

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE POS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR**

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS CLÍNICOS DE
CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS E *CRYPTOCOCCUS GATTII*
QUANTO À SUSCEPTIBILIDADE A FLUCONAZOL**

Dissertação de Mestrado

MARIA CRISTINA DE OLIVEIRA AMARO

Porto Alegre, 2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE POS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *CRYPTOCOCCUS*
NEOFORMANS E *CRYPTOCOCCUS GATTII* QUANTO À
SUSCEPTIBILIDADE A FLUCONAZOL

MARIA CRISTINA DE OLIVEIRA AMARO

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Profa. Marilene Henning Vainstein

Porto Alegre, abril de 2006

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul com apoio financeiro do CNPq

AGRADECIMENTOS

À professora Marilene Henning Vainstein pela orientação, confiança e apoio.

Aos professores Patrícia Valente e Luiz Carlos Severo, membros da minha Comissão de Acompanhamento, pelas críticas e sugestões.

Ao professor Luiz Carlos Severo, chefe do Laboratório de Micologia do Complexo Hospitalar Santa Casa, por disponibilizar os isolados de *Cryptococcus spp.*

À professora Irene Schrank pela revisão da dissertação.

Aos professores do Centro de Biotecnologia.

Aos colegas, principalmente aqueles dos laboratórios 220 e 217.

Aos funcionários do Centro de Biotecnologia.

A minha família, pela presença constante e apoio.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES	7
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	10
RESUMO	11
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Resistência antifúngica	14
1.2. Mecanismos de ação dos antifúngicos	18
1.3. Mecanismos moleculares de resistência	20
1.4. <i>Cryptococcus neoformans</i> e <i>C. gattii</i>	24
1.5. Criptococose	30
1.5.1. Epidemiologia	32
1.5.2. Diagnóstico laboratorial	37
1.5.3. Tratamento	40
1.6. Resistência em <i>Cryptococcus neoformans</i> e <i>C. gattii</i>	42
2. OBJETIVOS	46
2.1. Objetivo geral	46
2.2. Objetivos específicos	46

3. MATERIAL E MÉTODOS	47
3.1. Origem dos isolados	47
3.2. Caracterização dos isolados	47
3.2.1 Cultivo em ágar níger	47
3.2.2. Cultivo em ágar CGB	48
3.2.3. Determinação da espécie por PCR multiplex	48
3.2.3.1. Extração de DNA	48
3.2.3.2. PCR multiplex	49
3.3. Teste de microdiluição em caldo	50
3.4. Teste de indução de resistência a fluconazol	53
4. RESULTADOS	54
4.1. Isolados	54
4.2. Caracterização dos isolados	54
4.2.1. Cultivo em ágar níger	54
4.2.2. Cultivo em ágar CGB	59
4.3. PCR multiplex	60
4.4. Teste de microdiluição em caldo	61
4.5. Teste de indução de resistência	62
5. DISCUSSÃO	63
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

μg	micrograma
μL	microlitro
EDTA	ácido etileno diamianino tetracético
g	grama
h	horas
M	molar
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
mm	milimetro
mM	milimolar
ng	nanograma
nm	nanômetro
°C	graus Celsius
pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia da polimerase
pH	potencial hidrogeniônico
pmol	picomol
rpm	rotações por minuto
SDS	dodecilsulfato de sódio
s	segundo
spp	espécies
Tris	2-amino-2-hidroxi metilpropano-1,3-diol

U unidades
var variedade

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Rota biossintética do ergosterol, mostrando o ponto de inibição por azólicos	20
Figura 2: Microplaca do teste de susceptibilidade.....	51
Figura 3: Identificação de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> por PCR multiplex utilizando os <i>primers</i> CNA70A, CNA70S, CNB49A e CNB49S. Gel de agarose dos produtos amplificados correspondentes a <i>C. gattii</i> (448 pb) e <i>C. neoformans</i> (695 pb).....	60

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1: Fatores de virulência de “duplo uso” em <i>C. neoformans</i>	27
Tabela 2: Composição do meio RPMI 1640 (com glutamina e vermenho de fenol, sem bicarbonato).....	52
Tabela 3: Características dos isolados de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> estudados.....	55
Tabela 4: Condições predisponentes à criptococose entre os pacientes estudados.....	59
Tabela 5: Número de isolados de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> do Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica.....	59
Tabela 6: Número de isolados de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> do Laboratório de Micologia.....	61
Tabela 7: Distribuição das CIMs para fluconazol dos isolados testados.....	61
Tabela 8: Distribuição das CIMs para fluconazol entre os isolados de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i>	62

RESUMO

Nos últimos anos tem ocorrido um aumento de infecções fúngicas, devido à elevação do número de pacientes imunossuprimidos, principalmente pelo surgimento da epidemia da AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome). O uso aumentado de antifúngicos tem levado ao surgimento de cepas resistentes a estes agentes, já verificado com o azólico fluconazol, o agente antifúngico mais utilizado na terapia de manutenção de pacientes com AIDS, que desenvolvem criptococose.

Neste trabalho, foram determinadas as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) de fluconazol para isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, utilizando-se o teste de microdiluição em caldo padronizado pelo *National Commitee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS), o método padrão para testar susceptibilidade antifúngica de leveduras.

Foram testados 173 isolados clínicos de *C. neoformans* e *C. gattii*, sendo que as CIMs para fluconazol variaram de 0,125 a 16 µg/mL, com uma CIM50% de 2 e uma CIM90% de 4 µg/mL. Todos os isolados foram considerados sensíveis a fluconazol.

Também foi realizado um teste de indução de resistência a fluconazol, por exposição de um isolado sensível, a concentrações crescentes da droga, para verificar se apenas a exposição, levaria ao desenvolvimento de resistência. No entanto, verificou-se apenas uma resistência transitória, em uma das subpopulações, sendo que o fenótipo de sensibilidade foi restaurado.

Os dados obtidos neste trabalho estão em concordância com estudos nacionais e internacionais, que também utilizaram o teste padrão de microdiluição em caldo. A resistência entre isolados clínicos de *C. neoformans* e *C. gattii* ainda tem se mostrado rara em termos mundiais comparada a resistência adquirida por outras leveduras. No entanto,

devido aos relatos de desenvolvimento de resistência durante a terapia de manutenção da criptococose, é importante alertar quanto à possibilidade do surgimento e da propagação de cepas resistentes.

ABSTRACT

In the last years have occurred an increase of fungal infections due to rise of number of immunocompromised patients, particularly by appearance of the Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS). The increasing use of antifungal agents has determined the appearance of resistant strains to these agents, already verified with the fluconazole azole, the antifungal agent more used in the maintenance therapy of AIDS patients that developing cryptococcosis.

In this work were determined the Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) of fluconazole to *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* clinical isolates, using the *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) broth microdilution method. This is the test standard to test antifungal susceptibility to yeasts.

Were tested 173 clinical isolates of *C. neoformans* and *C. gattii*. The MICs to fluconazole ranged of 0.125 to 16 µg/mL and the MIC_{50%} was 2 and MIC_{90%} was 4 µg/mL. All isolates were considered susceptible to fluconazole.

A test of fluconazole resistance inducing was carried out by exposure to drug increasing concentrations of one susceptible isolate, to verify if only the exposure can result in the resistance development. However occurred only a temporary resistance in one of the subpopulations, since the susceptibility profile was restored.

The data obtained in this work are in agreement with national and international studies that also used the standard broth microdilution method. The resistance between *C. neoformans* and *C. gattii* clinical isolates has been rare in the world when compared with other yeasts. Nonetheless due to references to resistance development during the maintenance therapy of cryptococcosis, it's important to remain alert as for possibility of appearance and spread of resistant strains.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Resistência antifúngica

A resistência a agentes antibacterianos tem recebido uma grande atenção de médicos e pesquisadores, justificada pela maior incidência de infecções bacterianas, o alto nível de resistência verificada entre as bactérias e a maior facilidade da obtenção de modelos de estudo (GHANNOUM & RICE 1999).

Recentemente, entretanto, tem também ocorrido um aumento da resistência a agentes antifúngicos. Nos últimos 20 anos alguns fatores têm contribuído para o crescimento das infecções fúngicas, entre eles: a expansão da população de pacientes gravemente doentes e/ou imunossuprimidos, incluindo pacientes infectados com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), pacientes com câncer, que apresentam neutropenia induzida por quimioterapia, e transplantados, que recebem terapia imunossupressiva. Outros fatores que também contribuem são o uso freqüente de procedimentos médicos mais invasivos, o tratamento com antibióticos de amplo espectro e glicocorticóides, o uso de nutrição parenteral, diálise peritoneal e hemodiálise. Isto têm resultado no maior uso de agentes antifúngicos, levando à seleção de cepas resistentes. Os estudos têm revelado espécies intrinsecamente resistentes a determinados antifúngicos ou até mesmo a classes destes agentes, além de determinar ou propor mecanismos moleculares de resistência primária ou secundária (PEREA & PATTERSON 2002; GHANNOUM & RICE 1999).

Resistência é definida como a persistência ou progressão da infecção apesar de uma terapia antimicrobiana apropriada. Os fungos podem ser naturalmente resistentes a determinadas drogas antifúngicas (resistência primária) ou podem desenvolver resistência

à droga durante o tratamento (resistência secundária) (PEREA & PATTERSON 2002; PERFECT & COX 1999). No entanto, a resposta clínica não está somente vinculada à susceptibilidade do organismo à droga, mas irá depender de outros fatores como o perfil imunológico do paciente e sua doença de base, a tolerância à droga, o sítio de infecção, o grau de penetração e distribuição da droga, a virulência da cepa e a presença de um foco persistente de infecção como, por exemplo, cateteres (PERFECT & COX 1999).

A resistência *in vitro* de um isolado é importante e, em alguns casos, pode prever o sucesso terapêutico. Em infecções de mucosas por *Candida spp.* nos pacientes infectados por HIV, a correlação da susceptibilidade *in vitro* com a resposta *in vivo* tem sido observada, onde as CIMs para fluconazol aumentam consideravelmente durante o tratamento. Em infecções sistêmicas, as condições do paciente podem ser mais importantes quando se compara a resistência *in vivo* com a CIM do teste *in vitro*. Quanto maior a imunossupressão do hospedeiro, menos confiável é a correlação da resistência *in vivo* com a CIM (GHANNOUM & RICE 1999; WHITE *et al.*, 1998).

Desde os anos 80 grupos norte-americanos e europeus estão envolvidos em desenvolver um método de referência para testar susceptibilidade antifúngica, sendo os principais, respectivamente, o subcomitê do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) - atualmente denominado *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) - e o subcomitê do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) (PAPPALARDO & MELHEM 2003).

Vários estudos foram realizados para determinar o melhor método e padronizar o meio mais adequado, o pH do meio, o inóculo, o tempo e temperatura de incubação, as concentrações dos antifúngicos e o critério de leitura do teste. Em 1992 foi padronizado o teste de macrodiluição em caldo para leveduras. Esse teste permitiu o estudo e comparação da resistência antifúngica entre regiões, já que a boa reprodutibilidade do teste permitiu

este tipo de avaliação. Em 1997, o NCCLS apresentou a padronização do método de microdiluição em caldo. O teste realizado em placa de microtitulação apresenta a vantagem da redução no consumo dos reagentes e a possibilidade de se testar vários isolados ao mesmo tempo. Em 2002, foi apresentado o documento M27A-2, com melhorias para a realização dos testes de macro e microdiluição (COLOMBO & ALVES 2004).

O método atualmente aceito como referência para testar susceptibilidade antifúngica *in vitro*, é o descrito pelo documento M27A-2 do NCCLS. A metodologia proposta pelo EUCAST é baseada neste último (PAPPALARDO & MELHEM 2003; PERFECT & COX 1999).

O teste de susceptibilidade para leveduras aprovado pelo NCCLS diminuiu as variações de CIMs entre os laboratórios, e a melhora na reprodutibilidade permitiu uma comparação dos níveis de resistência entre regiões, além do monitoramento da emergência de cepas resistentes (PAPPALARDO & MELHEM 2003; NCCLS 2002).

Para a interpretação deste teste, foram estabelecidos pontos de corte para os antifúngicos fluconazol, itraconazol e flucitosina, baseados em estudos de correlação da resposta *in vivo* com a resistência *in vitro* para infecções por *Candida spp.* (NCCLS 2002). Para *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* ainda não foram estabelecidos os pontos de corte que determinam se a cepa é sensível ao antifúngico. Outros estudos estão em andamento para determinar os pontos de corte para outros antifúngicos assim como para outros fungos (NCCLS 2002). Embora reprodutível, o próprio comitê não recomenda o seu uso como rotina em laboratórios clínicos, reservando-o para casos de pacientes com SIDA que desenvolvem candidíase de orofaringe e que não esteja respondendo a terapia com azólicos, e pacientes com candidíase invasiva (NCCLS 2002). No entanto, micoses sistêmicas ou de elevada gravidade são tratadas com o poliênico anfotericina B, e relatos de resistência a este antifúngico são raros. A resistência a anfotericina B em infecções por

Candida spp. e *Cryptococcus spp.* pode ser desenvolvida em pacientes previamente tratados com azólicos, provavelmente devido a uma alteração nos componentes da membrana celular do fungo, como o ergosterol que é o alvo deste antifúngico (PEREA & PATTERSON 2002; GHANNOUM & RICE 1999).

A resistência primária à anfotericina B ocorre com alguns fungos filamentosos como *Pseudallescheria boydii*, *Scopulariopsis sp.* e *Fusarium sp.*, bem como com as leveduras *Trichosporon beigeli*, *Candida lusitanae* e *Candida guilliermondii* (PEREA & PATTERSON 2002; WHITE *et al.*, 1998).

Certas leveduras e fungos filamentosos também apresentam resistência primária à flucitosina. Espécies não-albicans de *Candida*, *C. neoformans* e *Aspergillus sp.* apresentam altas taxas de resistência a este antifúngico. O desenvolvimento de resistência secundária é bastante comum com esta droga, sendo desaconselhável a monoterapia (PEREA & PATTERSON 2002; GHANNOUM & RICE 1999; WHITE *et al.*, 1998).

A ocorrência de resistência a azólicos tem sido vista principalmente em pacientes com AIDS e candidíase oral e, também, em pacientes com câncer neutropênicos, que utilizam fluconazol como profilaxia. Esta condição tem estado associada à terapia com azólicos de longa duração, dose cumulativa total de fluconazol acima de 10g e com recente exposição à droga, geralmente menos de um ano antes do episódio de resistência. O esquema de dosagem também tem afetado o desenvolvimento de resistência, pois pacientes tratados com terapia intermitente têm maior probabilidade de resistência que os tratados continuamente. Pacientes com câncer têm apresentado infecções por espécies de *Candida* menos sensíveis a fluconazol, como *Candida glabrata*, que geralmente apresenta CIMs variáveis mas maiores do que aquelas apresentadas por *C. albicans*; e *C. krusei*, intrinsecamente resistente a fluconazol (NUCCI & COLOMBO 2002; SANGLARD 2002).

A resistência a azólicos está surgindo como um grande problema, principalmente para os pacientes de risco para o desenvolvimento de infecções fúngicas, assim como pacientes com AIDS e com outros tipos de imunossupressão (PEREA & PATTERSON 2002; WHITE *et al.*, 1998).

Os azólicos, a anfotericina B e a flucitosina são as principais drogas utilizadas no combate as infecções fúngicas e, justamente pelas poucas opções de tratamento, tornou-se primordial estudar o desenvolvimento de resistência. A elucidação dos mecanismos moleculares de resistência poderá levar ao desenvolvimento de outras drogas que irão, quem sabe, sobrepujar estes mecanismos (PEREA & PATTERSON 2002).

1.2. Mecanismos de ação dos antifúngicos

Com exceção de flucitosina, as drogas antifúngicas antes citadas, têm como alvo o ergosterol, principal esterol da membrana plasmática fúngica, que é análogo ao colesterol das células de mamíferos.

O ergosterol é importante para várias funções celulares, como regular a fluidez e integridade da membrana plasmática e para o funcionamento adequado de enzimas ligadas à membrana (SHEEHAN *et al.*, 1999; GHANNOUM & RICE 1999)

Os antifúngicos azólicos interagem com a via biossintética do ergosterol através da inibição da citocromo P450 lanosterol 14 α desmetilase (Figura 1), levando a diminuição do ergosterol e acumulação de precursores de esterol, incluindo esteróis metilados, resultando na formação de uma membrana plasmática com estrutura e funções alteradas. A lanosterol desmetilase apresenta um motivo heme no seu sítio ativo. Os azólicos agem através de um nitrogênio livre que se liga ao ferro do grupo heme, prevenindo a ativação

do oxigênio que é necessário para a desmetilação do lanosterol (SANGLARD 2002; GHANNOUM & RICE 1999).

Poliênicos, como anfotericina B, interagem com os esteróis da membrana, resultando na produção de poros aquosos. Estes consistem de um anel de oito moléculas de anfotericina B, ligadas hidrofobicamente aos esteróis de membrana. Como resultado há aumento da permeabilidade, perda de componentes citoplasmáticos vitais e morte celular (GHANNOUM & RICE 1999).

A flucitosina entra na célula fúngica por intermédio de uma permease, sendo depois convertida a 5-fluorouracil (5-FU) pela enzima citosina desaminase. O 5-FU é convertido ácido 5-fluorouridílico (FUMP) pela UMP-pirofosforilase, que é fosforilado e incorporado no RNA, resultando em inibição da síntese protéica. As moléculas de 5-FU também são convertidas a monofosfato de 5-fluorodeoksiuridina, um potente inibidor da timidilato sintase, enzima envolvida na síntese de DNA e divisão nuclear. Assim, a flucitosina interfere com o metabolismo das pirimidinas, DNA, RNA e síntese protéica (GHANNOUM & RICE 1999).

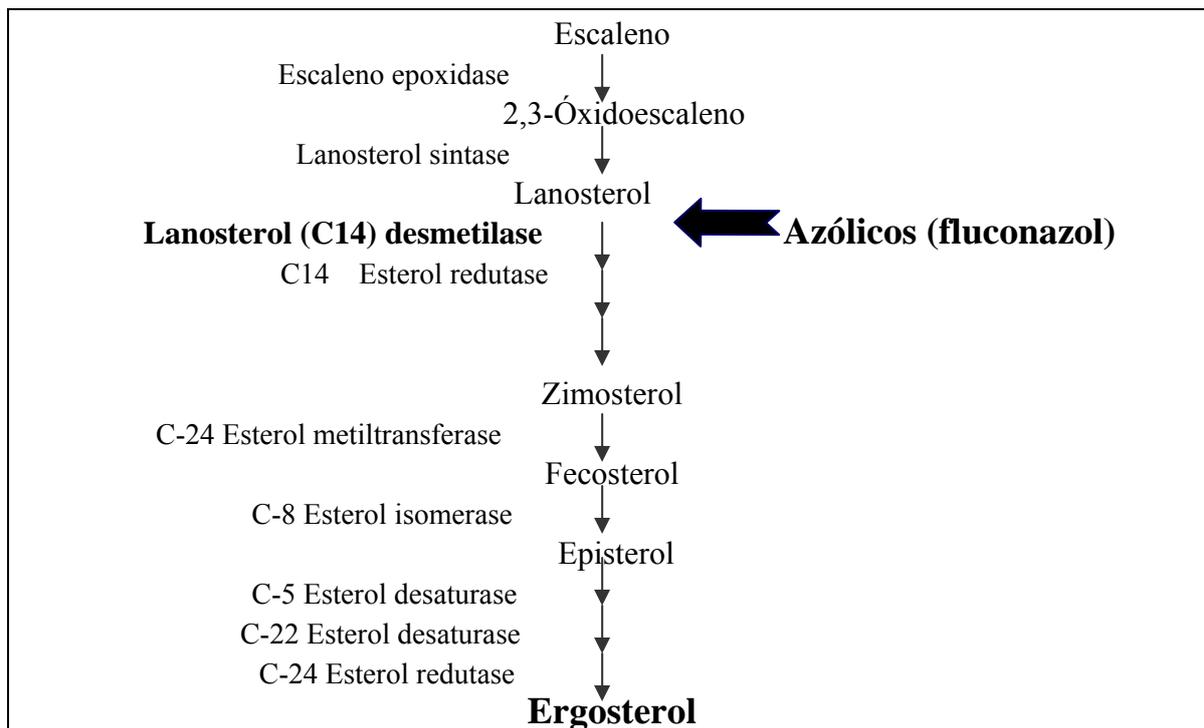


Figura 1: Rota biossintética do ergosterol, mostrando o ponto de inibição por azólicos. Adaptado a partir de WHITE *et al.*, 1998.

1.3. Mecanismos moleculares de resistência

Vários tipos de mecanismos podem contribuir para o fenótipo de resistência a drogas em células eucarióticas. Os mais frequentes incluem redução na importação para o interior da célula, modificação ou degradação no interior da célula, mudanças na interação com a enzima-alvo, mudanças em outras enzimas da mesma via enzimática e/ou aumento no efluxo da droga. Alguns destes mecanismos têm sido estudados na resistência a drogas antifúngicas (PERFECT & COX 1999).

Cepas resistentes a azólicos podem apresentar uma modificação na enzima alvo, lanosterol desmetilase, devido a uma diminuição da sua produção, ou a uma redução do

acesso ao sítio ativo da enzima, ou, ainda, a uma combinação destes mecanismos. Um estudo comparou uma cepa de *C. albicans* sensível a fluconazol e *C. krusei*, intrinsecamente resistente a fluconazol. Foi observado que a concentração necessária para inibir a síntese de ergosterol em 50%, foi aproximadamente 24 a 46 vezes maior em *C. krusei*, sugerindo que a afinidade a enzima alvo é diferente nas duas espécies (PEREA & PATTERSON 2002; GHANNOUM & RICE 1999).

Algumas alterações genéticas têm sido identificadas no gene que codifica a enzima lanosterol desmetilase, designado *ERG11*. Na mutação R467K em *C. albicans*, ocorre a substituição da arginina por lisina no aminoácido da posição 467, causando alterações estruturais ou funcionais na enzima. A superexpressão de *ERG11* tem sido descrita em alguns isolados clínicos. No entanto, é difícil determinar a contribuição da superexpressão ao fenótipo de resistência, pois outras alterações associadas à resistência podem estar presentes, incluindo a mutação R467K e a superexpressão de genes que regulam bombas de efluxo (GHANNOUM & RICE 1999; WHITE *et al.*, 1998).

Um mecanismo comum de resistência em células eucarióticas é a amplificação gênica. O aumento do número de cópias do gene geralmente resulta em aumento na sua expressão. Em *C. albicans*, a superexpressão de *ERG11* não tem sido associada com a amplificação deste gene. Em um isolado clínico de *C. glabrata*, níveis aumentados de lanosterol desmetilase estavam associados com o fenótipo de resistência. Neste caso havia amplificação do gene *ERG11* e elevação do mRNA. Neste mesmo isolado foram verificadas mudanças no efluxo da droga e na atividade de *ERG7*, que codifica a lanosterol sintase, outra enzima da rota biossintética do ergosterol (WHITE *et al.*, 1998).

Alterações em outras enzimas da via biossintética podem estar envolvidas com resistência. Análises de isolados clínicos de *C. albicans* sugerem que alterações em *ERG3*,

que codifica a esterol desaturase, podem ser uma causa de resistência a azólicos (GHANNOUM & RICE 1999).

Outro mecanismo importante de resistência é a diminuição da acumulação da droga na célula causada pela ação de bombas de efluxo (SANGLARD 2002; GHANNOUM & RICE 1999).

Células eucarióticas contêm dois tipos de proteínas de transporte de membranas, ou bombas de efluxo, que contribuem para a resistência a drogas: os transportadores ABC com cassete de ligação ao ATP (ABCT) e os facilitadores principais (MF). Os ABCT estão freqüentemente associados com o efluxo ativo de moléculas que são tóxicas às células e são relativamente hidrofóbicas, assim como a maioria das drogas azólicas. Os MF, não têm sido tão estudados quanto os ABCT, mas também estão envolvidos no transporte de moléculas relativamente hidrofóbicas (PEREA & PATTERSON 2002; SANGLARD 2002).

O envolvimento de bombas de efluxo (genes *CDR* e *MDR*) em resistência a azólicos tem sido demonstrado pelo aumento dos níveis de mRNA (GHANNOUM & RICE 1999; WHITE *et al.*, 1998).

A resistência a flucitosina pode resultar de uma diminuição na sua incorporação à célula, por perda da atividade da permease. Também pode ocorrer a perda da atividade da enzima responsável pela conversão a ácido 5-fluorouridílico (FUMP). A diminuição da incorporação de flucitosina tem sido vista em *S. cerevisiae* e *C. grabrata*, mas não em *C. albicans* e *C. neoformans* (GHANNOUM & RICE 1999; WHITE *et al.*, 1998).

O bloqueio da formação de FUMP, pela perda da atividade da citosina desaminase, ou perda de atividade da fosforibosiltransferase (UPRTase), enzimas da via das pirimidinas, é suficiente para conferir resistência à flucitosina. A resistência da grande maioria de isolados de *C. albicans* e *C. neoformans* é atribuída à perda, por mutação, de

alguma das enzimas da via das pirimidinas. Os homozigotos FCY/FCY possuem elevada atividade de UPRTase, enquanto heterozigotos FCY/fcy possuem menor atividade e homozigotos fcy/fcy possuem atividade enzimática raramente detectável (GHANNOUM & RICE 1999; WHITE *et al.*, 1998).

Em poliênicos estudos com mutantes propõem que a resistência ocorra por mudanças tanto quantitativas quanto qualitativas dos esteróis. Pode ocorrer uma diminuição do conteúdo de ergosterol da célula ou substituição de alguns, ou todos os esteróis, por outros com afinidade diminuída ao poliênico. Por exemplo, substituição do ergosterol, colesterol e estigmasterol por um esterol 3-hidroxi ou 3-oxi ou também, reorientação ou mascaramento do ergosterol existente, tornando a ligação do poliênico estericamente ou termodinamicamente menos favorecida. Estudos com isolados clínicos têm fornecido evidências que suportam estas possibilidades. Num estudo realizado com dois isolados de *C. neoformans* (pré - e pós-tratamento) em que houve falha do tratamento, foi observada uma correlação entre resistência à anfotericina B e padrão de esteróis. O isolado pós-tratamento resistente possuía um defeito na esterol isomerase, levando a acumulação de outros esteróis e diminuição no conteúdo de ergosterol (GHANNOUM & RICE 1999).

O entendimento dos mecanismos que levam à resistência aos antifúngicos está em andamento e espera-se que a partir do conhecimento de mecanismos básicos de resistência se chegue ao seu detalhamento e as etapas envolvidas na sua ativação (GHANNOUM & RICE 1999; WHITE *et al.*, 1998).

1.4. *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*

Cryptococcus neoformans, descrito pela primeira vez em 1894, é uma levedura encapsulada pertencente à classe dos *Basidiomycetes*, que infecta humanos, mas também animais, causando criptococose, uma infecção oportunista que, portanto, afeta principalmente indivíduos imunocomprometidos, acometendo pulmões e sistema nervoso central (SNC) (LACAZ *et al.*, 2002; CASADEVALL & PERFECT 1998; MITCHELL & PERFECT 1995; KWON-CHUNG & BENNET 1992).

São leveduras esféricas a ovais, geralmente com um único brotamento, cujo tamanho varia de 4 a 10µm de diâmetro. Pseudohifas podem ser produzidas ocasionalmente. O tamanho da cápsula varia consideravelmente e é determinado por características genéticas da cepa e pelas condições de cultivo ou ambientais. Algumas cepas são pouco encapsuladas resultando em células com somente 2 a 5µm, enquanto outras podem chegar a 80µm de diâmetro pela produção de uma cápsula exuberante. É constituída por polissacarídeos, sendo o principal a glicuronoxilomanana, um importante fator de virulência (CASADEVALL & PERFECT 1998).

C. neoformans é um patógeno intracelular facultativo com alguns fatores de virulência definidos, que incluem a capacidade para crescer a 37°C, a produção da cápsula polissacarídica, melanina e certas enzimas (Tabela 1). A maioria dos fatores de virulência, se não todos, são de “duplo uso”, já que apresentam funções importantes na sobrevivência no ambiente e, por outro lado, protegem o fungo da resposta imune do hospedeiro. Sua habilidade em sobreviver dentro de macrófagos, provavelmente contribui para a sua propensão em causar infecções crônicas e latentes (IDNURM *et al.*, 2005; CASADEVALL *et al.*, 2003; PERFECT *et al.*, 1998).

As interações entre *C. neoformans* e *Acanthamoeba castellani* têm sido investigadas, sob a hipótese de que o fungo sofreu a pressão seletiva do ambiente para sobreviver a seus predadores, pela produção de fatores de virulência. Um teste *in vitro* mostrou que a internalização de *C. neoformans* por *A. castellani* era seguida por replicação intracelular e formação de vesículas contendo polissacarídeo capsular no citoplasma da ameba. Estas interações assemelham-se muito as que ocorrem entre *C. neoformans* e macrófagos, sugerindo uma possível evolução a partir de sua sobrevivência e replicação dentro de amebas (POETA 2004; CASADEVALL *et al.*, 2003; FELDMESSER *et al.*, 2001).

A cápsula apresenta atividade anti-fagocítica *in vitro* e numerosos estudos têm estabelecido que ela inibe a fagocitose. Além disso, células fagocíticas não conseguem internalizar células de *C. neoformans* na ausência de opsoninas. O tamanho da cápsula também influencia o processo da fagocitose, pois células com cápsulas densas resistem à fagocitose (FELDMESSER *et al.*, 2001).

A melanina é outro fator de virulência em *C. neoformans* que tem sido bastante estudada. A enzima lacase produzida pelo fungo age sobre compostos difenólicos presentes no meio, levando a produção do pigmento melanina. Estudos de interrupção gênica têm demonstrado que cepas do tipo selvagem de *C. neoformans* são mais virulentas que seus respectivos mutantes albinos (CASADEVAL *et al.*, 2000).

Células de *C. neoformans* melanizadas são menos susceptíveis aos efeitos fungicidas da luz ultravioleta, de acordo com estudos *in vitro*. Também no *habitat* natural, ou seja, excretas de pombo, o fungo é encontrado em um estado melanizado, o que indica que a melanização exerce um efeito de proteção, contribuindo para a sobrevivência no ambiente (CASADEVAL *et al.*, 2000).

No hospedeiro a melanina age como um antioxidante que protege o fungo da morte intracelular por células fagocíticas. Também impede que os macrófagos produzam $TNF\alpha$, que é necessário para uma resposta imune mediada por células (BLACKSTOCK *et al.*, 1999).

O neurotropismo de *C. neoformans* pode estar associado com sua capacidade em converter catecolaminas em melanina. Consistentes com esta sugestão são as observações de que áreas do cérebro ricas em catecolaminas, assim como gânglio basal, são freqüentemente infectadas por *C. neoformans* durante a meningoencefalite, e que durante o exame microscópico do tecido cerebral, a parede celular do fungo aparece escurecida (CASADEVAl *et al.*, 2000).

O efeito da melanina sobre a susceptibilidade antifúngica de *C. neoformans* e *Cryptococcus albidus* foi estudada por Ikeda *et al.* (2003), comparando a susceptibilidade de células melanizadas e não melanizadas aos antifúngicos anfotericina B e fluconazol. As CIMs não foram afetadas pela presença de melanina, no entanto, células melanizadas foram mais resistentes à morte por anfotericina B que as não melanizadas. Já com fluconazol quase não se observou este efeito.

C. neoformans apresenta três sorotipos, definidos por antígenos capsulares, e atualmente são reconhecidas duas variedades: *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D e AD) e var. *grubii* (sorotipo A). *Cryptococcus gattii* apresenta os sorotipos B e C (KWON-CHUNG *et al.*, 2002; BOEKHOUT *et al.*, 2001; FRANZOT *et al.*, 1999).

Tabela 1: Fatores de virulência de “duplo uso” em *C. neoformans*.

Fator de virulência	Funções no ambiente	Funções na patogênese
Cápsula	Prevenção da dessecação Proteção contra predadores amebóides	Anti-fagocítico Imunomodulador
Lacase	Degradação de lignina	Interferência com o stress oxidativo
Melanina	Proteção contra luz ultravioleta Tolerância ao calor e frio Redução da susceptibilidade à degradação enzimática	Resistência à morte oxidativa Anti-fagocítico Imunomodulador Resistência a peptídeos microbicidas
	Proteção contra metais pesados	Resistência a drogas antifúngicas
	Proteção contra predadores amebóides	
Fosfolipase	Função nutricional? Proteção contra predadores amebóides	Crescimento intracelular
Proteases	Função nutricional	Dano tecidual
Urease	Captação do nitrogênio	Crescimento intracelular
<i>Mating type</i>	Reprodução sexual	Regulação dos fatores de virulência
Calcineurina, AMPc	Desenvolvimento e Reprodução	Regulação dos fatores de virulência
Superóxido dismutase	Proteção contra oxidantes derivados do oxigênio?	Crescimento intracelular

Fonte: CASADEVALL *et al.*, 2003.

O sorotipo A emergiu como variedade de *C. neoformans* a partir de análises de seqüências do gene URA5 e padrões de DNA *fingerprinting*, que mostraram diferenças genéticas significativas entre os sorotipos A e D (FRANZOT *et al.*, 1999).

As cepas de sorotipo D, *C. neoformans* var. *neoformans*, são mais susceptíveis ao calor do que o sorotipo A. Acredita-se que esta possa ser a causa da distribuição geográfica

diferente dos dois sorotipos, já que o sorotipo D predomina em regiões de clima temperado, como nos países do norte Europeu. Além disso, outra característica do sorotipo D que pode estar relacionada à sua resistência ao calor, é o seu dermatotropismo (MARTINEZ *et al.*, 2001).

C. gattii até muito pouco tempo atrás era considerado uma variedade de *C. neoformans*. Boekhout *et al.* (2001) propuseram a separação em duas espécies, *C. neoformans* e *C. bacillisporus* devido à diferença genética considerável entre as variedades *neoformans* e *grubii* com a variedade *gattii*. O estudo por eles conduzido realizou a genotipagem por AFLP de 207 isolados de pacientes com e sem HIV, ambientais e de animais, vindos de todos os continentes. Além das diferenças genéticas, as cepas também diferenciam-se em certas propriedades bioquímicas, ecológicas e epidemiológicas (BOEKHOUT *et al.*, 2001).

Em 2002 Kwon-Chung *et al.* fizeram uma excelente revisão relativa as mudanças sofridas por *C. bacillisporus*, quanto a sua emergência como espécie e mudanças em sua nomenclatura. Embora a nomenclatura *C. bacillisporus* tivesse prioridade taxonômica a *C. gattii*, os autores propuseram que fosse adotada esta última, desta forma facilitando a comunicação entre pesquisadores de vários campos (KWON-CHUNG *et al.*, 2002).

Suas formas sexuadas são denominadas *Filobasidiella neoformans* var. *neoformans* e *Filobasidiella neoformans* var. *bacillispora*. O tipo conjugante predominante nas duas variedades é o tipo α sendo o tipo “a” raramente isolado (LACAZ *et al.*, 2002; KWON-CHUNG & BENNET 1992).

Nos meios de cultura de rotina, as colônias de *C. neoformans* desenvolvem-se dentro de 36 a 72 horas. São brancas a cremes e tipicamente mucóides, sendo que a quantidade de cápsula produzida pode ser predita pela aparência da colônia (MITCHELL & PERFECT 1995).

A temperatura é uma característica importante do ambiente, que regula o crescimento do *C. neoformans*. Esta levedura cresce bem entre 25°C e 37°C, mas altas temperaturas inibem o crescimento. A incubação prolongada a 40°C ou 42°C pode ser letal (CASADEVALL & PERFECT 1998; MITCHELL & PERFECT 1995). *C. gattii* é mais sensível a elevadas temperaturas e a 40°C a maioria das cepas morrem em 24 horas (MITCHELL & PERFECT 1995).

Todas as espécies de *Cryptococcus* são não-fermentadoras, hidrolizam amido, assimilam inositol e produzem urease. *C. gattii* cresce na presença de canavanina e assimila glicina enquanto *C. neoformans* variedades *neoformans* e *grubii* não apresentam esta característica. Isto tem sido usado na diferenciação das espécies, pela utilização do meio de CGB (Canavanina-Glicina-Azul de Bromotimol) (LACAZ *et al.*, 2002; MITCHELL & PERFECT 1995).

C. neoformans e *C. gattii* produzem a enzima lacase (fenoloxidase), o que pode diferenciá-los de outras leveduras. O uso de meios de cultivo contendo sementes (*Vicia fava* ou *Guizotia abyssinica*) que apresentam substâncias fenólicas resulta na formação de pigmentos do tipo melanina por ação desta enzima e no desenvolvimento de colônias marrons. A presença de lacase também é considerada um fator de virulência (LACAZ *et al.*, 2002; CASADEVALL *et al.*, 2000; PERFECT *et al.*, 1998).

O seqüenciamento dos genomas de duas cepas de *C. neoformans* sorotipo D, foi concluído e as principais características de seus genomas foram apresentadas. Isto representa uma importante etapa na elucidação das bases genômicas que determinam sua virulência. Os genomas, com aproximadamente 20 megabases, contêm em torno de 6500 genes com íntrons codificando um transcriptoma abundante em *splicing* alternativo e mensagens antisenso, sendo também ricos em transposons. Análises dos genomas identificaram mais de trinta novos genes, provavelmente envolvidos na biossíntese da

cápsula, e outros que codificam mais de cinquenta manoproteínas, que podem estar associadas à parede celular, a maioria das quais são exclusivas de *C. neoformans* (LOFTUS *et al.*, 2005).

1.5. Criptococose

A criptococose é uma infecção que se manifesta por vários quadros clínicos. *C. neoformans* pode infectar qualquer órgão, mas tem predileção pelo pulmão e SNC. O pulmão é a porta de entrada usual e os sintomas variam de colonização assintomática à pneumonia grave (BICANIC & HARRISON 2004).

Acredita-se que o fungo atinja o organismo humano através do trato respiratório. Leveduras pequenas com pouca cápsula ou basidiósporos do fungo, medindo 1,8 a 2,0 μm de diâmetro, são inalados e vão até os alvéolos. A cápsula protege a levedura da fagocitose, estando diretamente relacionada com a patogenicidade do fungo (GATES *et al.*, 2004; LACAZ *et al.*, 2002; CASADEVALL & PERFECT 1998).

Na maioria dos casos a infecção é assintomática e as leveduras podem permanecer dormentes nos linfonodos pulmonares, ocorrendo sua morte ou reativação em um momento de imunossupressão. Esta infecção primária pode levar o hospedeiro a desenvolver sintomas se ele estiver imunodeprimido ou receber um grande inóculo de leveduras (CASADEVALL & PERFECT 1998).

Em pacientes imunocompetentes, quando ocorrem, os sintomas são tosse, dor torácica, produção de escarro, perda de peso, febre e hemoptise. Nestes pacientes a criptococose pulmonar geralmente não se dissemina. Entretanto, todo paciente com pneumonia criptocócica ou colonização pulmonar, deve ser avaliado para meningite criptocócica com uma punção lombar. Isto deve ocorrer mesmo na ausência de sinais ou

sintomas neurológicos, devido ao tropismo do *C. neoformans* pelo SNC (MITCHELL & PERFECT 1995).

Em hospedeiros imunocomprometidos a pneumonia criptocócica tem um curso clínico mais rápido e tende a disseminar-se e estabelecer-se no SNC. Em pacientes infectados com HIV, a doença está associada com um estado de profunda imunossupressão, geralmente ocorrendo em contagens de CD4 abaixo de 100 células/ μ L (BICANIC & HARRISON 2004; LACAZ *et al.*, 2002; CASADEVALL & PERFECT 1998; MITCHELL & PERFECT 1995).

A maioria dos pacientes com envolvimento do SNC apresenta sinais e sintomas de meningite subaguda e meningoencefalite. Estes são semelhantes entre pacientes com e sem AIDS e determinados pelo seu estado imunológico. Certos achados são mais comuns em pacientes com AIDS. Nestes, os sítios de infecção geralmente contém um grande número de organismos e escassez de células inflamatórias. Há uma elevada frequência de culturas de sangue e urina positivas, mais sítios de doença fora do SNC, e maior incidência de recidivas (MITCHELL & PERFECT 1995).

Os mais variados tipos de lesões podem ser vistos na criptococose com acometimento da pele. Estas lesões podem ser a primeira apresentação de criptococose, quase sempre representando doença disseminada, mas também podem ocorrer devido à introdução transcutânea do fungo. Raramente são vistas lesões de pele por *C. gattii*, mas relatos ocasionais têm sido publicados (SEVERO *et al.*, 2001; CASADEVALL & PERFECT 1998; MITCHELL & PERFECT 1995).

A próstata é reconhecida como um sítio para a localização do *C. neoformans* e a infecção geralmente não causa sintomas de prostatite. No entanto, pode ser um potencial reservatório para a levedura, o que pode ser responsável pelas recidivas de meningites em

pacientes com AIDS (CASADEVALL & PERFECT 1998; MITCHELL & PERFECT 1995).

O envolvimento ocular representa um grande risco de perda visual. Em aproximadamente $\frac{1}{4}$ dos casos, pode estar presente antes do diagnóstico de meningoencefalite. Alguns pacientes têm rápida perda visual, num período tão curto quanto 12 horas, e podem apresentar neurite óptica, em que o nervo óptico é infiltrado por leveduras. O sucesso terapêutico é muito improvável nesta forma de perda visual (CASADEVALL & PERFECT 1998; MITCHELL & PERFECT 1995).

A criptococose causada por *C. gattii* apresenta características diferentes daquela causada por *C. neoformans* var. *neoformans/grubii*. Com *C. gattii* o hospedeiro é geralmente imunocompetente, a lesão do SNC é freqüentemente localizada no parênquima cerebral, há mais comprometimento pulmonar e a taxa de sobrevivência é maior (CASADEVALL & PERFECT 1998). No entanto, há relatos de criptococose causada por *C. gattii* em pacientes imunossuprimidos. Severo *et al.*, (1999) apresentaram três casos de pacientes com AIDS e criptococose por *C. gattii* no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Em dois dos pacientes ocorreram lesões focais cerebrais e hidrocefalia, quadros clínicos mais comuns nas infecções por *C. gattii*.

1.5.1. Epidemiologia

Criptococose é considerada uma infecção esporádica de distribuição mundial. A prevalência da infecção é diretamente relacionada com o estado imune do hospedeiro e com o grau de exposição à levedura. Sua baixa freqüência, apesar da elevada prevalência do fungo na natureza, implica que muitas pessoas são expostas sem o desenvolvimento de doença. A maioria dos casos de infecção sintomática por *C. neoformans* ocorre em

pacientes imunossuprimidos (CASADEVALL & PERFECT 1998; MITCHELL & PERFECT 1995).

Antes da epidemia da AIDS, a incidência de criptococose nos Estados Unidos era menor que um caso por milhão de pessoas por ano. Nos anos 80, a criptococose emergiu como uma importante infecção oportunística entre pessoas com AIDS, ocorrendo em 5 a 10% dos pacientes com esta doença (BICANIC & HARRISON 2004; CASADEVALL & PERFECT 1998).

No entanto, a partir da metade da década de 90, com o aumento do uso de fluconazol como profilaxia e o advento da terapia antiretroviral potente (HAART), a incidência anual de criptococose diminuiu grandemente nos países desenvolvidos. Em Atlanta, EUA, a doença diminuiu de 66 casos por 1000 pacientes com AIDS em 1993, para 7 casos por 1000 pacientes no ano de 2000 (BICANIC & HARRISON 2004; CANTEY *et al.*, 2005).

A incidência de criptococose associada à AIDS é relativamente mais comum no sudeste da Ásia e África. Na Tailândia esta doença foi responsável por 19% dos casos que definiram AIDS entre 1994 e 1998. Na África do Sul, devido ao aumento de criptococose associada ao HIV, tem havido uma mudança na epidemiologia de meningites. A meningite criptococócica é agora a principal causa de meningite adquirida na comunidade, superando as meningites bacterianas e tuberculosas. Sua incidência corresponde de 20 a 45% dos casos de meningite confirmados no laboratório (BICANIC & HARRISON 2004).

C. neoformans var. grubii, pertencente ao sorotipo A, é a variedade mais distribuída no mundo, enquanto a variedade *neoformans*, sorotipo D, predomina em zonas temperadas. *C. gatti*, sorotipos B e C, têm uma distribuição geográfica mais restrita, ocorrendo em países de clima tropical e subtropical, principalmente Austrália, Índia, sudeste da Ásia,

partes da África, México, Brasil, Paraguai e sul da Califórnia, sendo o sorotipo B muito mais prevalente que o C (LACAZ *et al.*, 2002, SORREL & ELLIS 1997).

O reservatório natural das variedades *neoformans/grubii* é o solo e excretas de várias espécies de aves, mas, principalmente, pombos. Também tem sido isolado a partir de excretas de gaiolas de canários, papagaios e periquitos, além de madeira e vegetais em decomposição. O fungo geralmente não causa doença nas aves, já que a temperatura interna destas, que é de 42°C, impede o seu crescimento. Também as elevadas concentrações de amônia nas excretas frescas inibem o seu crescimento, mas elevadas concentrações da forma leveduriforme são encontradas em excretas secas, um ambiente que é desfavorável para o crescimento de muitos outros microrganismos. Causam criptococose quase que exclusivamente em pacientes imunodeprimidos, sendo que as principais condições predisponentes são: AIDS, terapia com corticosteróides por tempo prolongado, transplante de órgãos, leucemias, linfomas e sarcoidose. Em muitos pacientes, a criptococose é a primeira indicação de AIDS (LACAZ *et al.*, 2002; SORREL & ELLIS 1997; MITCHELL & PERFECT 1995).

C. gattii tem sido isolado de árvores de *Eucalyptus spp.*, principalmente *E. calmadulensis*, mas também de outras espécies de árvores. Esta espécie é caracterizada por causar criptococose em hospedeiros imunocompetentes, sendo maior a sua prevalência nestes pacientes, embora também haja relatos de infecção em pacientes imunocomprometidos (LACAZ *et al.*, 2002; SORREL & ELLIS 1997).

Um recente surto de infecção por *C. gattii* num local de clima temperado, British Columbia na Ilha de Vancouver, Canadá, tem levado a um esforço colaborativo para investigar a extensão deste surto. Análises dos casos de criptococose quanto às características clínicas, microbiológicas e geográficas têm sido realizadas e a identificação de possíveis reservatórios ambientais responsáveis pelo surto. A incidência da infecção por

C. gattii na Ilha de Vancouver de 1999 a 2003 foi de 8,5 e 37 casos por milhão de pessoas por ano. Esta incidência é significativamente maior que na Austrália (0,94 casos por milhão de pessoas por ano) onde *C. gattii* é endêmico (KIDD *et al.*, 2004).

No Brasil, *C. gattii* é endêmico nas regiões norte e nordeste, sendo o agente de 71% dos casos de criptococose. Em Belém do Pará, entre 1992 e 1998, 78 pacientes com criptococose foram internados no Hospital Universitário. Destes pacientes 19 eram crianças menores de 13 anos de idade, sendo que em nove delas o agente causador da micose era *C. gattii*. Embora a criptococose tenha sido descrita em pacientes de todas as idades, em crianças pré-púberes sua ocorrência é extremamente rara. Os autores chamam a atenção para a existência de uma provável região de alta endemicidade para a criptococose por *C. gattii* no Estado do Pará (SEVERO *et al.*, 2001; CORREA *et al.*, 1999).

Na última década, inúmeros métodos baseados na análise do DNA têm sido usados para estudar a epidemiologia de *C. neoformans* e *C. gattii*. Estes incluem RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), estudos de hibridização do DNA, AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e PCR *fingerprinting* (MEYER *et al.*, 2003).

PCR *fingerprinting* é a metodologia de tipagem que tem sido mais utilizada para a análise epidemiológica molecular destes fungos. Meyer *et al.* (1999) empregaram esta metodologia, com a amplificação das seqüências microsatélite (GACA)₄ e minissatélite do fago M13, para investigar a diversidade genética global de *C. neoformans* e *C. gattii*. Seus resultados permitiram agrupar os isolados clínicos e ambientais, provenientes de vários países, em oito padrões moleculares principais: VNI e VNII (sorotipo A), VNIII (sorotipo A/D), VNIV (sorotipo D), VGI, VGII, VGIII e VGIV (sorotipos B e C). Para *C. gattii*, não foi encontrada correlação entre o sorotipo e o tipo molecular.

No estudo acima citado, os padrões moleculares VNI e VGI foram os genótipos mundialmente mais encontrados. O padrão molecular VGIII foi restrito à Índia e aos Estados Unidos e o padrão VGIV foi restrito à Índia e África do Sul. Os autores observaram que isolados obtidos do mesmo paciente em diferentes momentos e de diferentes locais do corpo apresentavam perfis eletroforéticos idênticos, indicando que a infecção e a recorrência eram causadas, na maioria dos casos, por um único isolado (MEYER *et al.*, 1999).

Outro estudo que analisou 340 isolados clínicos, veterinários e ambientais Iberoamericanos, com a participação dos países: Argentina, Brasil, Chile, Colômbia, México, Peru, Venezuela, Guatemala e Espanha, utilizou PCR *fingerprinting* e análise por RFLP do gene URA5. Ambas as metodologias agruparam todos os isolados em oito tipos moleculares previamente estabelecidos. A maioria dos isolados foi recuperada a partir de pacientes com HIV e a maior parte destes isolados pertenciam ao tipo VNI, em concordância com o estudo acima descrito, mostrando que este tipo molecular é o principal entre estes pacientes. O tipo VGI também foi o mais prevalente entre *C. gattii*. Houve uma modificação com relação ao tipo molecular VGIII, que no estudo anterior estaria restrito a Índia e Estados Unidos, mas no presente estudo predominou em 9,1% de todos os isolados. VGIII foi encontrado na Argentina, Colômbia, Guatemala, México e Venezuela. O tipo molecular VGIV também foi encontrado na Colômbia e México, mas em pequeno número (MEYER *et al.*, 2003).

No Brasil um estudo envolvendo 467 isolados clínicos e ambientais de *C. neoformans* permitiu traçar o perfil epidemiológico deste patógeno quanto aos sorotipos, com as seguintes prevalências: 77,95% do sorotipo A, 18,2% do sorotipo B, 1,3% do sorotipo AD, 0,4% do sorotipo D, 0,2% do sorotipo C e 1,93% de não tipáveis. O sorotipo

A prevalece nas regiões sul, sudeste e centro-oeste enquanto o sorotipo B predomina nas regiões norte e nordeste (NISHIKAWA *et al.*, 2003).

No Rio Grande do Sul, um estudo analisou 105 isolados clínicos e 19 ambientais, sendo 10 obtidos a partir de excretas de pombos e 9 a partir de *Eucalyptus spp.* Entre os isolados 83,9% foram caracterizados como *C. neoformans var. grubii* (sorotipo A) tipo VNI (94 clínicos e 10 ambientais). Todos os isolados obtidos a partir de *Eucalyptus spp.* (7,3%) foram caracterizados como *var. neoformans* (sorotipo D) tipo VNIV. Os isolados de *C. gattii* (8,9%) foram identificados como VGIII. Estes resultados obtidos concordaram com estudos epidemiológicos de outras regiões (CASALI *et al.*, 2003).

Também no sul do Brasil, outro estudo realizado num jardim zoológico, analisou 38 isolados de *Cryptococcus sp.* obtidos a partir de amostras fecais de pássaros cativos mantidos em gaiolas. 33 isolados (87%) foram caracterizados como *C. neoformans var. grubii*, sorotipo A e tipo molecular VNI, enquanto 5 (13%) eram *C. gattii*, sorotipo B e tipo molecular VGI (ABEGG *et al.*, 2005).

C. gattii sorotipo C tem apresentado baixa prevalência nos estudos realizados. Contudo, num estudo com isolados de Botsuana e Malauí na África, encontrou-se 24 cepas de *C. gattii* sorotipo C, entre 176 isolados de pacientes com AIDS. As cepas também pertenciam ao genótipo extremamente raro VGIV (LITVINTSEVA *et al.*; 2005).

1.5.2. Diagnóstico laboratorial

Várias metodologias são utilizadas para o diagnóstico laboratorial da criptococose, dependendo das condições de cada laboratório. Entretanto, as metodologias padrões como o exame direto com tinta da China, o teste de hidrólise da uréia, o cultivo em ágar níger e em ágar CGB e a pesquisa de antígenos circulantes, sempre devem ser realizadas, com o objetivo de não se incorrer em erros de identificação.

Os materiais clínicos, líquido, escarro, aspirados de lesões de pele, biópsias e outros materiais, são examinados diretamente ao microscópio numa preparação com tinta da China (nigrosina). As leveduras são identificadas por um nítido halo claro ao redor da célula, que representa a cápsula não corada. Também podem ser realizadas colorações de rotina da patologia para biópsias, como HE (hematoxilina-eosina) para a localização e análise do padrão de lesões, podendo também evidenciar a cápsula. Ao mucicarmin de Meyer, a cápsula aparece corada de vermelho, facilitando o reconhecimento do fungo, principalmente nas formas hipocapsuladas. A coloração de Gomori-Grocot, que evidencia a parede celular fúngica pela impregnação com a prata, não discrimina a cápsula, mas pode ajudar na identificação de estruturas fúngicas. A coloração de Fontana-Masson pode ser utilizada para evidenciar o depósito de melanina na parede de *C. neoformans* e *C. gattii*, auxiliando na sua identificação em tecidos (LAZÉRA *et al.*, 2004, LACAZ *et al.*, 2002; CASADEVALL & PERFECT 1998; MITCHELL & PERFECT 1995).

O exame direto com tinta da China é positivo em mais de 80% dos pacientes com AIDS e meningite criptocócica e em 30 a 50% de pacientes sem AIDS. Este exame apresenta uma sensibilidade de 1.000 a 10.000 UFC de leveduras/mL de líquido (CASADEVALL & PERFECT 1998).

Pode ser isolado na maioria dos meios utilizados na rotina de micologia, com exceção de meios contendo cicloheximida, que impede seu crescimento. Também em meios utilizados na bacteriologia como ágar sangue de carneiro. Para amostras de sangue o procedimento de lise-centrifugação apresenta maior sensibilidade. Cresce bem entre 25°C e 37°C (LACAZ *et al.*, 1998; MITCHELL & PERFECT 1995).

Todas as espécies de *Cryptococcus* apresentam cápsula, com microscopia e morfologia colonial similares. No entanto, somente *C. neoformans* e *gattii* crescem a 37°C. Estes podem ser prontamente diferenciados de outros gêneros e espécies, através da

semeadura em ágar niger, meio que originalmente contém glicose, creatinina, cloranfenicol, difenil, e extrato de *G. abyssinica*. A creatinina é assimilada por estes fungos, mas não por outras espécies ou gêneros como *Candida sp.*, *Bullera sp.*, *Rhodotorula sp.*, *Trichosporun sp.*, etc. O difenil impede o crescimento de fungos filamentosos. Os compostos fenólicos presentes nas sementes de *G. abyssinica*, são substratos para a enzima fenoxidase (lacase) produzida por *C. neoformans* e *C. gattii*, levando a formação de melanina pelos fungos e ao desenvolvimento de colônias marrons, o que os caracteriza (MITCHELL & PERFECT 1995; SHIELDS & AJELLO 1966).

O teste de hidrólise da uréia também é útil da discriminação do gênero. A uréia é hidrolisada pela urease produzida pela levedura, resultando em alcalinização do meio de cultura. A positividade da prova é observada pela mudança da coloração do ágar, do amarelo para o rosa intenso, em 24 a 48 horas de incubação. *Trichosporon spp.*, *Rhodotorula spp.* e *C. lipolytica* também podem ser urease positivas, mas apresentam características morfológicas e bioquímicas distintas de *Cryptococcus spp.* (MILAN & ZAROR 2004).

Os isolados também podem ser identificados ao nível de gênero e espécie, por alguns sistemas comerciais baseados em reações bioquímicas ou por métodos moleculares (LACAZ *et al.*, 1998; MITCHELL & PERFECT 1995).

Para a determinação da espécie, é mais utilizado o meio de CGB, composto pelas substâncias: canavanina, glicina e o indicador de pH azul de bromotimol. *C. gattii* ao contrário de *C. neoformans*, assimila glicina, fonte de carbono e nitrogênio, formando compostos alcalinos que mudam o pH do meio e, desta forma, modifica sua cor de amarelo para azul cobalto. Também cresce na presença de canavanina, uma droga que é tóxica para a maioria dos isolados de *C. neoformans*. O meio de ágar CGB é considerado adequado para a diferenciação das espécies, embora haja relatos de isolados de *C. neoformans* que

produziram coloração azul neste meio, provavelmente por apresentarem resistência à canavanina (KHAN *et al.*, 2003; NAKAMURA *et al.*, 1998; POLACHECK & KWON-CHUNG 1986; KWON-CHUNG *et al.*, 1982).

O kit comercial com anticorpos monoclonais (Iatron), para a determinação dos sorotipos, tem sido muito utilizado em estudos epidemiológicos. Ultimamente, entretanto, foi descontinuada sua comercialização, o que será um problema para muitos pesquisadores (LACAZ *et al.*, 1998; MITCHELL & PERFECT 1995).

A pesquisa de antígenos circulantes para o diagnóstico de criptococose apresenta alta sensibilidade e especificidade. Durante a infecção o polissacarídeo capsular solubiliza-se nos fluidos orgânicos e pode ser detectado por anticorpos específicos. O teste disponível comercialmente, consiste de partículas de látex ligadas a imunoglobulina de coelho, específica para o polissacarídeo capsular. A aglutinação positiva em uma diluição de 1:4 é altamente indicativa de infecção criptocócica. Títulos maiores ou iguais a 1:8, geralmente indicam doença ativa e a maioria dos pacientes com AIDS têm altos títulos do antígeno. O diagnóstico pela detecção do antígeno apresenta uma sensibilidade e especificidade de aproximadamente 95%, sendo mais sensível que a cultura, que apresenta uma sensibilidade de aproximadamente 75% (MITCHELL & PERFECT 1995).

1.5.3. Tratamento

A anfotericina B mudou o perfil da criptococose disseminada de infecção fatal para infecção curável. De fato, esta droga tem sido usada com sucesso para tratar todas as formas de criptococose, de pneumonia à meningite (MITCHELL & PERFECT 1995).

Devido a sua toxicidade, principalmente para os rins, a terapia tem sido combinada com flucitosina para reduzir sua dose e duração de tratamento. As formulações com

lipídios reduzem sua toxicidade, permitindo que doses maiores sejam toleradas (BICANIC & HARRISON 2004; LACAZ *et al.*, 1998; MITCHELL & PERFECT 1995).

Esta droga tem sido administrada intraventricularmente, pois apresenta baixa penetração no SNC, permitindo um aumento de sua concentração neste local. No entanto, podem ocorrer complicações no SNC, devendo-se avaliar a possibilidade de adicionar flucitosina ou fluconazol à terapia, drogas que alcançam concentrações elevadas no SNC. (MITCHELL & PERFECT 1995).

A flucitosina, um antagonista de pirimidina, apresenta excelente penetração no SNC. Porém quando administrada sozinha, a taxa de recidiva da meningite é elevada pelo desenvolvimento de resistência. A sua combinação com anfotericina B apresenta vantagens pelas diferenças nas farmacocinéticas e mecanismos de ação das drogas, que resultam em sinergismo. Contudo, principalmente em pacientes com SIDA, flucitosina pode causar efeitos adversos intoleráveis como leucopenia e distúrbios gastrintestinais (MITCHELL & PERFECT 1995).

Os antifúngicos azólicos apesar de fungistáticos, apresentam excelente perfil de segurança, farmacocinética e resposta clínica. Fluconazol tem sido avaliado no tratamento de meningite criptocócica. Num estudo em que os pacientes foram tratados com anfotericina B ou fluconazol, os resultados após 10 semanas foram similares, sendo a taxa de sucesso com fluconazol de 34% e anfotericina B de 40%. Entretanto, com fluconazol, houve uma tendência à morte da levedura em menor tempo e um período mais longo para a esterilização do líquido (MITCHELL & PERFECT 1995).

Em pacientes com SIDA e meningite criptocócica o tratamento é realizado em duas fases: na fase de indução o paciente recebe anfotericina B na dosagem de 0,5 a 1,0 mg/kg/dia, sendo a dose total de 1,5 a 3,0 g; associada a flucitosina na dosagem de 100 a 150 mg/kg/dia, até a obtenção de duas culturas de líquido negativas; na fase de manutenção

o paciente é tratado com fluconazol na dosagem de 400 mg/dia por 8 semanas e após este período o paciente recebe 200 mg/dia até pelo menos 6 meses de reconstrução imunológica (níveis de linfócitos T CD4+ acima de 200/mm³) (BICANIC & HARRISON 2004; MINISTÉRIO DA SAÚDE 2004; PAPPALARDO & MELHEM 2003; BRANDT *et al.*, 2001).

Entre as novas drogas antifúngicas o azólico de segunda geração, voriconazol, um derivado sintético de fluconazol, parece ser promissor no tratamento da criptococose. Apresenta o mesmo mecanismo de ação de fluconazol, tem demonstrado boa atividade *in vitro* contra *C. neoformans* e alcança bons níveis no SNC (VAN DUIN *et al.*, 2004; JOHNSON & KAUFFMAN 2003).

1.6. Resistência em *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*

Apesar do tratamento com anfotericina B, flucitosina e azólicos ser bem sucedido na criptococose, falhas na terapia ocorrem por uma variedade de razões, incluindo resistência direta à droga antifúngica (PERFECT & COX 1999).

Fluconazol é o agente antifúngico mais utilizado para a terapia de manutenção de pacientes com SIDA. As recorrências da meningite durante a terapia de manutenção não é um evento incomum nestes pacientes (MONDON *et al.*, 1999).

Resistência primária para a maioria dos isolados de *C. neoformans* é incomum com poliênicos e azólicos, mas pode ocasionalmente ocorrer com flucitosina. A resistência secundária tem aumentado principalmente com os antifúngicos azólicos, justamente pelo maior uso destas drogas (PERFECT & COX 1999).

O teste de susceptibilidade aprovado pelo NCCLS tem permitido a comparação dos resultados com a resposta clínica. No entanto, até agora, não se alcançou um consenso

sobre os pontos de corte que delimitam cepas de *C. neoformans* resistentes. É sugerido que as cepas serão resistentes se as CIMs para os agentes antifúngicos forem: fluconazol ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$, itraconazol ≥ 1 $\mu\text{g/mL}$, flucitosina ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$ e anfotericina B ≥ 1 $\mu\text{g/mL}$ (PERFECT & COX 1999).

Vários estudos utilizando a metodologia do NCCLS têm sido feitos para avaliar a situação da resistência para *C. neoformans*. Num estudo realizado nos Estados Unidos com 732 isolados clínicos, obtidos nos períodos de 1992 a 1994 e 1996 a 1998, um pequeno número de isolados mostrou CIMs elevadas. Estas estavam aumentadas para 2 isolados testados para anfotericina B (≥ 2 $\mu\text{g/mL}$), 14 isolados à flucitosina (≥ 32 $\mu\text{g/mL}$), 8 isolados a fluconazol (≥ 64 $\mu\text{g/mL}$) e 45 isolados a itraconazol (≥ 1 $\mu\text{g/mL}$) (BRANDT *et al.*, 2001).

Outro estudo realizado nos Estados Unidos com 237 amostras de *C. neoformans* obtidas em mais de 100 diferentes centros médicos na Ásia, América Latina e América do Norte, foram testadas para a susceptibilidade aos novos triazólicos, voriconazol e posaconazol, e fluconazol. Voriconazol e posaconazol foram bastante ativos, sendo que inibiram, respectivamente, 98 e 100% das cepas testadas em CIMs $\leq 0,12$ $\mu\text{g/mL}$ e ≤ 1 $\mu\text{g/mL}$. Fluconazol apresentou CIMs ≤ 8 $\mu\text{g/mL}$ para 98% das cepas, 16 a 32 $\mu\text{g/mL}$ para 1% e ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$ para 1% das cepas testadas, mostrando-se bastante eficaz (PFALLER *et al.*, 2004).

Em Taiwan 37 isolados clínicos de *C. neoformans* foram testados para a susceptibilidade à anfotericina B, fluconazol e voriconazol. Anfotericina B apresentou CIMs ≤ 1 $\mu\text{g/mL}$, fluconazol ≤ 8 $\mu\text{g/mL}$ e voriconazol $\leq 0,5$ $\mu\text{g/mL}$. A CIM90% para fluconazol foi de 2 $\mu\text{g/mL}$ (CHANG *et al.*, 2004).

Um estudo envolvendo 100 isolados do Brasil, Chile e Venezuela resultou em elevada sensibilidade aos agentes antifúngicos, sendo todas as cepas susceptíveis à

anfotericina B ($\leq 0,5 \mu\text{g/mL}$), 99% das cepas de *C. neoformans* ($\leq 8 \mu\text{g/mL}$) e 73% das cepas de *C. gattii* ($\leq 16 \mu\text{g/mL}$) susceptíveis a fluconazol; e 90% das cepas foram susceptíveis à flucitosina ($\leq 4 \mu\text{g/mL}$) (CALVO *et al.* 2001).

No Rio Grande do Sul, um estudo realizado com 69 cepas clínicas e 13 ambientais, mostrou que todas eram susceptíveis à anfotericina B (0,0625 a $0,5 \mu\text{g/mL}$), fluconazol (0,125 a $16 \mu\text{g/mL}$), itraconazol (0,031 a $0,25 \mu\text{g/mL}$) e cetoconazol (0,031 a $0,5 \mu\text{g/mL}$) (ALVES *et al.*, 2001).

Num relato de caso de um paciente com AIDS que desenvolveu resistência durante a terapia de manutenção com fluconazol, apresentando recidiva da meningite criptocócica, a CIM para fluconazol, que no primeiro episódio de meningite era $< 8 \mu\text{g/mL}$, elevou-se para $64 \mu\text{g/mL}$ (FRIESE *et al.*, 2001).

A resistência a azólicos em fungos patogênicos é mediada por vários tipos de mecanismos. Em *C. neoformans* alguns destes mecanismos têm sido explorados, como a redução intracelular do azólico ou a alteração da atividade do *ERG11* (POSTERARO *et al.*, 2003).

Baseados em alguns estudos sugerindo que a redução do conteúdo de fluconazol intracelular poderia ocorrer devido a um transportador multidrogas, Posteraro *et al.* (2003), criaram uma cepa mutante resistente, por exposição a fluconazol. Utilizando a técnica de hibridização subtrativa, verificaram que havia um gene superexpressado na cepa mutante resistente, que não estava presente no isolado de origem. A análise da seqüência deste gene identificou um transportador ABC com cassete de ligação a ATP, que foi denominado *CnAFRI* (*C. neoformans Antifungal Resistance I*). A deleção deste gene criou uma cepa com susceptibilidade aumentada a fluconazol, enquanto a reintrodução do gene, restaurou o fenótipo de resistência, confirmando que *CnAFRI* estava envolvido na resistência a fluconazol.

Outro gene que pode estar envolvido em resistência em *C. neoformans* é *CneMDR1*. A amplificação por PCR numa região do DNA correspondente a motivos conservados de outras proteínas, como MDR, foi inicialmente usada para identificar e clonar *CneMDR1*. Análises estruturais da proteína codificada por este gene, identificaram uma proteína típica da superfamília dos transportadores (ABC) com cassete de ligação a ATP, que incluem proteínas MDR. No entanto, a sua contribuição à resistência não foi ainda confirmada (THORNEWELL *et al.*, 1997).

Outro estudo identificou uma mutação no gene *ERG11*. Cinco isolados sequenciais de *C. neoformans* recuperados a partir de um paciente com AIDS, foram analisados para a susceptibilidade a fluconazol. Os quatro primeiros isolados foram susceptíveis (CIM 2 µg/mL), mas o último mostrou-se resistente com uma CIM de 32 µg/mL. Foi então realizada a clonagem e sequenciamento do gene *ERG11*, sendo que a análise das seqüências detectou uma mutação puntual, apenas no quinto isolado. Esta foi responsável por uma substituição do aminoácido glicina por serina, na posição 484 (G484S) da enzima lanosterol desmetilase. O resíduo G484 forma parte do domínio de ligação do heme, no sítio ativo da enzima. Em *C. albicans* alguns estudos têm demonstrado que a mesma mutação, confere uma mudança na orientação do domínio, levando a uma diminuição da ligação do azólico, mas também da atividade catalítica da enzima (RODERO *et al.*, 2003).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Caracterizar isolados clínicos de *C. neoformans* e *C. gattii* quanto à susceptibilidade a fluconazol, para avaliar os seus perfis de resistência em nosso meio.

2.2. Objetivos específicos

- a) Caracterizar os isolados clínicos de *C. neoformans* e *C. gattii* por métodos bioquímicos.
- b) Determinar as CIM para fluconazol utilizando o teste de microdiluição em caldo recomendado pelo NCCLS.
- c) Testar um protocolo de indução de resistência em um isolado de *C. neoformans* sensível a fluconazol.
- d) Analisar a situação da resistência a fluconazol de isolados clínicos de *C. neoformans* e *C. gattii* em nosso meio e compará-la com dados nacionais e internacionais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Origem dos isolados

O teste de susceptibilidade a fluconazol foi realizado para 64 isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* do Laboratório de Micologia do Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre, isolados no período de 1999 a 2003. Também foram testados 109 isolados da coleção do Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica, do Centro de Biotecnologia do Rio Grande do Sul (UFRGS). Esta coleção contém isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* oriundos de vários hospitais e Centros de diagnóstico, de Porto Alegre, do interior do Rio Grande do Sul e de Goiânia, Goiás, isolados entre 1992 e 2003.

3.2. Caracterização dos isolados

Os 173 isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* foram caracterizados pelos métodos bioquímicos padrões, ou seja, cultivo em ágar níger a 37°C e em ágar CGB, embora tivessem sido identificados ao nível de gênero e espécie nos laboratórios de origem.

3.2.1. Cultivo em ágar níger (NSA = *niger- seed- agar*)

Todos os 173 isolados foram analisados para o desenvolvimento a 37°C e produção de melanina. Os isolados foram inoculados em ágar níger (sementes de níger 10 g, glicose 0,1 g, ágar bacteriológico 2 g, cloranfenicol 34mg/L e água destilada qsp 100 mL) e incubados a 37°C, sendo observado o desenvolvimento de colônias marrons, identificando o isolado como *C. neoformans* ou *C. gattii*.

3.2.2. Cultivo em ágar CGB

A diferenciação entre as espécies de *C. neoformans* e *C. gattii* foi realizada através do meio de CGB (Solução A: glicina 10g, fosfato de potássio monobásico 1 g, sulfato de magnésio 1 g, cloridrato de tiamina 1 mg, sulfato de l-canavanina 30 mg e água destilada qsp 100 mL/ Solução B: azul de bromotimol sódico 0,4 g e água destilada qsp 100 mL/ Solução C: solução B 2 mL, ágar bacteriológico 2 g e água destilada qsp 100 mL + 10 mL da solução A) , com a utilização das cepas controles *C. gattii* ATCC 24065 e *C. neoformans* ATCC 32045. Os isolados foram semeados no meio e cultivados a 25°C por até cinco dias, sendo observado o desenvolvimento de coloração azul característica de *C. gattii*.

3.2.3. Determinação da espécie por PCR multiplex

Para os isolados que mostraram-se duvidosos no ágar CGB, foi realizado PCR multiplex para a confirmação da espécie.

3.2.3.1. Extração de DNA

O DNA genômico dos isolados foi extraído por método mecânico utilizando pérolas de vidro, de acordo com o protocolo descrito por Poeta *et al.* (1999). Uma colônia do isolado foi inoculada em ágar Sabouraud (glicose 2g, peptona 1g, extrato de levedura 0,3g, ágar bacteriológico 1,8g e água destilada qsp 100mL) e incubada a 30°C por 48 horas. Duas ou três alçadas do cultivo foram transferidas para um tubo de microcentrífuga

de 2 mL contendo 500 µL de TENTS (Tris-HCl 10mM pH 7,5/ EDTA 1mM pH 8,0/ NaCl 200mM/ Triton X-100 2%/ SDS 1%), 200 µL de pérolas de vidro (0,45 mm) e 500 µL de fenol-clorofórmio. Os tubos foram agitados em vórtex e centrifugados a 13.000 rpm por 15 min, e a fase aquosa foi coletada, adicionada de 1 V de etanol absoluto gelado e mantida a -20°C *over night* ou por 1h a -70°C. O DNA foi coletado por centrifugação a 13.000 rpm por 15 min e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi ressuspensão em 500 µL de TE (10 mM Tris pH 8,2/ 1 mM EDTA pH 8,0) contendo RNase A na concentração de 50 µg/mL e incubado a 37°C por 30 min. Uma nova extração foi realizada com fenol-clorofórmio e a fase aquosa foi transferida para um novo tubo de microcentrifuga (1,5 mL). Foram adicionados 20 µL de NaCl 5M e 1V de etanol absoluto gelado e incubado a -20°C *over night* ou por 1h a -70°C . O DNA foi coletado por centrifugação a 13.000 rpm por 15 min e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi lavado com 500 µL de etanol 70% gelado e ressuspensão em 100 µL de TE. A integridade do DNA foi verificada em gel de agarose 0,8 % corado com brometo de etídio. O DNA extraído após quantificação foi armazenado a -20°C.

3.2.3.2. PCR multiplex

Foram utilizados os pares de *primers* CNA 70S (5'ATTGCGTCCACCAAGGAGCTC-3') e CNA 70A (5'-ATTGCGTCCATGTTACGTGGC-3') específicos para *C. neoformans* e CNB 49S (5'-ATTGCGTCCAAGGTGTTGTTG-3') e CNB 49 A (5'-ATTGCGTCCATCCAACCGTTATC-3') específicos para *C. gattii*. Estes originam dois produtos de amplificação, de 695pb e 448pb, respectivamente. Estes pares de *primers* foram construídos com base nos padrões de amplificação de DNA de *C. neoformans* e *C.*

gattii por RAPD (AOKI *et al.*, 1999; CASALI *et al.*, 2003). As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 25 µL contendo: 20 ng de DNA/ 10 mM Tris HCl pH 8,3/ 50 mM KCl/ 2,5 mM MgCl₂ / 200 µM de cada deoxirribonucleotídeo (dNTPs) / 25 pmol de cada primer e 1U de Taq polimerase (CenBiot Enzimas). A PCR foi realizada por um aquecimento inicial das amostras a 94°C/10 min, seguido de 25 ciclos de desnaturação a 94°C/1 min, anelamento a 65°C/1 min, extensão a 72°C/2 min, e uma extensão final a 72°C/10 min em um termociclador. Os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio. Foram adicionados à reação um controle negativo (sem a adição de DNA) e controles positivos (HC5 sorotipo A, ATCC 28957 sorotipo D, ATCC 48184 sorotipo AD, AL33 sorotipo B e 779 VGIV sorotipo C).

3.3. Teste de microdiluição em caldo

As CIMs para fluconazol foram determinadas pelo teste de microdiluição em caldo padronizado pelo NCCLS, seguindo-se o protocolo do documento M27-A2 (NCCLS 2002). De acordo com este, foi utilizado o meio de RPMI 1640 (Tabela 2) tamponado com MOPS pH 7,0. As concentrações de fluconazol testadas foram as seguintes: 0,125; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16; 32 e 64 µg/mL. Foram utilizadas as cepas controles *C. krusei* ATCC 6258 e *C. parapsilosis* ATCC 22019.

O antifúngico diluído em RPMI foi dispensado na microplaca, de forma que os poços identificados de 1 a 10 (em cada fileira) tivessem alíquotas de 100 µL referentes às dez diferentes concentrações da droga a ser testada. Uma outra fileira foi reservada para o controle de crescimento, já que continha apenas o meio líquido, sem antifúngico; e outra

para o controle de esterilidade do meio (Figura 2). As placas foram armazenadas a -20°C até o seu uso.

Para a realização do teste os isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* foram semeados em ágar Sabouraud por 48 h a 35°C e as cepas controles de *Candida sp.* por 24 h a 35°C . Foram realizados inóculos em RPMI contendo $0,5-2,5 \times 10^3$ UFC/mL e distribuídos 100 μL destes em cada poço da microplaca, correspondente a cada uma das concentrações do antifúngico e do controle de crescimento.

As microplacas foram incubadas a 35°C em câmara úmida, sendo realizada a leitura das CIM para fluconazol das cepas controles em 48 h e dos isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* em 72 h. A leitura foi feita visualmente, comparando-se o poço controle de crescimento com os poços com antifúngico. A CIM é a menor concentração capaz de induzir proeminente inibição (em torno de 50%) do crescimento, verificado em relação ao poço controle.

Como ainda não foram estabelecidos os pontos de corte que determinam resistência ou susceptibilidade para *C. neoformans* e *C. gattii*, neste trabalho foram considerados sensíveis os isolados com $\text{CIM} \leq 32 \mu\text{g/mL}$ de fluconazol.

Figura 2: Microplaca do teste de susceptibilidade (SIDRIN *et al.*; 2004)

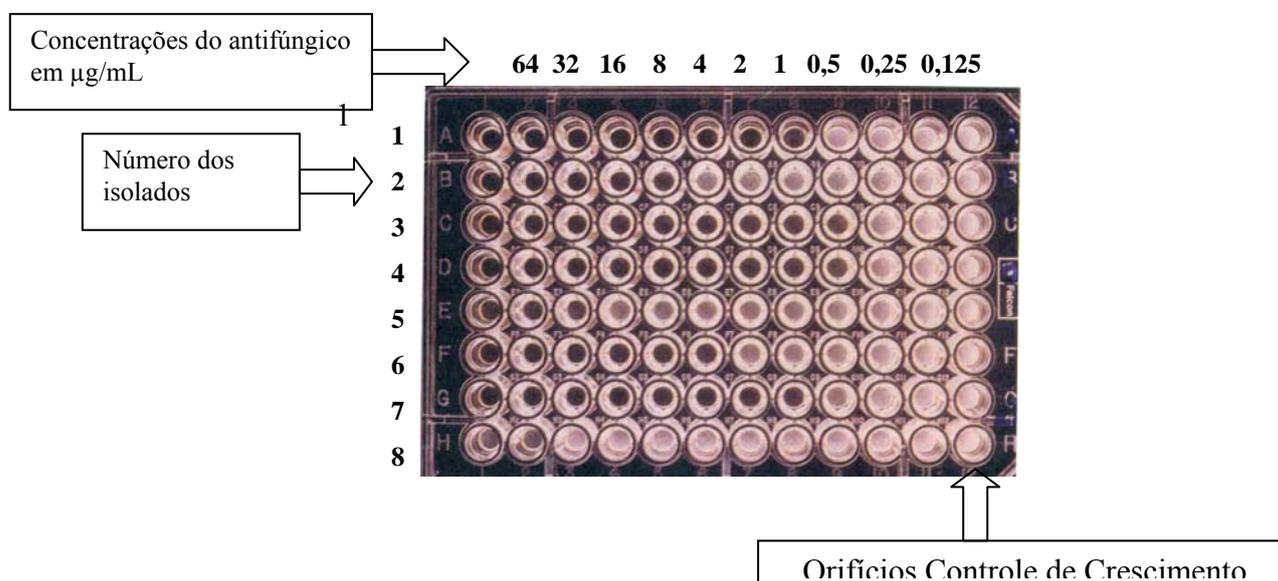


Tabela 2: Composição do meio RPMI 1640 (com glutamina e vermelho de fenol, sem bicarbonato) (NCCLS 2002)

Constituinte	g/L de água	Constituinte	g/L de água
L- arginina	0,200	Biotina	0,0002
L- aspargina	0,050	D- pantotenico	0,00025
L- ácido aspártico	0,020	Cloridrato de colina	0,003
L- cistina. 2HCl	0,0652	Ácido fólico	0,001
L- ácido glutâmico	0,020	Mioinositol	0,035
L- glutamina	0,300	Niacinamida	0,001
Glicina	0,010	PABA	0,001
L- histidina	0,015	Piridoxina	0,001
L- hidroxiprolina	0,020	Riboflavina	0,0002
L- isoleucina	0,050	Tiamina	0,001
L- leucina	0,050	Vitamina B12	0,000005
L- lisina	0,040	Nitrato de Ca	0,100
L- metionina	0,015	Cloreto de K	0,400
L- fenilalanina	0,015	Sulfato de Mg	0,04884
L- prolina	0,020	Cloreto de Na	6,0
L- serina	0,030	Fosfato de Na	0,800
L- treonina	0,020	D- glicose	2,0
L- triptofano	0,005	Glutationa	0,001
L- tirosina	0,02883	Vermelho de fenol	0,0053
L- valina	0,020		

3.4. Teste de indução de resistência a fluconazol

Foi realizado um teste de indução de resistência a fluconazol, em um isolado de *C. neoformans* (SC33), sensível a este antifúngico (CIM= 2 µg/mL), utilizando-se o protocolo descrito por Posteraro *et al.* (2003).

Inicialmente 50 colônias do isolado foram selecionadas, sendo que cada uma delas foi inoculada em tubos contendo 2 mL de YEPD (1g de extrato de levedura, 2g peptona, 2g de glicose e água destilada qsp 100 mL) com 0,5 µg/mL de fluconazol e incubadas a 30°C por 48h a 240 rpm. Após este período, alíquotas de 20 µL de cada tubo contendo crescimento, eram inoculadas em tubos contendo 2 mL de YEPD, novamente com 0,5 µg/mL de fluconazol, sendo realizadas as mesmas condições de crescimento. Este procedimento foi realizado para as concentrações: 1, 5, 10, 15, 20, 25, 50 e 100 µg/mL de fluconazol. As subpopulações do isolado que crescessem até 100 µg/mL, eram submetidas ao teste de microdiluição em caldo para a determinação da CIM.

4. RESULTADOS

4.1. Isolados

Foram testados 173 isolados clínicos de *C. neoformans* e *C. gattii* para a determinação das CIM para fluconazol. A idade média dos pacientes a partir dos quais se obteve estes isolados foi de 37 anos, com uma variação de idade dos 6 aos 70 anos (Tabela 3). Quanto ao sexo dos pacientes 69,2% pertenciam ao sexo masculino e 30,8% eram mulheres. O principal material clínico que determinou o isolamento de *C. neoformans* e *C. gattii* foi líquido (88,2%) seguido de vários outros (11,8%) como: hemocultura, lavado brônquico, punção pulmonar, medula óssea, escarro, urina e biópsias. As principais condições predisponentes ao desenvolvimento de infecção criptocócica foram AIDS, transplante, esclerose múltipla/linfoma e diabetes (Tabela 4).

4.2. Caracterização dos isolados

4.2.1. Cultivo em ágar níger

Todos os 173 isolados desenvolveram colônias marrons no ágar níger confirmando a característica de *C. neoformans* e/ou *C. gattii*.

Tabela 3: Características dos isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* estudados.

Isolado	Data da coleta	Sexo	Idade (anos)	Condição predisponente	Material	Espécie
SM1	1994	M	23	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
SM2	1997	F	25	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
SM4	1998	M	31	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
SM5	NI	M	NI	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
SM6	1995	M	32	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
SM9	1995	M	70	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
SM10	1998	M	29	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
SM11	1992	M	33	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
SM15	1997	M	37	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
SM17	1996	F	31	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
SM18	1996	M	25	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
SM19	1998	M	30	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
SM21	NI	F	28	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
SM22	1996	M	35	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
SM23	NI	M	NI	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
SM24	NI	M	27	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
SM26	1999	M	NI	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
SM27	NI	M	NI	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
SM28	NI	M	NI	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
SM29	1999	M	33	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
SM30	1999	M	36	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
SM31	1999	M	28	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
SM32	1997	M	26	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
SM33	1997	M	26	AIDS	HEMO	<i>neoformans</i>
SM36	NI	M	30	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
SM37	NI	M	74	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
SM39	2000	M	23	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
SM41	NI	M	34	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
SM42	2000	M	33	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
SM43	2000	M	33	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
SM45	NI	M	68	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
SM46	1999	M	31	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
SM53	2000	M	29	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
SM54	2000	F	34	NI	NI	<i>neoformans</i>
SM55	2000	F	34	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
C4	NI	NI	NI	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
C5	NI	NI	NI	AIDS	LIQ	<i>gattii</i>
C7	NI	NI	NI	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
C11	NI	NI	NI	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
C18	NI	NI	NI	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
C19	NI	NI	NI	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
C21	NI	NI	NI	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>

C22	1999	NI	NI	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
C25	1999	NI	NI	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
C29	1999	NI	NI	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
C32	1999	NI	NI	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
C33	1999	NI	NI	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
C34	1999	NI	NI	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
C36	1999	NI	NI	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
C37	1999	NI	NI	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
HSL1	2000	NI	NI	AIDS	NI	<i>neoformans</i>
HSL2	2000	NI	NI	AIDS	NI	<i>neoformans</i>
HSL3	2000	NI	NI	AIDS	NI	<i>neoformans</i>
HC1	2000	M	36	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
HC2	2000	M	38	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
HC3	2000	M	38	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
HC4	2000	F	36	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
HC5	2000	M	36	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
HC7	2000	F	22	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
HC8	2000	M	40	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
HC9	2000	M	33	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
HC11	2000	F	50	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
HC12	2000	F	22	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
HC13	2000	M	42	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
HC14	2000	M	29	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
HC16	2000	F	33	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
HC17	2000	M	43	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
HC18	2000	F	25	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
HC19	2000	F	41	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
AL41	NI	M	64	NI	LIQ	<i>gattii</i>
AL33	NI	M	47	NI	LIQ	<i>gattii</i>
AL32	NI	M	50	NI	LIQ	<i>gattii</i>
AL34	NI	F	40	NI	BP	<i>gattii</i>
AL41	NI	M	49	NI	LIQ	<i>gattii</i>
AL11	NI	M	NI	NI	ESC	<i>gattii</i>
L1	NI	F	33	AIDS	LIQ	<i>gattii</i>
L5	NI	M	44	NI	LIQ	<i>neoformans</i>
L6	NI	M	28	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
L7	NI	M	28	AIDS	HEMO	<i>neoformans</i>
L8	NI	F	25	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
L10	NI	F	38	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
L11	NI	M	34	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
L12	NI	M	35	NI	LIQ	<i>neoformans</i>
L13	NI	M	35	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
L14	NI	M	41	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
L16	NI	F	31	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
L17	NI	M	34	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
L18	NI	M	30	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
L19	NI	F	24	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
L21	NI	M	28	AIDS	LIQ	<i>noformans</i>

L22	NI	M	49	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
L23	NI	NI	NI	NI	NI	<i>neoformans</i>
L24	NI	NI	NI	NI	NI	<i>neoformans</i>
L25	NI	NI	NI	NI	NI	<i>neoformans</i>
L26	NI	NI	NI	NI	NI	<i>neoformans</i>
L27	NI	NI	NI	NI	NI	<i>neoformans</i>
L31	NI	NI	NI	NI	NI	<i>neoformans</i>
L32	NI	NI	NI	NI	NI	<i>neoformans</i>
L33	NI	NI	NI	NI	NI	<i>neoformans</i>
L34	NI	NI	NI	NI	NI	<i>neoformans</i>
L35	NI	NI	NI	NI	NI	<i>neoformans</i>
L36	NI	NI	NI	NI	NI	<i>neoformans</i>
L37	NI	NI	NI	NI	NI	<i>neoformans</i>
CP1	2002	F	NI	NI	LIQ	<i>neoformans</i>
CP2	2002	M	NI	NI	NI	<i>neoformans</i>
CP3	2002	F	NI	NI	NI	<i>neoformans</i>
CP6	2002	M	NI	NI	NI	<i>neoformans</i>
CP11	2002	F	NI	NI	NI	<i>neoformans</i>
CP15	2002	M	NI	NI	LIQ	<i>neoformans</i>
CP20	2003	M	NI	NI	LIQ	<i>neoformans</i>
SC8	1999	F	58	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
SC9	1999	F	35	Transplante renal	LIQ	<i>neoformans</i>
SC10	1999	M	NI	NI	LIQ	<i>neoformans</i>
SC11	1999	F	NI	NI	LIQ	<i>neoformans</i>
SC12	1999	F	NI	Transplante hepático	LIQ	<i>neoformans</i>
SC13	1999	M	34	NI	LIQ	<i>neoformans</i>
SC15	2000	M	30	AIDS	LB	<i>neoformans</i>
SC16	2000	M	NI	NI	LIQ	<i>neoformans</i>
SC17	2000	M	NI	NI	LIQ	<i>neoformans</i>
SC18	2000	F	NI	NI	LIQ	<i>neoformans</i>
SC20	2000	F	59	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
SC23	2001	M	63	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
SC24	2001	F	28	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
SC25	2001	M	30	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
SC27	2001	M	NI	NI	LIQ	<i>neoformans</i>
SC28	2001	F	NI	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
SC29	2001	M	40	NI	PP	<i>neoformans</i>
SC30	2001	M	44	AIDS	HEMO	<i>neoformans</i>
SC32	2002	M	46	Hepatitis	HEMO	<i>neoformans</i>
SC33	2001	M	37	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
SC34	2001	M	34	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
SC35	2002	M	30	NI	LIQ	<i>neoformans</i>
SC36	2002	M	30	NI	NI	<i>neoformans</i>
SC38	2002	F	58	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
SC39	2002	F	12	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
SC40	2002	M	27	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
SC42	2002	M	55	NI	LIQ	<i>neoformans</i>

SC45	2002	M	33	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
SC49	2002	F	35	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
SC50	2002	M	34	NI	LIQ	<i>neoformans</i>
SC51	2002	M		NI	URI	<i>neoformans</i>
SC52	2002	M	46	AIDS	MO	<i>neoformans</i>
SC53	2002	F	28	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
SC54	2002	M	34	NI	LIQ	<i>neoformans</i>
SC55	2002	F		NI	LIQ	<i>neoformans</i>
SC56	2002	M	25	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
SC57	2002	M	48	Transplante pulmonar	LIQ	<i>neoformans</i>
SC59	2002	F	28	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
SC60	2002	F	41	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
SC63	2003	F	NI	NI	LIQ	<i>neoformans</i>
SC65	2003	M	32	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
SC67	2003	F	33	AIDS	ESC	<i>neoformans</i>
SC68	2003	F	37	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
SC69	2003	M	32	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
SC70	2003	F	28	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
SC71	2003	M	25	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
SC72	2003	M	37	AIDS	BN	<i>neoformans</i>
SC75	2003	M	70	Transplante pulmonar	URI	<i>neoformans</i>
SC76	2003	M	49	Transplante renal	BP	<i>neoformans</i>
SC78	2003	M	44	AIDS	BP	<i>neoformans</i>
SC80	2003	M	43	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
SC81	NI	NI	NI	NI	NI	<i>neoformans</i>
SC82	2003	M	53	Esclerose múltipla	BPU	<i>neoformans</i>
SC87	2003	M	63	Linfoma	HEMO	<i>neoformans</i>
SC88	2003	F	33	AIDS	LIQ	<i>neoformans</i>
SC91	2003	F	66	Transplante hepático	LIQ	<i>neoformans</i>
SC94	2003	M	86	Diabetes	URI	<i>neoformans</i>
SC3G	1996	M	12	NI	LIQ	<i>gattii</i>
SC4G	1996	F	6	NI	LIQ	<i>gattii</i>
SC6G	1997	M		NI	LIQ	<i>gattii</i>
SC7G	1998	M	19	NI	LIQ	<i>gattii</i>
SC9G	1999	M	50	NI	LIQ	<i>gattii</i>
SC10G	1999	M	47	NI	LIQ	<i>gattii</i>
SC12G	2000	F	NI	NI	LIQ	<i>gattii</i>

LIQ: líquido; HEMO: hemocultura; LB: lavado brônquico; URI: urina; PP: punção pulmonar; MO: medula óssea; ESC: escarro; BP: biópsia de pele; BPU: biópsia pulmonar; BN: biópsia nasal. NI: não informado; AIDS: Acquired Immunodeficiency Syndrome.

Tabela 4: Condições predisponentes à criptococose entre os pacientes estudados

Condição predisponente	Número de isolados (n = 121)	Porcentagem de isolados (%)
AIDS	112	92,6
Transplante	6	5
Esclerose múltipla/Linfoma	2	1,6
Diabetes	1	0,8

4.2.2. Cultivo em ágar CGB

Dentre os isolados do Laboratório de Micologia, 48 isolados foram caracterizados pelo CGB como *C. neoformans*, 7 isolados como *C. gattii* e 9 isolados mostraram-se duvidosos ao CGB. A maioria dos isolados do Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica foi caracterizada como *C. neoformans*, 101 isolados, e somente 8 isolados pertenciam à espécie *C. gattii* (Tabela 5).

Tabela 5: Número de isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* do Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica

	Número de isolados (n=109)	Porcentagem dos isolados (%)
<i>C. neoformans</i>	101	92,6
<i>C. gattii</i>	8	7,4

4.3. PCR multiplex

Os nove isolados que se mostraram duvidosos ao CGB, foram submetidos a PCR multiplex e apresentaram produtos de amplificação de 695 pb característicos de *C. neoformans* (Figura 3). Entre os isolados do Laboratório de Micologia 57 foram caracterizados como *C. neoformans* e 7 como *C. gattii* (Tabela 6).

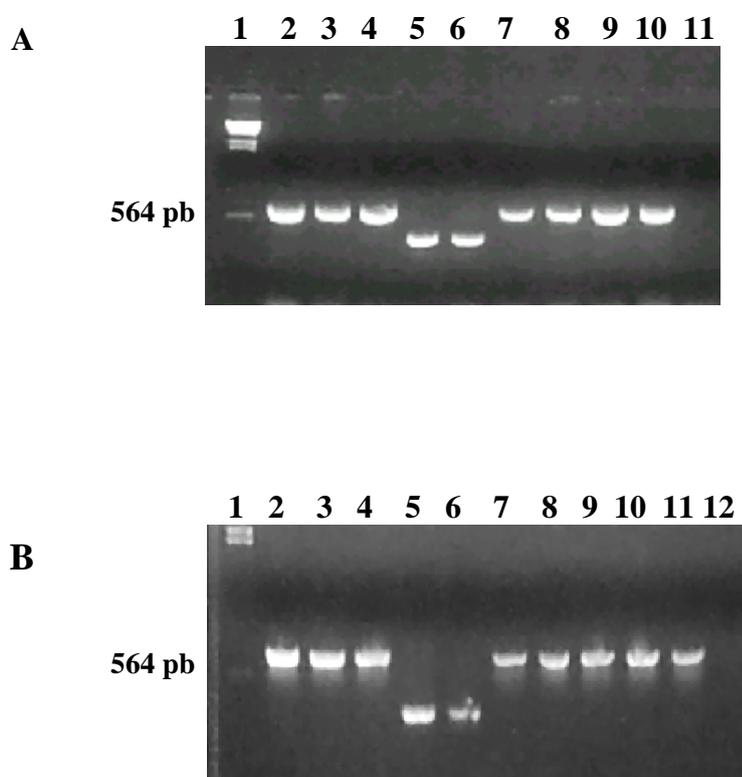


Figura 3: Identificação de *C. neoformans* e *C. gattii* por PCR multiplex utilizando os primers CNA70A, CNA70S, CNB49A e CNB49S. Gel de agarose dos produtos amplificados correspondentes a *C. gattii* (448 pb) e *C. neoformans* (695 pb).

Em A e B: 1- Marcador de tamanho molecular (λ /Hind III); 2 a 6 – controles positivos *C. neoformans* sorotipos A, D e AD, e *C. gattii* sorotipos C e B, respectivamente. Em A: 7 a 10 isolados clínico, SC60, SC25, SC38 e SC67; 11 - controle negativo. Em B: 7 a 11 isolados clínicos, SC9, SC24, SC68, SC81, SC88; 12 - controle negativo.

Tabela 6: Número de isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* do Laboratório de Micologia

	Número de isolados (n = 64)	Porcentagem dos isolados (%)
<i>C. neoformans</i>	57	89,1
<i>C. gattii</i>	7	10,9

4.4. Teste de microdiluição em caldo

As CIM dos 173 isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* testados variaram de 0,125 a 16 µg/mL de fluconazol, sendo a CIM 90% 4 µg/mL e a CIM 50% 2 µg/mL (Tabela 7). Os isolados de *C. neoformans* variaram de 0,125 a 8 µg/mL, enquanto os isolados de *C. gattii* variaram de 2 a 16 µg/mL (Tabela 8). Todos os isolados foram considerados sensíveis a fluconazol.

Tabela 7: Distribuição das CIMs para fluconazol dos isolados testados.

CIM (µg/mL)	Número de isolados (n = 173)	Porcentagem de isolados (%)
0,125	01	0,6
0,25	05	2,9
0,5	05	2,9
1,0	44	25,4
2,0	77	44,5
4,0	28	16,2
8,0	12	6,9
16,0	01	0,6
32,0	0	0

Tabela 8: Distribuição das CIMs para fluconazol entre os isolados de *C. neoformans* e *C. gattii*

CIM ($\mu\text{g/mL}$)	<i>C. neoformans</i> (n = 158)	<i>C. gattii</i> (n = 15)
0,125	01	-
0,25	05	-
0,5	05	-
1,0	44	-
2,0	76	01
4,0	24	04
8,0	03	09
16,0	-	01
32,0	-	-

5.5. Teste de indução de resistência

O número de subpopulações do isolado SC33 que cresciam no meio com fluconazol, diminuiu com o aumento da concentração do antifúngico. Das 50 colônias iniciais do teste, apenas uma gerou subpopulações que foram capazes de crescer até a concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ de fluconazol, sendo que nenhuma foi capaz de crescer até 100 $\mu\text{g/mL}$. No entanto, quando a subpopulação que cresceu a 50 $\mu\text{g/mL}$, foi submetida ao teste de microdiluição em caldo, a CIM permaneceu a mesma do isolado inicial, ou seja, 2 $\mu\text{g/mL}$.

5. DISCUSSÃO

A expressão de resistência a agentes antimicrobianos é uma consequência lógica e inevitável do uso destes agentes para tratar as infecções. As bactérias, que são os principais agentes de infecções, desenvolveram vários tipos de mecanismos para vencer a ação dos antibióticos e, por isso, estes têm sido extensamente estudados. Já os fungos, começaram a ter uma importância, altamente significativa, a partir do aumento da população de pacientes imunossuprimidos, o que tem levado ao aumento das micoses e, conseqüentemente, do uso dos agentes antifúngicos e da resistência a esses antifúngicos. Os mecanismos que levam ao desenvolvimento de resistência aos antifúngicos estão sendo estudados e, até agora, o gênero melhor estudado é *Candida sp.* No entanto, estes mecanismos podem ser compartilhados por outros gêneros, assim como as espécies de *Cryptococcus sp.* patogênicas. Realmente, um dos mecanismos de resistência comum a estes fungos é a superexpressão de proteínas que funcionam como bombas de efluxo para drogas (GHANNOUM & RICE 1999).

A resistência em *Cryptococcus sp.* tem ocorrido principalmente entre pacientes com AIDS que desenvolvem meningoencefalite criptocócica. Durante a terapia de manutenção com o azólico fluconazol, o fungo gera um mecanismo capaz de sobrepujar a ação do antifúngico, levando a recidiva da doença (BICANIC & HARRISON 2004).

No intuito de conhecer o nível de resistência entre isolados clínicos de *C. neoformans* e *C. gattii* muitos trabalhos têm sido realizados utilizando o teste de macrodiluição ou microdiluição em caldo para leveduras padronizado pelo NCCLS. Este trabalho buscou dados em nosso meio, que poderão contribuir para a continuidade dos estudos de resistência.

C. neoformans causa doença quase que exclusivamente entre pacientes imunossuprimidos (CASADEVALL & PERFECT 1998). De fato, a maioria dos isolados do presente trabalho, foram obtidos a partir de pacientes com algum tipo de imunossupressão. A AIDS esteve presente em 92,6% dos pacientes, sendo que 5% tinham sofrido transplante, 1,6% eram imunossupressos por linfoma ou esclerose múltipla e 0,8% eram diabéticos. Entre os 15 isolados de *C. gattii*, dois foram obtidos a partir de pacientes com SIDA e em relação aos outros 13 isolados, não foi informado se os pacientes apresentavam alguma condição predisponente ou não. *C. gattii* é considerado um patógeno primário, mas também pode causar doença em imunossuprimidos. Existem relatos que confirmam esta afirmação. Severo *et al.* (1999) fizeram o relato de três casos de pacientes com AIDS que tiveram criptococose por *C. gattii* no Sul do Brasil.

A criptococose emergiu como uma importante infecção oportunística, a partir dos anos 80, entre os pacientes com AIDS, ocorrendo em 5 a 10% destes pacientes (CASADEVALL & PERFECT 1998). As amostras deste trabalho foram isoladas entre 1992 e 2003, sendo que a idade média dos pacientes, de 37 anos, confronta-se com a idade média dos pacientes com HIV, ocorrendo variação entre 6 e 70 anos. A distribuição quanto ao sexo dos pacientes também corresponde aquela que geralmente ocorre com pacientes com HIV, 69,2% dos pacientes pertenciam ao sexo masculino e 30,8% ao sexo feminino.

A maioria dos isolados foram obtidos a partir de líquido (88,2%). Os outros materiais clínicos (11,8%) foram hemocultura, lavado brônquico, punção pulmonar, medula óssea, escarro, urina e biópsias. Estes dados corroboram o quadro clínico mais comum na criptococose como sendo a meningoencefalite. De fato, o fungo tem tropismo pelo SNC e tem sido sugerido que o seu neurotropismo está associado com sua habilidade em converter as catecolaminas, dopamina, norepinefrina e epinefrina, os neurotransmissores do SNC, em melanina. Esta funcionaria como um fator de virulência

que aumentaria a resistência das células fúngicas ao ataque pelos mecanismos efetores do hospedeiro. A melanina inibe a fagocitose mediada por macrófagos, protege contra a ação de derivados reativos de oxigênio e peptídeos microbicidas, além da luz ultravioleta, no ambiente (NOSANCHUK *et al.*, 2000; CASADEVALL *et al.*, 2000).

C. neoformans predominou entre os isolados. *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A) é o sorotipo mais distribuído no mundo e, portanto, o que mais tem sido isolado (SORREL & ELLIS 1997). Realizou-se apenas a diferenciação entre as espécies *C. neoformans* e *C. gattii*, pela utilização do ágar CGB. Este tem sido considerado um meio adequado para a diferenciação das espécies patogênicas de *Cryptococcus sp.*, mas pode resultar em falsos positivos para *C. gattii*, pela existência de cepas de *C. neoformans* resistentes à canavanina e que são capazes de assimilar glicina (NAKAMURA *et al.*, 1998; KHAN *et al.*, 2003).

Neste sentido as metodologias baseadas na análise do DNA, como a PCR multiplex realizada neste trabalho, são ferramentas importantes não só para estudos epidemiológicos, mas também para a diferenciação das espécies no laboratório clínico. *C. neoformans* e *C. gattii* causam doenças com perfis diferentes e, portanto, a sua diferenciação pode ajudar o médico na assistência ao paciente (CASADEVALL & PERFECT 1998).

A PCR multiplex foi adaptada a partir dos trabalhos realizados por Aoki *et al.* (1999), que utilizaram os dois pares de *primers* para distinguir os sorotipos A e B. No entanto, Casali *et al.* (2003) utilizaram estes *primers*, em um estudo de tipagem molecular de isolados clínicos e ambientais, no Sul do Brasil, e encontraram que estes *primers* são específicos para *C. neoformans* e *C. gattii*, não determinando o sorotipo.

A utilização da PCR multiplex foi importante para a identificação dos nove isolados de *C. neoformans* que se mostraram duvidosos ao CGB. Por outro lado, a utilização desta reação, combinada a um método rápido para a extração do DNA, mostra-se como uma

técnica promissora para uma rápida identificação da espécie de *Cryptococcus*, podendo ser realizada a partir do material clínico do paciente, sem a necessidade da fase preliminar de cultivo do microrganismo (CASALI *et al.*, 2003).

O teste de susceptibilidade padronizado pelo NCCLS é uma metodologia importante para o monitoramento do tratamento da criptococose (ALLER *et al.*, 2000). Devido a sua reprodutibilidade, tem sido usado para comparar os perfis de resistência entre regiões. As 173 amostras clínicas testadas neste trabalho foram consideradas sensíveis ao antifúngico fluconazol. Alguns autores consideram que uma CIM $\geq 16 \mu\text{g/mL}$ estaria correlacionada com maior probabilidade de falha terapêutica, mas isto tem sido referido a *C. neoformans*. O único isolado que apresentou CIM de $16 \mu\text{g/mL}$ foi identificado como *C. gattii*, espécie que tem se caracterizado por apresentar CIM maiores do que *C. neoformans* para a maioria das drogas antifúngicas (TRILLES *et al.*, 2004; PERFECT & COX 1999).

Poucos estudos têm sido feitos para determinar a correlação entre CIM e resposta clínica em infecções por *Cryptococcus sp.* Um estudo correlacionou os resultados do teste de susceptibilidade *in vitro*, recomendado pelo NCCLS, com a resposta *in vivo*, após a terapia de manutenção em pacientes com doença criptocócica e AIDS. A análise retrospectiva incluiu 25 pacientes que receberam terapia com fluconazol, sendo que 28 isolados a partir destes pacientes foram testados. A falha terapêutica foi observada em cinco pacientes, que foram infectados com isolados para os quais as CIMs foram $\geq 16 \mu\text{g/mL}$. Entre estes pacientes, quatro tinham recebido tratamento para candidíase de orofaringe e três tinham sofrido outros episódios de infecção criptocócica. Os autores concluíram que parece haver uma melhor expectativa de resposta clínica, durante a terapia de manutenção com fluconazol, se as CIMs são $< 16 \mu\text{g/mL}$ (TRILLES *et al.*, 2004).

A variação das CIMs observadas entre os isolados testados, de 0,125 a $16 \mu\text{g/mL}$ de fluconazol, concordam com outros estudos, nos quais as CIMs foram iguais ou similares.

Num estudo realizado no sul do Brasil com isolados clínicos e ambientais de *C. neoformans*, utilizando a mesma metodologia, as CIMs para isolados clínicos e ambientais apresentaram a variação de 0,125 a 16 µg/mL. A CIM 50% foi de 2,0 µg/mL para isolados clínicos e 0,5 µg/mL para isolados ambientais; a CIM 90% foi de 8 µg/mL para isolados clínicos e 4 µg/mL para os ambientais. Os isolados clínicos mostraram-se menos susceptíveis a fluconazol que os ambientais, possivelmente devido ao contato prévio com a droga daqueles isolados. Os autores enfatizam que o teste de susceptibilidade pode monitorar o desenvolvimento de resistência, pois embora a susceptibilidade não garanta o sucesso da terapia, a resistência, por outro lado, pode predizer falha terapêutica (ALVEZ *et al.*, 2001).

No presente trabalho a CIM 50% foi 2 µg/mL e a CIM 90% foi 4 µg/mL neste trabalho. Isolados clínicos de Goiânia testados para a susceptibilidade a fluconazol, apresentaram também estes valores. Porém, neste estudo, realizado com 70 isolados clínicos e 40 ambientais, os isolados clínicos variaram de 0,125 a 8 µg/mL e os ambientais de 0,25 a 2,0 µg/mL. Foi observado que as CIMs para *C. gattii* eram relativamente maiores que as CIMs para *C. neoformans* (SOUZA *et al.*, 2005).

As CIMs para *C. gattii* também mostraram-se maiores que para *C. neoformans* neste estudo, sendo que as suas CIMs variaram de 2 a 16 µg/mL e de 0,125 a 8 µg/mL, respectivamente. O perfil de susceptibilidade de *C. gattii* não tem sido tão estudado quanto *C. neoformans*, justamente pela maior prevalência deste último. Trilles *et al.* (2004) conduziram um estudo com 57 cepas de *C. gattii*, sendo 52 clínicas e 5 ambientais, e 30 cepas de *C. neoformans*, 23 de origem clínica e 7 ambientais. Os isolados clínicos foram recuperados a partir de pacientes com meningite criptocócica, das regiões norte, nordeste, sudeste e centroeste do Brasil. Realizaram teste de susceptibilidade com nove antifúngicos: albaconazol, anfotericina B, itraconazol, flucitosina, fluconazol, cetoconazol, ravuconazol

e voriconazol. Considerando-se as cepas das duas espécies juntas, as CIMs para fluconazol variaram de 1 a 64 µg/mL. No entanto, verificando-se os valores separadamente por espécie, *C. gattii* apresenta uma CIM 90% de 32 µg/mL, enquanto *C. neoformans* apresenta uma CIM 90% de 8 µg/mL, demonstrando claramente uma menor susceptibilidade para *C. gattii*. Este também se mostrou menos susceptível a todas as drogas testadas com exceção de anfotericina B e flucitosina. Os autores comentam que existem diferenças nas susceptibilidades antifúngicas entre as duas espécies e que outros estudos são necessários para determinar o valor preditivo real dos dados *in vitro*.

Um estudo foi realizado com 1811 isolados clínicos de *C. neoformans*, para determinar a tendência global de susceptibilidade antifúngica deste microrganismo, no período de 1990 a 2004. Participaram do estudo amostras da África, América Latina, Europa, Ásia e América do Norte. Somente 75% dos isolados da América do Norte foram susceptíveis a fluconazol (CIM ≤ 8 µg/mL), comparados a 94 a 100% em outras regiões. A razão para esta diferença pode ser o maior acesso e exposição a este agente na América do Norte. Os isolados da América Latina mostraram uma CIM 90% de 4 µg/mL, como no presente trabalho. Os autores concluíram que a resistência *in vitro* para os agentes antifúngicos usados no tratamento da criptococose permanece incomum entre isolados das cinco regiões geográficas e não aumentou num período de 14 anos (PFALLER *et al.*, 2005).

A ausência ou baixa frequência de isolados resistentes na maioria dos estudos realizados mostra que a resistência a fluconazol é incomum. Todavia, há evidências que comprovam que o desenvolvimento de resistência durante a terapia de manutenção pode ocorrer. Friese *et al.* (2001) relataram o caso de um paciente que apresentou recidiva da meningite criptocócica durante a terapia de manutenção com fluconazol. A CIM inicial do isolado era 8 µg/mL e, após a recidiva, passou para 64 µg/mL.

Seria razoável verificar-se que, após a exposição de um microrganismo a uma droga, este se tornaria resistente a esta droga. No entanto, não foi o que ocorreu após o teste de indução de resistência a fluconazol com o isolado SC33. Posteraro *et al.* (2003) induziram resistência a fluconazol e obtiveram quatro subpopulações que cresceram no meio com 100 µg/mL de fluconazol. Selecionaram uma para o teste de susceptibilidade e a sua CIM havia aumentado para 64 µg/mL, sendo que o fenótipo de resistência manteve-se após várias passagens em meio sem fluconazol, indicando que ocorreu uma alteração genética na subpopulação. O teste realizado nas mesmas condições, no entanto, levou uma subpopulação a crescer no meio com até 50 µg/mL, mas não ocorreu o desenvolvimento de resistência. Ao crescer num meio sem fluconazol para a realização do teste de susceptibilidade, a subpopulação voltou a apresentar a CIM do isolado SC33 de 2µg/mL, sendo que o fenótipo de resistência a droga, verificado durante o teste de indução de resistência, foi apenas um fenômeno transitório. Parece que somente a exposição do fungo à droga não determina que o mesmo adquira resistência. Outros fatores, como as características genéticas da cepa, também podem ser importantes.

A heterogeneidade de resistência a fluconazol observada durante o teste, no qual várias subpopulações, a partir de um único isolado, demonstraram diferentes susceptibilidades ao antifúngico, tem sido vista também em outros estudos. Xu *et al.* (2001) investigaram os padrões de mutação para a resistência a fluconazol em *C. neoformans in vitro*. Utilizaram 21 cepas com diferentes CIMs (0,25 a 4 µg/mL) e realizaram seis culturas a partir de uma única colônia de cada cepa, sendo então subcultivadas em ágar YMA com 8 µg/mL de fluconazol. Foi determinada a CIM para as subpopulações que cresceram neste meio e calculada a taxa de mutação. Foi observada uma heterogeneidade significativa nas taxas de mutações entre as cepas, bem como entre as subpopulações de uma mesma cepa. Não foi encontrada nenhuma correlação

estatisticamente significativa entre a CIM original e a taxa de mutação para resistência a fluconazol. Os autores concluíram que os processos de mutação que levam à resistência a fluconazol em *C. neoformans*, é dinâmico e heterogêneo. Na ausência de mutações que levem à resistência estável, adaptações fisiológicas transitórias podem ocorrer. Essas adaptações poderiam resultar na sobrevivência e reprodução de subpopulações, durante a terapia com fluconazol. Isto explicaria os casos de falha no tratamento, em que as CIMs do isolado pré e pós tratamento não aumentam.

O teste de microdiluição em caldo padronizado pelo NCCLS é uma metodologia promissora para ser utilizada não só em pesquisa, mas também no laboratório clínico. Ter acesso a CIM de fungos com elevada morbidade e mortalidade como *Candida sp.* e as espécies patogênicas de *Cryptococcus sp.*, pode ser um diferencial muito grande, e, neste sentido, a comercialização de kits com placas prontas e, até mesmo, a disponibilização de sistemas automatizados, provavelmente será uma realidade.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBEG, M.A.; CELLA, F.L.; FAGANELLO, J.; VALENTE, P.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolated from the excreta of Psittaciformes in a Southern Brazilian zoological garden. *Mycopathologia* 161(2) 83-91, 2006.

ALLER, A.I.; MARTIN-AZUELOS, E.; LOZANO F.; GOMEZ-MATEOS J.; STEELE-MOORE L., HOLLOWAY W.J.; GUTIÉRREZ M.J.; RECIO F.J.; ESPINEL-INGROFF, A. Correlacion of fluconazole MICs with clinical outcome in cryptococcal infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44(6) 1544-1548, 2000.

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* 43(5): 267-270, 2001.

ASSING, K.; BIRGENS, H.; ARENDRUP, M. *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* resistant to fluconazole in an HIV-negative patient with chronic lymphocytic leukemia. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 9 (5): 441-444, 2003.

AOKI, F.H.; IMAI, T.; TANAKA, R.; MIKAMI, Y.; TAGUCHI, H.; NISHIMURA, N.F.; NISHIMURA, K.; MIYAJI, M.; SCHREIBER, A.Z.; BRANCHINI, M.L. New PCR primer pairs specific for *Cryptococcus neoformans* serotype A or B prepared on the basis of random amplified polymorphic DNA fingerprinting pattern analyses. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 315-320, 1999.

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

BLACKSTOCK, R.; BUCHANAN, K.L.; CHERNIAK, R.; MITCHELL, T.G.; WONG, B.; BARTISS, A.; JACKSON, L.; MURPHY, J.W. Pathogenesis of *Cryptococcus neoformans* is associated with quantitative differences in multiple virulence factors. *Mycopathologia* 147: 1-11, 1999.

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* 147, 891-907 2001.

BRANDT, M.E., PFALLER, M.A.; HAJJEH, R.A.; HAMILL, R.J.; PAPPAS, P.G.; REINGOLD, A.L.; RIMLAD, D.; WARNOCK, D.W. and THE CRYPTOCOCCAL DISEASE ACTIVE SURVEILLANCE GROUP. Trends in antifungal drug susceptibility of *Cryptococcus neoformans* isolates in the United States: 1992 to 1994 and 1996 to 1998. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45(11): 3065-3069, 2001.

CALVO, B.M.; COLOMBO, A.L.; FISCHMAN, O., SANTIAGO, A.; THOMPSON, L.; LAZERA, M.; TELLES, F.; FUKUSHIMA, K.; NISHIMURA, K.; TANAKA, R.; MYIAJY, M.; MORETTI-BRANCHINI, ML. Antifungal susceptibilities, varieties, and electrophoretic karyotypes of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* from Brazil, Chile, and Venezuela. *Journal of Clinical Microbiology* 39(6): 2348-2350, 2001.

CANTEY, P.T.; STEPHENS D.S.; RIMLAND, D. Prevention of cryptococcosis in HIV-infected patients with limited access to highly active antiretroviral therapy: evidence for primary azole prophylaxis. *British HIV Association HIV Medicine* 6: 253-259, 2005.

CASADEVALL, A.; PERFECT, J.R. *Cryptococcus neoformans*. Washington: ASM Press, 1998.

CASADEVALL, A.; ROSAS, A.L.; NOSANCHUK, J.D. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Current Opinion in Microbiology* 3: 354-358, 2000.

CASADEVALL, A.; STEENBERGEN, J.N.; NOSANCHUK, J.D. 'Ready made' virulence and 'dual use' virulence factors in pathogenic environmental fungi – the *Cryptococcus neoformans* paradigm. *Current Opinion in Microbiology* 6: 332-337, 2003.

CASALI, A K.; GOULART, L.; ROSA & SILVA, L.K.; RIBEIRO, A M.; AMARAL, A A; ALVES, S.H.; SCHRANK, A; MEYER, W.; VAINSTEIN, M.H. Molecular typing of clinical and enviromental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. *FEMS Yeast Research* 3(4): 405-415, 2003.

CHANG, W.; HUANG, C.; LEI, C.; LEE, P.; CHIEN, C.; CHANG, H.; CHANG, C.; LU, C. Serotypes of clinical cerebrospinal fluid *Cryptococcus neoformans* isolates from Southern Taiwan and their in vitro susceptibilities to amphotericin B, fluconazole and voriconazole. *Journal of Infectious Diseases* 57: 113-115, 2004.

COLOMBO, A.L.; ALVES, S.H. Teste de susceptibilidade a antifúngicos. Em: SIDRIN, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. Micologia médica à luz de autores contemporâneos. Cap.10, p.102-111, Ed. Guanabara Koogan, 2004.

CORREA, M.P.S.C.; OLIVEIRA, E.C.; DUARTE, R.R.B.S.; PARDAL, P.P.O.; OLIVEIRA, F.M.; SEVERO, L.C. Criptococose em crianças no Estado do Pará, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 32 (5): 505-508, 1999.

FELDMESSER, M.; TUCKER, S.; CASADEVALL, A. Intracellular parasitism of macrophages by *Cryptococcus neoformans*. *Trends in Microbiology* 9(6): 273-278, 2001.

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* 37(3): 838-840, 1999.

FRIESE, G.; DISCHER, T.; FÜSSLE, R.; SCHMALRECK, A.; LOHMEYER, J. Development of azole resistance therapy for AIDS-associated cryptococcal disease. *AIDS* 15(17): 2344-2345, 2001.

GATES, M.A.; THORKILDSON, P., KOZEL, T.R. Molecular architecture of the *Cryptococcus neoformans* capsule. *Molecular Microbiology* 52(1):13-24, 2004.

GHANNOUM, M.A.; RICE, L.B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 12(4): 501-517, 1999.

IDNURM, A.; BAHN, YS.; NIELSEN, K.; LIN, X.; FRASER, J.A.; HEITMAN, J. Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Nature* 3: 753-764, 2005.

IKEDA, R.; SUGITA, T.; JACOBSON, E.S.; SHINODA, T. Effects of melanin upon susceptibility of *Cryptococcus* to antifungals. *Microbiology and Immunology* 47 (4): 271-277, 2003.

JOHNSON, L.B.; KAUFFMAN, C.A. Voriconazole: a new triazole antifungal agent. *Review of Anti-Infective Agents* 36: 630-637, 2003.

KHAN, Z.U.; AL-ANEZI, A.; CHANDY, R.; XU, J. Disseminated cryptococcosis in an AIDS patient caused by a canavanine-resistant strain of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*. *Journal of Medical Microbiology* 52: 271-275, 2003.

KIDD, S.E.; HAGEN, F.; TSCHARKE, R.L.; HUYNH, M.; BARTLETT, K.H.; FYFE, M.; MACDOUGALL, L.; BOEKHOUT, T.; KWON-CHUNG, K.J.; MEYER, W. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (49): 17258-17263, 2004.

KWON-CHUNG, K.J.; BENNET, J.E. Medical Mycology. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992.

KWON-CHUNG, K.J.; BOEKHOUT, T.; FELL, J. W.; DIAZ, M. Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacilliporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae). *Taxon* 51:804-806, 2002.

KWON-CHUNG, K.J.; BENNET, J.E; POLACHECK, I. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C). *Journal of Clinical Microbiology* 15 (3):535-537, 1982.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. Tratado de Micologia Médica. 9.ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. Guia para identificação: fungos, actinomicetos, algas de interesse médico. São Paulo: Sarvier, 1998.

LAZÉRA, M.S.; IGREJA, R.P.; WANKE, B. Criptococose Em: SIDRIN, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. Micologia médica à luz de autores contemporâneos. Cap.24, 252-264, Guanabara Koogan, 2004.

LITVINTSEVA, A.P.; THAKUR, R.; RELLER, L.B.; MITCHELL, T.G. Prevalence of clinical isolates of *Cryptococcus gattii* serotype C among patients with AIDS in Sub-Saharan Africa. *The Journal of Infectious Diseases* 192: 888-892, 2005.

LOFTUS, B.J.; FUNG, E.; RONCAGLIA, P.; ROWLEY, D.; AMEDEO, P.; *et al.* The genome of the basidiomycetous yeast and human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Science* 307: 1321-1324, 2005.

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 of Clinical Microbiology* 39(9): 3365-3367, 2001.

MEYER, W.; CASTAÑEDA, A.; JACKSON, S.; HYNH, M.; CASTAÑEDA, E. and the Iberoamerican Cryptococcal Study Group. Molecular typing of iberoamerican *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerging Infections Diseases* 9(2): 189-195, 2003.

MEYER, W.; MARSZEWSKA, K.; AMIRMOSTOFIAN, M.; *et al.* Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly polymorphic DNA, a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. *Electrophoresis* 20: 1790-1799, 1999.

MILAN, E.P.; ZAROR, L. Leveduras: Identificação Laboratorial. Em: SIDRIN, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. Micologia médica à luz de autores contemporâneos. Cap.9, p. 89 - 101, Ed Guanabara Koogan, 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e AIDS. Recomendações para a terapia antiretroviral em adultos e adolescentes infectados pelo HIV. Brasília, 2004.

MITCHELL, T.G.; PERFECT, J.R. Cryptococcosis in the era of AIDS – 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clinical Microbiology Reviews* 8(4): 515-548, 1995.

MONDOM, 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* 43(8): 1856-1861, 1999.

NAKAMURA, Y.; KANO, R.; SATO, H.; WATANABLE, S.; TAKAHASHI, H.; HASEGAWA, A. Isolates of *Cryptococcus neoformans* serotype A and D developed on canavanine-glicyne-bromothymol blue medium. *Mycoses* 41: 35-40, 1998.

NCCLS - NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved standard, 2ed. Document M27-A2, 22(15), 2002.

NISHIKAWA, M.M.; LAZERA, 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* 41(1): 73-77, 2003.

NOSANCHUK, J.D.; ROSAS, A.L.; LEE, S.C.; CASADEVALL, A. Melanisation of *Cryptococcus neoformans* in human brain tissue. *The Lancet* 355: 2049-2050, 2000.

NUCCI, M.; COLOMBO, A.L. Emergence of resistant *Candida* in neutropenic patients. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 6(3): 124-128, 2002.

OLIVEIRA, M.T.B.; BOEKHOUT, T.; THEELEN, B.; HAGEN, F.; BARONI, F.A.; LAZERA, M.S.; LENGELER, K.B.; HEITMAN, J.; RIVERA, I.N.G.; PAULA, C.R. *Cryptococcus neoformans* shows a remarkable genotypic diversity in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology* 42(3): 1356-1359, 2004.

PAPPALARDO, M.C.S.M.; MELHEM, M.S.C. Cryptococcosis: a review of the Brazilian experience for the disease. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 45(6): 299-305, 2003.

PEREA, S.; PATTERSON, T.F. Antifungal resistance in pathogenic fungi. *Antimicrobial Resistance* 15: 1073-1080, 2002.

PERFECT, J.R.; COX, G.M. Drug resistance in *Cryptococcus neoformans*. *Drug Resistance Updates* 2: 259-269, 1999.

PERFECT, J.R.; WONG, B.; CHANG, Y.C.; KWON-CHUNG, K.J.; WILLIANSONS, P.R. *Cryptococcus neoformans*: virulence and host defences. *Medical Mycology* 36(1): 79-86, 1998.

PFALLER, M.A.; MESSER, S.A.; BOYKEN, L.; HOLLIS, R.J.; RICE, C.; TENDOLKAR, S.; DIEKEMA, D.J.; DOERN, G.V. Global trends in the antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* (1990 to 2004). *Journal of Clinical Microbiology* 43 (5):2163-2167, 2005.

PFALLER, M.A.; MESSER, S.A.; BOYKEN, L.; HOLLIS, R.J.; RICE, C.; TENDOLKAR, S.; DIEKEMA, D.J. In vitro activities of voriconazole, posaconazole, and fluconazole against 4,169 clinical isolates of *Candida spp.* and *Cryptococcus neoformans* collected during 2001 and 2002 in the ARTEMIS global antifungal surveillance program. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 48: 201-205, 2004.

POETA, M. D. Role of phagocytosis in the virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Eukariotic Cell* 3 (5): 1067-1075, 2004

POETA, M.D.; TOFFALETTI, D.L.; RUDE, T.H.; DYKSTRA, C.C.; HEITMAN, J.; PERFECT, J.R. Topoisomerase I is essential in *Cryptococcus neoformans*: role in pathobiology and as an antifungal target. *Genetics* 152: 167-178, 1999.

POLACHEK, I.; HEARING, V.J.; KWON-CHUNG, K.J. Biochemical studies of phenoloxodase and utilization of catecholamines in *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Bacteriology* 150 (3): 1212-1220, 1982.

POSTERARO, B.; SANGUINETTI, M.; SANGLARD, D.; SORDA, M.; BOCCIA, S.; ROMANO, L.; MORACE, G., FADDA, G. Identification and characterization of a *Cryptococcus neoformans* ATP binding cassette (ABC) transporter-encoding gene, CnAFR1, involved in the resistance to fluconazol. *Molecular Microbiology* 47(2): 357-371, 2003

RODERO, L.; MELLADO, E.; RODRIGUEZ, C.; SALVE, A.; GUELFAND, L.; CAHN, P.; CUENCA-ESTRELLA, M.; DAVEL, G.; RODRIGUEZ-TUDELA, J.L. G484S Amino acid substitution in lanosterol 14- α demethylase (*ERG11*) is related to fluconazole resistance in a recurrent *Cryptococcus neoformans* clinical isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47 (11): 3653-3656, 2003.

SANGLARD, D. Resistance of human pathogens to antifungal drugs. *Current Opinion in Microbiology* 5: 379-385, 2002.

SEVERO, L.C.; OLIVEIRA, F.M.; LONDERO, A.T. Cryptococcosis due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in brasilian patients with AIDS. Report of three cases. *Revista Iberoamericana de Micologia* 16: 152-154, 1999.

SEVERO, L.C., ZARDO, I.B., LONDERO, A.T. Cutaneous cryptococcosis due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *Revista Iberoamericana de Micologia* 18: 200-201, 2001.

SHEEHAN, D.J.; HITCHCOCK, C.A.; SIBLEY, C.M. Current and emerging azole antifungal agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12 (1): 40-79, 1999.

SHIELDS, A.B.; AJELLO, L. Medium for selective isolation of *Cryptococcus neoformans*. *Science* 151: 208-209, 1966.

SORREL, T.C.; ELLIS, D.H. Ecology of *Cryptococcus neoformans*. *Revista Iberoamericana de Micologia* 14: 42-43, 1997.

SOUZA, L.K.H.; FERNANDES, O.F.L.; KOBAYASHI, C.C.B.A.; PASSOS, X.S.; COSTA, C.R.; LEMOS, J.A.; SOUZA-JÚNIOR, A.H.; SILVA, M.R.R. Antifungal susceptibilities of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* in

Goiânia city, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 47 (5): 253-256, 2005.

THORNEWELL, S.J.; PEERY, R.B.; SKATRUD, P.L. Cloning and characterization of CneMDR1: a *Cryptococcus neoformans* gene encoding a protein related to multidrug resistance proteins. *Gene* 12, 201(1-2): 21-29, 1997.

TRILLES, L.; FERNANDEZ-TORRES, B.; LAZÉRA, M.S.; WANKE, B.; GUARRO, J. In vitro antifungal susceptibility of *Cryptococcus gattii*. *Journal of Clinical Microbiology* 42 (10): 4815-4817, 2004.

TRUJILLO, J.R.; JARAMILLO-RANGEL, G.; ORTEGA-MARTINEZ, M.; PENALVA de OLIVEIRA, A.C.; VIDAL, J.E.; BRYANT, J.; GALLO, R.C. International NeuroAIDS: prospects of HIV-1 associated neurological complications. *Cell Research* 15 (11-12): 962-969, 2005.

VAN DUIN, D.; CLEARE, W.; ZARAGOZA, O.; CASADEVALL, A.; NOSANCHUK, J.D. Effects of voriconazole on *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48 (6):2014-2020, 2004.

WHITE, T.C.; MARR, K.A.; BOWDEN, R.A. Clinical, cellular and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 11(2): 382-402, 1998.

XU, J.; ONYEWU, C.; YOELL, H.J.; ALI, R.Y.; VILGALYS, R.J.; MITCHELL, T.G. Dynamic and heterogeneous mutations to fluconazole resistance in *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45(2): 420-427, 2001.