Occurrence of *Cryptococcus gattii*. *Emerging Infectious Diseases*, v. 16, n. 1, p. 14-20, 2010.
- SRIBUREE, P.; KHAYHAN, S.; KHAMWAN, C.; PANJAISEE, S.; THARAVICHITKUL, P. Serotype and PCR-fingerprints of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* in Chiang Mai, Thailand. *Mycopathologia*, v. 158, p. 25-31, 2004.
- STAIB, F. Das Verhalten von *Candida albicans* und *Cryptococcus neoformans*-Stämmen gegenüber human-serum-Proteinen. *Mycopathologia et Mycologia Applicata*, v. 26, p. 209–224, 1964.
- STEENBERGEN, J. N.; CASADEVALL, A. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Microbes Infection*, v. 5, p. 667–675, 2003.
- STOCKMAN, L.; ROBERTS, G. D. Specificity of the Latex Test for Cryptococcal Antigen: a Rapid, Simple Method for Eliminating Interference Factors *Journal of Clinical Microbiology*, v. 16, n. 5, p. 965-967, 1982.
- TANAKA, R.; NISHIMURA, K.; YMANISHI, Y.; TAKAHASHI I.; HATA, Y.; MIYAJI, M. Analysis of serotype AD strains from F1 progenies between uerase-positive and negative-sterins of *Cryptococcus neoformans*. *Japanese Journal of Medical Mycology*, v. 44, p. 293 - 297, 2003.

- THOMPSON III, G. R.; WIEDERHOLD, N. P.; FOTHERGILL, A. W.; VALLOR, A. C.; WICKES, B. L.; PATTERSON, T. F. Antifungal Susceptibilities among Different Serotypes of *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, n. 53, p. 309–311, 2009.
- TORRES, E. M. et al. Effects of aneuploidy on cellular physiology and cell division in haploid yeast. *Science*, n. 317, p. 916–924, 2007.
- TORRES-RODRÍGUEZ, J. M.; ALVARADO-RAMÍREZ, E.; MURCIANO, F.; SELLART, M. MICs and minimum fungicidal concentrations of posaconazole, voriconazole and fluconazole for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Journal Antimicrobial and Chemotherapy*, n. 62, p. 205–6, 2008.
- TRILLES, L.; LAZÉRA, M. S.; WANKE, B.; OLIVEIRA, R. V.; BARBOSA, G. G.; NISHIKAWA, M. M.; MORALES, B. P.; MEYER, W. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 103, n. 5, p. 455-462, 2008.
- TUCKER, S. C.; CASADEVALL, A. Replication of *Cryptococcus neoformans* in macrophages is accompanied by phagosomal permeabilization and accumulation of vesicles containing polysaccharide in the cytoplasm. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v.99, p. 3165–3170, 2002.
- User's Guide NEO-SENSITABS SUSCEPTIBILITY TESTING. 19th Ed. 2007/2008
- UTZ, C. J.; SHADOMY, S. Antifungal Activity of 5-Fluorocytosine as Measured by Disk Diffusion Susceptibility Testing. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 136, n. 6, p. 970-974, 1977.
- VARMA, A.; KWON-CHUNG, K. J. Heteroresistance of *Cryptococcus gattii* to Fluconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 54, n.6, p. 2303–2311, 2010.
- VARMA, A.; WU, S.; GUO, N.; LIAO, W.; LU, G.; LI, A.; HU, Y.; BULMER, G.; KWON-CHUNG, K. J. Identification of a novel gene, URE2, that functionally complements a urease-negative clinical strain of *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology*, v. 152, 3723–3731, 2006.
- VECCHIARELLI, A.; RETINI, C.; PIETRELLA, D.; MONARI, C.; TASCINI, C.; BECCARI, T.; KOZEL, T. R. Downregulation by Cryptococcal Polysaccharide of Tumor Necrosis Factor Alpha and Interleukin-1b Secretion from Human Monocytes. *Infection and Immunity*, v. 63, n.8, p. 2919–2923, 1995.
- VELAGAPUDI, R.; HSUEH, Y.; GEUNES-BOYER, S.; WRIGHT, J. R.; HEITMAN, J. Spores as Infectious Propagules of *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity*, v. 77, n. 10, p. 4345–4355, 2009.
- VENKATESWARLU, K.; TAYLOR, M.; MANNING, N. J.; RINALDI, M. G.; KELLY, S. L. Fluconazole tolerance in clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 41, p. 748–751, 1997.
- VIDOTTO, V.; KOGA-ITO, C.Y.; CANELLA, D.; SINICCO, A.; DI PERRI, G.; AOKI, S.; ITO-KUWA, S. Extracellular activity in *Cryptococcus neoformans* strains isolated from AIDS patients and from environmental sources. *Revista Iberoamericana de Micología*, v.17, p.14-19, 2000.

- WANG, Y.; AISEN, P.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* Melanin and Virulence: Mechanism of Action. *Infection and Immunity*, v. 63, n. 8, p. 3131–3136, 1995.
- WANG, Y.; CASADEVALL, A. Growth of *Cryptococcus neoformans* in Presence of L-Dopa Decreases Its Susceptibility to Amphotericin B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 38, n.11, p. 2648-2650, 1994.
- WARNOCK, D. W. Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. *Japanese Journal of Medical Mycology*, v.28, p. 1-12, 2007.
- WHITTIER, S.; HOPFER, R. L.; GILLIGAN, P. Elimination of False-Positive Serum Reactivity in Latex Agglutination Test for Cryptococcal Antigen in Human Immunodeficiency Virus-Infected Population. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 32, n. 9, p. 2158-2161, 1994.
- WICKES, B. L.; MAYORGA, M. E.; EDMAN, U.; EDMAN, J. C. Dimorphism and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*: Association with the a-mating type. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v. 93, p. 7327-7331, 1996.
- XUE, C.; TADA, Y.; DONG, X.; HEITMA, J. The Human Fungal Pathogen *Cryptococcus* Can Complete Its Sexual Cycle during a Pathogenic Association with Plants, *Cell Host & Microbe*, v. 1, p. 263–273, 2007.
- YAMAZUMI, T.; PFALLER, M. A.; MESSER, S. A.; HOUSTON, A. K.; BOYKEN, L.; HOLLIS, R. J.; FURUTA, I.; JONES, R. N. Characterization of Heteroresistance to Fluconazole among Clinical Isolates of *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 41, n.1, p. 267–272, 2003.
- ZARAGOZA, O.; FRIES, B. C.; CASADEVALL, A. Induction of Capsule Growth in *Cryptococcus neoformans* by Mammalian Serum and CO₂. *Infection and Immunity*, v. 71, n. 11, p. 6155–6164, 2003.

ANEXO A – Aprovação do projeto pelo comitê de ética – Hospital Especializado Couto Maia



Comitê de Ética em Pesquisa

1. IDENTIFICAÇÃO DO PROJETO

TÍTULO DA PESQUISA: “Meningite Criptocócica na Bahia – Estudo de fatores de virulência, perfil de sensibilidade e diversidade molecular de isolados clínicos de *Cryptococcus* spp”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Farmacêutica Neide Oliveira Silva

INSTITUIÇÃO: Faculdade de Farmácia – UFBA e Hospital Couto Maia


CARGO DO PESQUISADOR: Farmacêutica Bioquímica Investigadora

PROJETO DE PESQUISA APRESENTADO AO COMITÊ DE ÉTICA EM –
30/03/2009

2. OBJETIVOS DO ESTUDO – Geral – investigar os fatores de virulência. O perfil de sensibilidade antifúngica e a diversidade genética de isolados clínicos de *Cryptococcus* spp.

PARECER: Aprovado pelo CEP

Salvador, 27/04/2009.



Dr. Claudilson José de Carvalho Bastos
CRM 10.647

