

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

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL FRENTE A PROTEÍNAS DE  
*Cryptococcus neoformans*

JORGE ANDRÉ HORTA

PORTO ALEGRE, OUTUBRO DE 2006

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

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL FRENTE A PROTEÍNAS DE**  
*Cryptococcus neoformans*

JORGE ANDRÉ HORTA

Professor Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Marilene Henning Vainstein

PORTO ALEGRE, OUTUBRO DE 2006

## **AGRADECIMENTOS**

A Dra. Marilene Henning Vainstein pela orientação, oportunidade e por ter me recebido em seu laboratório onde desenvolvi a parte experimental do trabalho ora apresentado.

A todos os colegas e amigos do laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica do Centro de Biotecnologia – UFRGS e do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular pela amizade e apoio.

Aos professores de Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia pelos ensinamentos e contribuições no decorrer de meu trabalho.

Ao Luciano Saucedo e Silvia Regina Centeno pela dedicação constante.

A Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC, pela concessão de Bolsa de qualificação docente que possibilitou meu aperfeiçoamento.

Aos meus filhos, George e Luísa, e esposa Norma, partes importantes da minha vida.

As agências de fomento do Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica do Centro de Biotecnologia da UFRGS: CNPq, CAPES e FAPERGS.

## ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES.....	5
LISTA DE TABELAS.....	7
LISTA DE FIGURAS .....	8
RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1 ASPECTOS GERAIS.....	21
1.2 EPIDEMIOLOGIA.....	30
1.2.1 ISOLAMENTO DE <i>C. NEOFORMANS</i> DO AMBIENTE.....	30
1.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	33
1.4 <i>C. NEOFORMANS</i> E CRIPTOCOCOSE.....	33
1.5 DIAGNÓSTICO E ASPECTOS IMUNOLÓGICOS.....	36
2. OBJETIVOS.....	41
2.1 OBJETIVO GERAL.....	41
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
3.1 ISOLADOS E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO .....	42
3.2 EXTRATOS DE PROTEÍNAS FÚNGICAS.....	42
3.3 TESTE IMUNO ENZIMÁTICO ELISA.....	43
3.4 ELETROFORESE EM SDS-PAGE.....	43
3.5 TRANSFERÊNCIA DE PROTEÍNAS PARA MEMBRANA DE NITROCELULOSE .....	44
3.6 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO .....	44
3.7 POPULAÇÃO ESTUDADA .....	45
3.8 PESQUISA DE POLISSACARÍDEO CAPSULAR NO SORO .....	45
3.9 ESTUDOS DE ADSORÇÃO.....	46
3.10 TRATAMENTO COM PERIODATO DE SÓDIO .....	46
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
4.RESULTADOS.....	47
5. DISCUSSÃO.....	62
6. REFERÊNCIAS .....	72
ANEXO 1:CURRICULUM VITAE.....	96
ANEXO 2: PRODUÇÃO INTELECTUAL COMPLEMENTAR.....	106
SUSCEPTIBILITY TO HEAT AND ANTIFUNGAL AGENTS OF <i>CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS</i> VAR. <i>NEOFORMANS</i> (SEROTYPE D) ISOLATED FROM <i>EUCALYPTUS</i> SPP IN RIO GRANDE DOSUL, BRAZIL	
ANEXO 3: PRODUÇÃO INTELECTUAL COMPLEMENTAR.....	113
CARBOHYDRATE ASSIMILATION PROFILES OF BRAZILIAN <i>Candida dubliniensis</i> ISOLATES BASED ON ID 32C SYSTEM	

**LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES**

<b>AIDS</b>	<b>Síndrome da imunodeficiência adquirida</b>
<b>ATCC</b>	<b>American Type Culture Collection</b>
<b>CDC</b>	<b>Centro de Controle de Doenças</b>
<b>CGB</b>	<b>Ágar canavanina Glicina Azul de Bromotimol Timina</b>
<b>DNA</b>	<b>Ácido Desoxirribonucléico</b>
<b>EDTA</b>	<b>Ácido etileno-diamino-tetra-acético</b>
<b>EUA</b>	<b>Estados Unidos da América</b>
<b>g</b>	<b>Gramma</b>
<b>GalXM</b>	<b>Galactoxilomanana</b>
<b>GXM</b>	<b>Glicuronoxilomanana</b>
<b>HIV</b>	<b>Vírus da imunodeficiência humana</b>
<b>kDa</b>	<b>quilo Dalton</b>
<b>L</b>	<b>Litro</b>
<b>L.C.R.</b>	<b>Líquido céfalo raquidiano</b>
<b>mg</b>	<b>Miligramas</b>
<b>mL</b>	<b>Mililitro</b>
<b>mm<sup>3</sup></b>	<b>Milímetros cúbicos</b>
<b>MP</b>	<b>Manoproteína</b>
<b>PCR</b>	<b>Reação em cadeia de polimerase</b>
<b>RAPD</b>	<b>Amplificação aleatória de DNA polimórfico</b>
<b>rpm</b>	<b>Rotações por minuto</b>
<b>RS</b>	<b>Rio Grande do Sul</b>
<b>SNC</b>	<b>Sistema nervoso central</b>

<b>UFC</b>	<b>Unidade Formadora de colônia</b>
<b>var</b>	<b>Variedade</b>
<b>µL</b>	<b>Microlitro</b>
<b>µm</b>	<b>Micrometro</b>
<b>°C</b>	<b>Graus centígrados</b>

**LISTA DE TABELAS**

	Página
<b>TABELA 1:</b> Variedades e sorotipos da espécie <i>C. neoformans</i> .....	20
<b>TABELA 2:</b> Fonte e características dos soros de pacientes com criptococose utilizados neste estudo.....	49
<b>TABELA 3:</b> Percentagem de reatividade dos soros frente aos diferentes extratos de <i>C. neoformans</i> .....	59
<b>TABELA 4:</b> Percentagem de pacientes, trabalhadores e crianças com reatividade contra proteínas de extrato protéico total de <i>C. neoformans</i> ATCC 32045 sorotipo A.....	60
<b>TABELA 5:</b> Percentagem de pacientes, trabalhadores e crianças com reatividade contra proteínas de extrato protéico de isolado clínico de <i>C. neoformans</i> sorotipo A.....	60

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>FIGURA 1:</b> Evidenciação da cápsula de <i>C. neoformans</i> .....	17
<b>FIGURA 2:</b> Coloração com prata de <i>C. neoformans</i> presente no líquido céfalo-raquidiano (LCR) em paciente com AIDS .....	17
<b>FIGURA 3:</b> Preparação de <i>C. neoformans</i> em tinta da Índia. LCR de paciente com meningite criptocócica.....	18
<b>FIGURA 4:</b> Análise das proteínas de <i>Cryptococcus neoformans</i> por eletroforese em SDS-PAGE a 12% corado com Azul de Coomassie .....	47
<b>FIGURA 5:</b> Análise por ELISA de IgG total sérica de 26 pacientes adultos, 24 trabalhadores em laboratório e 48 crianças, frente a extrato de proteínas de isolado clínico de <i>C. neoformans</i> sorotipo A.....	50
<b>FIGURA 6:</b> Análise por ELISA de IgG total sérica de 26 pacientes adultos, 24 trabalhadores em laboratório e 48 crianças, frente a extrato de proteínas de <i>C. neoformans</i> ATCC 32045 sorotipo A.....	51
<b>FIGURA 7:</b> Análise por ELISA de IgG sérica de 26 pacientes adultos, 24 trabalhadores em laboratório e 48 crianças, frente a extrato de proteínas de <i>C. neoformans</i> de isolado clínico sorotipo A e ATCC 32045 sorotipo A.....	52
<b>FIGURA 8:</b> Análises de leituras de densidade ótica (OD) de IgG sérica de 26 pacientes adultos, frente a extratos de proteínas de <i>C. neoformans</i> de isolado clínico sorotipo A e ATCC 32045 sorotipo A.....	53
<b>FIGURA 9:</b> Análises de leituras de densidade ótica (OD) de IgG sérica da amostra estudada frente a extratos de proteínas de <i>C. neoformans</i> de isolado clínico sorotipo A e ATCC 32045 sorotipo A .....	54
<b>FIGURA 10:</b> Análise por <i>Western blot</i> da reatividade de anticorpos de classe IgG de soro de pacientes com criptococose na diluição 1:100, frente a extrato protéico total de <i>C. neoformans</i> ATCC 32045 sorotipo A.....	55
<b>FIGURA 11:</b> Análise por <i>Western blot</i> da reatividade de anticorpos de classe IgG de soro de pacientes com criptococose na diluição 1:100, frente a extrato protéico total de isolado clínico de <i>C. neoformans</i> sorotipo A.....	56
<b>FIGURA 12:</b> Análise por <i>Western blot</i> com a utilização de extrato protéico total de <i>C. neoformans</i> ATCC 32045 sorotipo A .....	57



**FIGURA 13:** Análise por *Western blot* da reatividade de anticorpos de classe IgG de soro de trabalhadores em laboratório na diluição 1:100, frente a extrato protéico total de isolado clínico de *C. neoformans* sorotipo A.....57

**FIGURA 14:** Análise por *Western blot* da reatividade de anticorpos de classe IgG de soro de crianças na diluição 1:100, frente a extrato protéico total de isolado clínico de *C. neoformans* sorotipo A .....58

**FIGURA 15:** Análise por *Western blot* da reatividade de anticorpos de classe IgG de soro de pacientes na diluição 1:100, frente a extrato protéico total de isolado clínico de *C. neoformans* sorotipo A após tratamento com periodato de sódio.....58

**FIGURA 16:** Correlação entre leituras de ELISA e número de bandas detectadas no soro de pacientes com criptococose contra o extrato protéico ATCC .....60

**FIGURA 17:** Correlação entre leituras de ELISA e número de bandas detectadas no soro de pacientes com criptococose contra o extrato protéico C101.....61

## RESUMO

A criptococose é uma micose profunda causada pela levedura encapsulada *Cryptococcus neoformans*, um basidiomiceto que geralmente acomete pacientes imunocomprometidos. A infecção primária é pulmonar, ocorrendo posteriormente sua disseminação para outros sítios anatômicos, sendo a meningoencefalite a forma clínica mais comum e também a maior causa de morte por esta infecção. A grande proporção de humanos infectados ocorre em pacientes imunocomprometidos embora também possa causar infecção em indivíduos hígidos. Este estudo teve como objetivo geral a avaliação da prevalência de anticorpos de classe IgG frente a dois extratos protéicos da levedura *C. neoformans*: uma amostra ATCC sorotipo A e um isolado clínico recente da levedura *C. neoformans* var. *grubii*. Foram analisadas 26 amostras de soro de pacientes com criptococose, provenientes da soroteca do Laboratório de Micologia do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM). Também fazem parte desta investigação de soroprevalência, 24 amostras de soro de trabalhadores em laboratório de pesquisa, que manipulam a levedura *C. neoformans* e 48 pacientes pediátricos atendidos no ambulatório do Hospital Trombudo, no município de Vale do Sol. A resposta imune humoral de anticorpos de classe IgG contra antígenos protéicos de *C. neoformans* apresentou um grande número de proteínas reconhecidas pelos soros de pacientes com criptococose e dos trabalhadores em laboratório onde a levedura é manipulada. A massa molecular dos principais antígenos imunodominantes reconhecidos foi de aproximadamente 25, 34, 38, 50, 60, 70, 80, 95, 100 e 110 kDa. Estes principais antígenos identificados podem tornar-se de grande relevância para a elaboração de testes diagnósticos, identificação de possíveis alvos, elaboração de vacinas e para avaliação do estado imunitário em relação ao desenvolvimento da criptococose.

## ABSTRACT

*Cryptococcus neoformans* is a pathogenic fungus that causes life-threatening meningoencephalitis in HIV positive patients, and in patients subjected to immunosuppressive therapies. The objective of this study was to investigate the profile of immune humoral responses to *C. neoformans* proteins by means of the analysis of sera from three groups consisting of 48 children, 24 laboratory workers, and 26 patients with acute cryptococcal meningitis. The results of latex polysaccharide antigen detection were positive and similar to the ones from the culture of cerebrospinal fluid (CSF) for fungal infection in all 26 patients. Analysis of the IgG antibody response to protein antigens by ELISA revealed different levels of recognition when comparing protein extracts originated from American Type Culture Collection (ATCC), and a Brazilian strain recently isolated in a clinical sample of CSF ( $P < 0,05$ ). Reactivity to *C. neoformans* proteins analysed by Western blot showed ten antigens which were more frequently recognized with a relative molecular mass of approximately 25, 34, 38, 50, 60, 70, 80, 95, 100 and 110 kDa. The differences in sera antigen recognition were minimal when comparing different protein extracts. The identification of these antigens decreased by absorbing the sera with *C. neoformans* extracts. Periodate treatment reduced the intensity of antigen recognition, but did not eliminate reactivity to any individual antigen. Strain and host factors were important when studying the immune response to *C. neoformans* infection. Our findings support clinical and epidemiological data showing differences in the susceptibility to cryptococcosis, and the use of these techniques may be a powerful tool to evaluate the human population in serological studies.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Aspectos gerais

Nas duas últimas décadas, a incidência de infecções fúngicas invasivas tem aumentado dramaticamente e o espectro dos agentes etiológicos tem apresentado alterações (SINGH, 2001). As novas técnicas de transplante de célula tronco, a melhoria das práticas de transplante de órgãos sólidos, os novos métodos de diagnóstico, o uso de novos medicamentos imunossuppressores, os avanços da quimioterapia antitumoral, a profilaxia com antimicrobianos e o aprimoramento nas medidas de suporte de doentes críticos são os principais determinantes de mudanças no padrão epidemiológico das micoses sistêmicas (McNEIL *et al.*, 2001). Diante deste novo quadro, as infecções fúngicas oportunistas tornaram-se a principal causa de morbidade e mortalidade em pacientes graves. O reconhecimento desses processos, muitas vezes, é difícil e controverso (DONNELLY, 2002; MAERTENS *et al.*, 2001). Recentemente, o Grupo de Infecções Fúngicas Invasivas da Organização Europeia de Pesquisa e Tratamento do Câncer (EORTC) e o Grupo de Estudos de Micoses do Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas dos Estados Unidos da América (NIAID) apresentaram uma proposta de padronização de critérios de diagnóstico para as infecções fúngicas invasivas oportunistas (DENNING *et al.*, 2003). Com base em revisões de literatura e em um consenso internacional, um conjunto de definições para as infecções sistêmicas mais frequentemente observadas e estudadas em pacientes imunocomprometidos foi desenvolvido, a partir de elementos patológicos e laboratoriais.

Os organismos taxonomicamente agrupados no Reino Fungi são em geral espécies saprófitas, especialmente bem adaptadas ao crescimento em uma variedade de condições ambientais e, usualmente, com exigências nutricionais mínimas (RIPPON, 1988). Das mais de 250.000 espécies de fungos conhecidas atualmente, apenas em torno de 200 estão comprovadamente associadas a infecções humanas, e em torno de 20 espécies podem ser responsabilizadas pelas micoses profundas ou sistêmicas (RICHARDSON & WARNOCK, 1993; RIPPON, 1988). Mesmo com o pequeno número de espécies envolvidas, a incidência de infecções fúngicas tem crescido, sobretudo na última década, como infecção hospitalar ou infectando indivíduos com o sistema imune comprometido (CASADEVALL *et al.*, 2002).

As infecções fúngicas podem ser classificadas de acordo com o sítio anatômico da infecção. As micoses superficiais são infecções localizadas nas camadas mais externas da pele, unhas, pêlos e membranas mucosas. As micoses subcutâneas envolvem a derme, tecidos subcutâneos e, eventualmente, os ossos. Essas infecções são usualmente adquiridas pela contaminação traumática, ou pela inalação de microrganismos saprófitos oriundos do solo ou de matéria orgânica em decomposição. As micoses sistêmicas são geralmente restritas aos pulmões, mas podem disseminar-se para quaisquer outros órgãos (RICHARDSON & WARNOCK, 1993).

A levedura *Cryptococcus neoformans* foi identificada como patógeno humano em 1894, sendo a primeira descrição atribuída a dois médicos alemães, Otto Busse e Abraham Buschke (Appud KNOKE & SCHWESINGER, 1994). Busse e Buschke descreveram o caso de uma mulher de 31 anos de idade com uma lesão na tíbia e isolaram o microrganismo que nomeava o agente etiológico como *Saccharomyces hominis* e a infecção sacaromicose hominis.

A importância clínica de *C. neoformans* aumentou dramaticamente como consequência do aumento da incidência da AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida), a partir de 1981. A associação entre a infecção com o vírus HIV (vírus da imunodeficiência humana) e o aumento na susceptibilidade à infecção criptocócica disseminada foi logo notada em pacientes com o sistema imune comprometido. Em torno de 5 a 10% de pacientes portadores de AIDS, são acometidos de criptococose (KOVACS *et al.*, 1985) representando a maioria dos casos relatados na literatura desde 1981. Atualmente, o diagnóstico de uma infecção disseminada por *C. neoformans* sugere uma avaliação da infecção pelo vírus HIV.

O termo criptococose é usado para referir a infecção causada pelo fungo leveduriforme encapsulado *C. neoformans*. Este microrganismo pode causar infecção em indivíduos hígidos, mas a grande proporção de humanos infectados ocorre em pacientes imunocomprometidos (RICHARDSON & WARNOCK, 1993). A infecção primária é pulmonar, podendo assumir as formas aguda, subaguda ou crônica, que apresenta uma tendência a disseminação para o sistema nervoso central, sítio pelo qual a levedura apresenta tropismo e onde acarreta quadros de meningite, encefalite ou meningoencefalite (KWON-CHUNG & BENNETT, 1992).

No início da década de 90, a criptococose foi epidêmica em algumas regiões e somente na cidade de Nova Iorque (EUA) ocorreram em torno de 1.200 casos de meningite criptocócica (CURRIE & CASADEVALL, 1994). Comparativamente, o número de casos de meningite por *Haemophilus influenzae*, meningococos e meningite viral foram de 54, 30 e 426, respectivamente.

No trato respiratório, as defesas importantes do hospedeiro são as membranas mucosas da nasofaringe, as quais retêm os esporos fúngicos inalados, e os macrófagos alveolares. Em geral, anticorpos IgG e IgM circulantes são produzidos em resposta à infecções fúngicas, mas seu papel na defesa do organismo é incerto. A resposta imune mediada por células é protetora e sua supressão pode levar à disseminação de infecções fúngicas assintomáticas, bem como a de doenças causadas por fungos oportunistas (LEVINSON & JAWETZ, 1996).

Clinicamente, *C. neoformans* se apresenta, quase sempre, na forma de levedura. Estas são encontradas no líquido, em secções de tecidos e no escarro. A levedura é a forma assexuada deste microrganismo e sua reprodução ocorre por brotamento. *C. neoformans* pode também se reproduzir sexualmente, sendo essa forma de reprodução observada “*in vitro*” e seu papel na patogênese ainda é incerto. Essa forma teleomórfica, ou estado perfeito, se caracteriza pela produção de basidiosporos, os quais ainda não foram descritos em associação com isolados clínicos. As hifas (ou pseudo-hifas) são produzidas por algumas linhagens e ocasionalmente podem ser observadas em secções de tecidos. Não existem descrições de formas fúngicas no ar, uma informação importante, uma vez que as formas ambientais de *C. neoformans* são responsáveis por casos de infecção em humanos e animais (CASADEVALL & PERFECT, 1998).

A natureza polissacarídica da cápsula, consistindo principalmente dos polissacarídeos glucuronoxilomanana, galactoxilomanana e manoproteína (FRIES *et al.*, 1999; KWON-CHUNG *et al.*, 1982), permite a divisão em cinco sorotipos, agrupados em duas variedades: *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipos A, AD e D) e *C. neoformans* var. *gatti* (sorotipos B e C) (SORREL *et al.*, 1996). Estudos recentes sugerem uma nova classificação: *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A) e *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D), ambos de distribuição mundial; *C. neoformans* var. *gatti* (sorotipos B e C), restritos a regiões de clima tropical e subtropical. Os representantes relativos aos sorotipos A e D geralmente encontram-se habitando solos e fezes de aves domésticas - pombos e

perus - sendo usualmente o agente causador da criptococose em pacientes imunocomprometidos; já a var. *gattii* tem sido associada a eucaliptos, infectando pacientes desprovidos de complicações imunológicas (FRANZOT *et al.*, 1999; STEENBERGEN & CASADEVALL, 2000).

As três variedades de *C. neoformans* descritas, *grubii*, *gattii* e *neoformans* são similares na fase anamórfica. Entretanto, diferenças fenotípicas são evidentes no estado teleomórfico, principalmente nas variedades *neoformans* e *gattii*: os basidiosporos da variedade *neoformans* são esféricos, elípticos, ou cilíndricos, com paredes rugosas, enquanto aqueles da variedade *gattii* são baciliformes com parede lisa (ELLIS & PFEIFFER, 1992; FRANZOT *et al.*, 1999; GARCIA-HERMOSO *et al.*, 1999; KWON-CHUNG, 1975; KWON-CHUNG, 1976; KWON-CHUNG *et al.*, 1982; STEENBERGEN & CASADEVALL, 2000).

A taxonomia de *C. neoformans* e a compreensão da sua filogenia receberam um grande impulso a partir da descoberta e relato da presença de grampos de conexão em alguns isolados (SHADOMY, 1970). Estes grampos de conexão servem para manter a condição dicariótica durante o crescimento na maioria das espécies dos *Basidiomycota* e são altamente distintivos deste filo. A partir da indução da formação de basídios e basidiosporos, foi nomeado o teleomórfico *Filobasidiella neoformans* correspondente ao anamórfico *C. neoformans* (KWON-CHUNG, 1975).

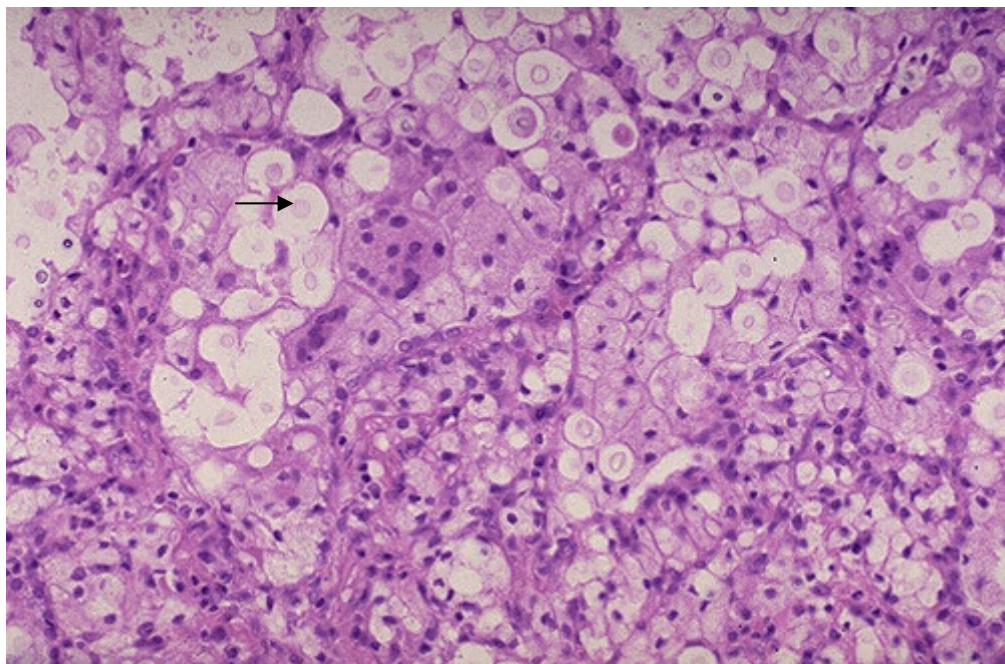
O exame de *C. neoformans* por microscopia óptica comum revela células de levedura de tamanho variável, com diâmetro médio de 4 a 6  $\mu\text{m}$ , usualmente ovais ou redondas, com um duplo contorno que as tornam altamente refráteis e que se reproduzem por brotamento. A cápsula de *C. neoformans* normalmente não é visível por microscopia óptica em suspensões aquosas. O método mais comum para sua visualização é o exame de suspensões diluídas em tinta da Índia, onde as partículas da tinta são excluídas pela cápsula, a qual aparece como uma zona clara ao redor da célula da levedura (ZERPA *et al.*, 1996). A cápsula também pode ser visualizada pela adição de anticorpos específicos contra os polissacarídeos capsulares (CLEARE *et al.*, 1994; PIDCOE & KAUFMANN, 1968) ou por microscopia eletrônica (SAKAGUCHI, 1993). As três técnicas de coloração mais utilizadas para evidenciação destas leveduras são: (i) coloração com Hematoxilina e Eosina (Figura 1), (ii) impregnação com sais de prata (Figura 2) e, (iii) preparação com tinta da Índia (Figura 3) (ABERG & POWDERLY, 1998).

A presença de cápsula polissacarídica é uma característica distintiva em relação a outras leveduras de importância médica. O polissacarídeo capsular atua como um fator de virulência de uma maneira análoga aquelas de bactérias encapsuladas, tais como *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Neisseria meningitidis* (PIROFSKI & CASADEVALL, 1996).

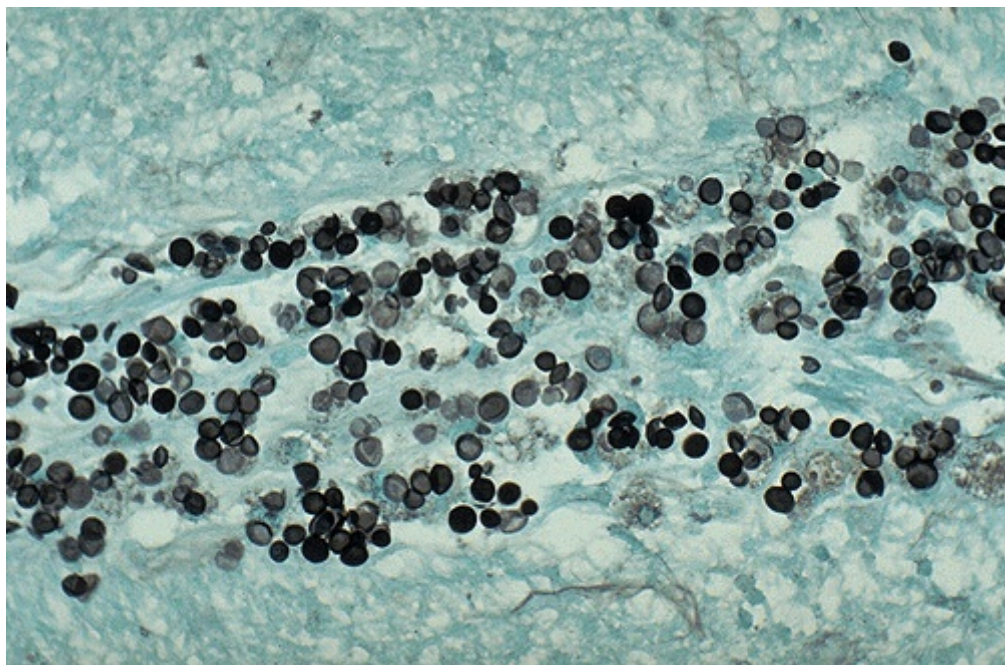
Entre outros fatores, associados com a virulência de *C. neoformans*, podem ser citados a presença da enzima fenoloxidase que sintetiza melanina e outros pigmentos a partir de uma variedade de precursores fenólicos e da enzima urease, responsável pela hidrólise da uréia, somados a capacidade de crescimento a 37°C (CASADEVALL, 1994; COX *et al.*, 2000).

*C. neoformans* se desenvolve bem na maioria dos meios de cultura para fungos sendo, provavelmente, um autótrofo para a maioria dos aminoácidos, açúcares, lipídios e vitaminas, podendo também se desenvolver em meio mínimo quimicamente definido (VIDOTTO *et al.*, 1996). Os requerimentos nutricionais para seu crescimento são simples, incluindo uma fonte de carbono e de nitrogênio, oxigênio e elementos traços. Nem todos os aminoácidos podem servir como fonte de carbono, mas *C. neoformans* pode sintetizar todos os aminoácidos necessários a partir de amônia (Appud LITTMAN, 1958).

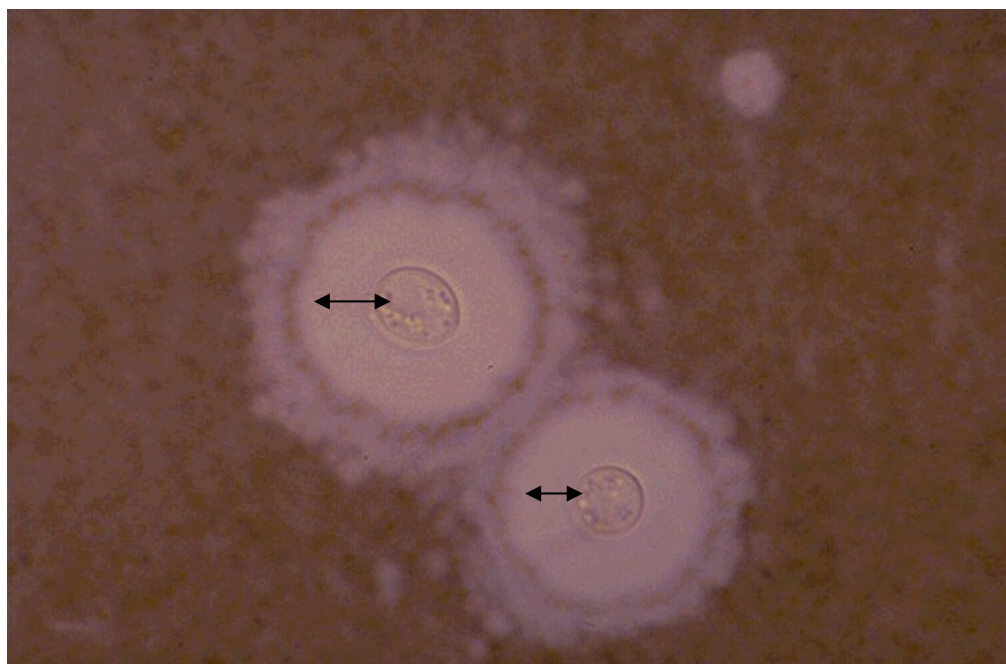




**Figura 1:** Evidenciação da cápsula de *C. neoformans*. Secção de tecido pulmonar corado com Hematoxilina e Eosina. A seta indica uma levedura circundada pela cápsula polissacarídica (<http://www.hivinsite.ucsf.edu>).



**Figura 2:** Coloração com prata de *C. neoformans* presente no líquido céfalo-raquidiano (LCR) em paciente com AIDS (<http://www.hivinsite.ucsf.edu>).



**Figura 3:** Preparação de *C. neoformans* em tinta da Índia. LCR de paciente com meningite criptocócica. A seta mostra a zona clara da cápsula ao redor da levedura (<http://www.hivinsite.ucsf.edu>).

Membros do gênero *Cryptococcus* geralmente são considerados como leveduras não fermentadoras, que assimilam inositol e produzem urease. Além da espécie patogênica *C. neoformans*, pelo menos 38 outras espécies de *Cryptococcus* tem sido encontradas em uma grande variedade de ambientes (BARNETT *et al.*, 1990). Espécies de *Cryptococcus* têm sido encontradas no extremo frio da Antártica, em elevações como no Himalaia, e em águas salinas. Apesar da habilidade de adaptação climática, a maioria das espécies não sobrevive em tecidos de mamíferos devido à alta temperatura corporal e ao sistema de defesa imune do hospedeiro. Existem raros relatos de *Cryptococcus* não *neoformans* tais como *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus curvatus*, e *Cryptococcus albidus* causando infecções em humanos, embora não existam provas histológicas (CUNA & LUSINS, 1973; CURTIS *et al.*, 1995; DROMER *et al.*, 1995; GLUCK *et al.*, 1987; GORDON, 1972; KRUMHOLZ, 1972). Apesar dos humanos estarem expostos a estas espécies, as quais são encontradas em vários ambientes, somente *C. neoformans* pode ser considerado a espécie que consistentemente causa criptocose.

As linhagens de *C. neoformans* são divididas em três variedades com base em critérios fenotípicos, sorológicos, bioquímicos e epidemiológicos. Todas as variedades são

patogênicas para o homem. A variedade *neoformans* apresenta distribuição mundial e é a variedade invariavelmente isolada de excretas de aves, representando a grande maioria dos isolados de pacientes com AIDS. A variedade *gattii*, encontrada em regiões de clima tropical e subtropical (KWON-CHUNG & BENNETT, 1984), associada com árvores de eucaliptos, raramente causa infecção disseminada em pacientes com AIDS, mesmo em áreas endêmicas (ROZENBAUM *et al.*, 1992; SPEED & DUNT, 1995; SPEED *et al.*, 1993). Estudos recentes sugerem uma nova nomenclatura em substituição a *C. neoformans* var. *gattii* sorotipos C e D, *Cryptococcus gattii* (KWON-CHUNG *et al.*, 2002; SORREL, 2001).

Diferenças na apresentação clínica de criptococose causada por linhagens da var. *neoformans* e var. *gattii* têm sido descritas (FISHER *et al.*, 1993; SPEED & DUNT, 1995). Em um estudo realizado na Austrália, foi observada uma alta mortalidade em infecções causadas pela var. *neoformans*. Por outro lado, infecções causadas pela var. *gattii* apresentaram baixa mortalidade mas estas foram usualmente complicadas por sequelas neurológicas (SPEED & DUNT, 1995). A necessidade de cirurgia e de tratamento prolongado em pacientes infectados com a var. *gattii* foi também relatada (FISHER *et al.*, 1993).

Existem ainda diferenças sorológicas e bioquímicas entre as variedades *neoformans* e *gattii*. As variedades são subdivididas em 5 sorotipos, *C. neoformans* var. *neoformans* sorotipos A, D e AD e *C. neoformans* var. *gattii* sorotipos B e C, conforme apresentado na Tabela 1 (CHERNIAK & SUNDSTROM, 1994). As duas variedades diferem na sua habilidade em assimilar os ácidos L-málico, fumárico e succínico (BENNETT *et al.*, 1978) e no metabolismo de creatinina (KWON-CHUNG, 1991; POLACHECK & KWON-CHUNG, 1980). As duas variedades assimilam creatinina, mas o EDTA inibe a enzima urease em *C. neoformans* var. *gattii* mas não em *C. neoformans* var. *neoformans* (KWON-CHUNG *et al.*, 1987). Linhagens das duas variedades também manifestam diferenças na susceptibilidade aos antifúngicos. Em geral, as linhagens da var. *gattii* são menos susceptíveis à flucitosina do que as linhagens da var. *neoformans* (SHADOMY *et al.*, 1987).

Análises filogenéticas construídas com base no seqüenciamento de diversos genes de *C. neoformans* verificaram que *C. neoformans* var. *neoformans* e *C. neoformans* var.

*gattii* estavam em *clusters* monofiléticos separados, sustentando a separação em duas espécies proposta por KWON-CHUNG *et al.* (2002).

Dois testes de coloração em ágar distinguem as duas variedades de *C. neoformans* com base em diferenças bioquímicas (IROKANULO *et al.*, 1994; KWON-CHUNG *et al.*, 1982; SALKIN & HURD, 1982). As variedades são distinguidas pelo crescimento diferencial em meios de cultivo sólidos específicos, incluindo o ágar canavanina-glicina-azul de bromotimol e creatinina-dextrose-azul de bromotimol-timina. As amostras pertencentes à variedade *gattii*, em sua maioria, são capazes de se desenvolverem nos meios citados, produzindo fortes reações de cor nos mesmos. Ao contrário, a variedade *neoformans* quando se desenvolve nestes meios não ocasiona alteração de coloração. Muitas linhagens de *C. neoformans* var. *neoformans* são susceptíveis à L-canavanina e a maioria não pode assimilar a glicina como única fonte de nitrogênio e carbono (MINN & KWON-CHUNG, 1986).

**Tabela 1:** Variedades e sorotipos da espécie *C. neoformans*

Variedades	Sorotipos	Referências
<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	A	FRANZOT <i>et al.</i> , 1999.
<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	D	KWON-CHUNG <i>et al.</i> , 1982; ELLIS & PTEIFFER, 1990.
<i>C. neoformans</i> var. <i>gattii</i>	B e C	KWON-CHUNG <i>et al.</i> 1982; ELLIS & PTEIFFER, 1990. KWON-CHUNG & BENNET, 1984,
Híbrido diplóide dos sorotipos A e D	AD	LENGELER <i>et al.</i> , 2000; XU & MITCHEL, 2003; MARRA <i>et al.</i> , 2004.

## 1.2 Epidemiologia

Atualmente, a grande maioria dos casos de criptococose sintomática ocorre em pacientes imunocomprometidos. Isto representa uma mudança na epidemiologia de infecções criptocócicas desde 1950, quando os casos eram descritos em indivíduos aparentemente saudáveis. A prevalência da infecção por *C. neoformans* em uma determinada população parece ser função do número de indivíduos imunocomprometidos e sua exposição à levedura (BARRETO de OLIVEIRA et al., 2004; CASADEVALL & PERFECT, 1998; CHEN et al., 2000; DROMER et al., 2004).

*C. neoformans* é um fungo cosmopolita e casos de criptococose têm sido relatados em todas as regiões do mundo. O fungo é um organismo de vida livre que pode sobreviver em uma variedade de nichos ambientais e não parece ser um comensal humano. A transmissão da criptococose entre humanos é raramente documentada (BEYT & WALTMANN, 1978; GLASER & GARDEN, 1985) e a presença comum de *C. neoformans* no ambiente, indica que a infecção humana é provavelmente adquirida de fontes ambientais. A distribuição geográfica da criptococose é mundial (CASADEVALL, 1994). Estudos epidemiológicos em pacientes com AIDS na Tailândia revelam um predomínio do sorotipo A (POONWAN et al., 1997). O isolamento de linhagens do sorotipo D de pacientes portadores de AIDS também tem sido relatado na França, Alemanha e Estados Unidos (DROMER et al., 1994; DROMER et al., 2004). A infecção humana com *C. neoformans* var. *neoformans* é mais prevalente na Europa e América do Norte (CHATURVEDI et al., 2005; DROMER et al., 1994; DROMER et al., 2004, HOANG et al., 2004). Entretanto, a var. *neoformans* é predominante em pacientes portadores de AIDS (LEVITZ, 1991). Considerando as infecções oportunistas que acometem pacientes portadores de AIDS, a criptococose é a quarta causa mais freqüente de infecção (CURRIE et al., 1994). O recente aumento no número de pacientes portadores de AIDS no Brasil tem também indicado um aumento do número de infecções causadas por este fungo patogênico (FRANZOT et al., 1997; NISHIKAWA et al., 2002). De acordo com dados do Ministério da Saúde - Coordenação Nacional de DST/AIDS, 4,0% das infecções oportunistas associadas à pacientes com HIV foram causadas por *C. neoformans* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002). Têm sido relatadas infecções em humanos pelas espécies *Cryptococcus albidus* e *Cryptococcus laurentii*, mas o significado destes isolados é duvidoso (LYNCH et al., 1981).



A maioria dos isolados clínicos de *C. neoformans* var. *gattii* é originária de regiões tropicais e subtropicais (KWON-CHUNG & BENNETT, 1984). Em algumas partes do mundo, *C. neoformans* var. *gattii* é a variedade predominante em isolados clínicos. Nos Estados Unidos a maioria dos isolados da var. *gattii* tem origem no sul da Califórnia (BENNETT *et al.*, 1977; CHATURVEDI *et al.*, 2005; HAJJEH *et al.*, 1996; KWON-CHUNG & BENNETT, 1984). Em Papua, Nova Guiné, cinco de seis casos de criptococose foram causados pela var. *gattii* (CURRIE *et al.*, 1990). Na Austrália, 50% dos casos de criptococose foram devidos a var. *gattii* (ELLIS, 1987). Na maioria dos estudos, linhagens de *C. neoformans* var. *neoformans* são significativamente mais comuns do que linhagens de *C. neoformans* var. *gattii* (CHEN *et al.*, 2000; KWON-CHUNG & BENNETT, 1984; MISHRA *et al.*, 1981; RINALDI *et al.*, 1986; ROZENBAUM *et al.*, 1992). Entretanto, para a interpretação de dados relativos à prevalência entre as variedades, é importante considerar que *C. neoformans* var. *neoformans* tende a infectar pacientes portadores de AIDS (BOTTONNE *et al.*, 1987; RINALDI *et al.*, 1986; SHIMIZU *et al.*, 1986; SPEED *et al.*, 1993; STEENBERGEN & CASADEVALL, 2000). O alto percentual de pacientes portadores de AIDS nestes estudos contribui para a predominância da variedade *neoformans* na literatura recente. No Zaire, antes de 1970, quase a totalidade dos isolados de *C. neoformans* pertenciam a var. *gattii*, mas somente a var. *neoformans* tem sido isolada em amostras clínicas após 1970 (SWINNE, 1983; SWINNE *et al.*, 1986). A causa para a mudança no tipo de variedade não é conhecida (SWINNE *et al.*, 1986), mas pode refletir um incremento na prevalência de casos de criptococose associada a pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV).

Em recente estudo no Canadá, na cidade de Vancouver, o isolamento de *C. gattii* ocasionando um surto de criptococose também pode refletir mudanças na distribuição da prevalência das espécies causadoras da infecção, mudando o perfil usualmente conhecido da var. *gattii* reconhecidamente causando infecções em regiões de clima tropical e subtropical (KIDD *et al.*, 2004).

Raros casos de infecção por *C. neoformans* var. *gattii* têm sido relatados em áreas temperadas (BOTTONNE *et al.*, 1986; DROMER *et al.*, 1996; DROMER *et al.*, 1992; FROMTLING *et al.*, 1982; KOHL *et al.*, 1985; LEHMANN *et al.*, 1984; St-GERMAIN *et al.*, 1988). A fonte e a rota de infecção para casos ocasionais de criptococose, devidos a *C.*

*neoformans* var. *gattii*, em áreas temperadas é desconhecida. Alguns destes casos podem representar a reativação de infecções latentes adquiridas em áreas tropicais ou subtropicais (BOTTONNE *et al.*, 1986; DROMER *et al.*, 1992; GARCIA-HERMOSO *et al.*, 1999; LEHMANN *et al.*, 1984; St-GERMAIN *et al.*, 1988). Entretanto, alguns casos podem refletir fontes ambientais não localizadas em áreas temperadas.

O conhecimento da ecologia de *C. neoformans* var. *gattii* foi impulsionada pela associação dessa variedade com árvores de *Eucalyptus camaldulensis*. Um estudo extenso em Barossa Valley, Austrália, revelou uma associação específica entre a descoberta de *C. neoformans* var. *gattii* de material associado com árvores de *E. camaldulensis* (ELLIS & PFEIFFER, 1990). Esta variedade também foi encontrada em árvores de *E. camaldulensis* em São Francisco, Estados Unidos (PFEIFFER & ELLIS, 1991). Estudos subseqüentes têm documentado a associação de linhagens de *C. neoformans* var. *gattii* com árvores de *E. tereticornis*, as quais possuem uma estreita relação com *E. camaldulensis* (PFEIFFER & ELLIS, 1992). Linhagens da variedade *gattii* também foram isoladas na cidade do México (LICEA *et al.*, 1996). Isolados ambientais de *C. neoformans* var. *gattii* têm sido classificados exclusivamente como sorotipo B (KWON-CHUNG *et al.*, 1992). O sorotipo C não tem sido encontrado no ambiente.

*C. neoformans* var. *gattii* foi isolado do ambiente na Austrália (ELLIS & PFEIFFER, 1990; PFEIFFER & ELLIS, 1992; SORREL *et al.*, 1996), Brasil (LAZERA *et al.*, 1993), Espanha (BARÓ *et al.*, 1998; BARÓ *et al.*, 1999), Itália (GRISEO & GALLO, 1997; MONTAGNA *et al.*, 1997), México (LICEA *et al.*, 1996), Uruguai (GEZUELE *et al.*, 1993) e Califórnia (PFEIFFER & ELLIS, 1991). As únicas fontes ambientais consistentes de *C. neoformans* var. *gattii* tem sido *E. camaldulensis* (ELLIS & PFEIFFER, 1990; PFEIFFER & ELLIS, 1992) e *E. tereticornis* (LICEA *et al.*, 1996). Entretanto, é possível que existam outras fontes ambientais de *C. neoformans* var. *gattii*. Existe um relato de isolamento de *C. neoformans* var. *gattii* em uma velha casa no Brasil, habitada por morcegos (LAZERA *et al.*, 1993). O significado deste isolamento é incerto, uma vez que o sítio continha uma variedade de outros animais e materiais vegetais (LAZERA *et al.*, 1993). No Uruguai, foi feito o isolamento de *C. neoformans* var. *gattii* de um ninho de vespas *Polybia occidentalis* (GEZUELE *et al.*, 1993).

Em diferentes estudos realizados no estado do Rio Grande do Sul com a utilização de amostras ambientais, não foi obtido nenhum isolamento de *C. neoformans* var. *gattii* de nove isolados provenientes de amostras de eucaliptos (CASALI *et al.*, 2003). Em outro estudo do mesmo grupo utilizando excretas de aves, entre 33 amostras ambientais, 5 isolados obtidos foram identificadas como pertencentes a espécie *gattii* (ABBEG, 2003; ABEGG *et al.*, 2006).

A associação entre *C. neoformans* var. *gattii* e *E. camaldulensis* provê uma explicação plausível para a epidemiologia de infecções de *C. neoformans* var. *gattii*: a distribuição de isolados clínicos da var. *gattii* próxima de regiões geográficas com árvores de *E. camaldulensis* no mundo (ELLIS & PFEIFFER, 1990; ELLIS & PFEIFFER, 1992; PFEIFFER & ELLIS, 1991; PFEIFFER & ELLIS, 1992). Além do mais, a associação de *C. neoformans* var. *gattii* com *E. camaldulensis* pode explicar a alta prevalência de infecções com a var. *gattii* entre aborígenes australianos que vivem em áreas rurais onde estas árvores são comuns (ENG *et al.*, 1986).

*C. neoformans* var. *neoformans* é encontrado em zonas de clima temperado e tropical, sendo isolado invariavelmente de solos e excretas de aves (LEVITZ, 1991). O isolamento de *C. neoformans* var. *neoformans* de sítios ambientais tem sido relatado na África (REFAL *et al.*, 1983), Ásia (ANSHENG *et al.*, 1993; GUGNAMI *et al.*, 1972; HSU *et al.*, 1994; INWIDTHAYA, 1994; INWIDTHAYA *et al.*, 1989; OSTROWSKI *et al.*, 1993; PADHYE *et al.*, 1993), Europa (GRISEO *et al.*, 1995; MISHRA *et al.*, 1981), América do Norte (ABOU-GABAL & ATIA, 1978; KOZEL & HERNERATH, 1984; POWELL *et al.*, 1972), América do Sul (RUIZ *et al.*, 1989), Caribe (RUIZ *et al.*, 1989) e Ilhas do Pacífico. Infecções clínicas com *C. neoformans* var. *neoformans* também têm sido relatadas em todos os países de todos os continentes. Nos continentes existem locais com altas concentrações de *C. neoformans*, resultando em uma alta prevalência local de criptococose. Por exemplo, nos Estados Unidos acredita-se que a criptococose é mais comum nos estados do sudeste que em estados montanhosos.

O primeiro relato de isolamento ambiental de *C. neoformans* foi em 1894, o fungo foi encontrado em suco de pêssego. O pêssego e seu suco constituem um bom meio para o crescimento de *C. neoformans* (STAIB *et al.*, 1973). Interessantemente, nenhum isolamento ambiental adicional foi relatado até 1951, quando foi descrito o isolamento de



*C. neoformans* em solo contaminado com excreta de aves (Apud EMMONS, 1951), particularmente excretas de pombos (*Columbia livia*). Desde então, dezenas de relatos têm aparecido descrevendo o isolamento de *C. neoformans* var. *neoformans* de excretas de aves, solos, água, frutas e leite (LOPEZ-MARTINEZ & CASTANON-OLIVARES, 1995; SWINNE-DESGAIN, 1974).

Existem diversos relatos de isolamento de *C. neoformans* var. *neoformans* de árvores e materiais de plantas. *C. neoformans* tem sido isolado de madeira em decomposição, formando ocos em árvores no Brasil (NISHIKAWA *et al.*, 2002; LAZERA *et al.*, 1996). *C. neoformans* tem a enzima lacase (WILLIAMSON, 1994) e a atividade de fenoloxidase em fungos tem sido associada com a habilidade para degradar a lignina da madeira (EGGERT *et al.*, 1996; LAZERA *et al.*, 1996). Embora a var. *gattii* seja classicamente associada com árvores de eucalipto, a var. *neoformans* também tem sido ocasionalmente isolada de árvores de eucalipto (DUARTE *et al.*, 1994). Os relatos de isolamento de *C. neoformans* de florestas (LAZERA *et al.*, 1993; LAZERA *et al.*, 1996) podem refletir a habilidade desse fungo em usar madeira em decomposição como um habitat.

Os relatos relacionando a var. *neoformans* com árvores, juntamente com a associação estabelecida de linhagens da var. *gattii* com árvores de eucalipto e a estreita relação genética entre as variedades, sugere que *C. neoformans* var. *neoformans* pode também ter um nicho arbóreo que permanece por ser descoberto (ELLIS & PFEIFFER, 1990). Avaliando-se os relatos de isolamento de *C. neoformans* var. *neoformans* de árvores, precisa-se considerar que os pássaros são comuns em árvores, e que a possibilidade de contaminação com excretas de aves pode ser uma variável que causa confusão. *C. neoformans* var. *neoformans* pode ocasionalmente ser isolada de árvores. Entretanto, não existe uma firme conexão entre a var. *neoformans* e qualquer árvore ou espécie de planta até este momento. Em recente estudo realizado por RIBEIRO *et al.* no Rio Grande do Sul foi relatado o isolamento de *C. neoformans* sorotipo D em amostras de eucalipto (RIBEIRO *et al.*, 2006). Sendo necessárias mais pesquisas em diferentes nichos arbóreos para esclarecer a relação de *C. neoformans* var. *neoformans* com fontes arbóreas.

O solo é freqüentemente relatado como um sítio ecológico para *C. neoformans*. Em amostras de solo onde é relatada a presença de *C. neoformans*, são sítios freqüentados por

pássaros ou amostras de solos originários de aviários ou sítios potencialmente contaminados com excretas de aves. Tem sido sugerido que o solo é uma fonte de contaminação para excreta de aves, porque ele provê um rico meio para o crescimento (ABOU-GABAL & ATIA, 1978). Entretanto, não está claro se *C. neoformans* em excretas de aves se originam do solo ou se *C. neoformans* no solo reflete contaminação com excreta de aves. A relação ecológica de colonização de *C. neoformans* para mamíferos como morcegos e camundongos é incerta e tem recebido pouca atenção.

Um estudo epidemiológico no Burundi relatou o isolamento de *C. neoformans* de poeira doméstica em 54% de casas recentemente ocupadas de pacientes com criptococose relacionadas com HIV e 20% de casas selecionadas aleatoriamente (SWINNE *et al.*, 1991). Resultados similares foram relatados do Zaire, onde foram isolados *C. neoformans* da poeira e do ar de casas de pacientes com criptococose relacionadas ao HIV (SWINNE *et al.*, 1986).

A associação de *C. neoformans* com excreta de aves, particularmente pombos, tem sido conhecida desde 1950 e tem sido confirmada repetidamente por numerosos investigadores (ANSHENG *et al.*, 1993; CASTANON-OLIVARES & LOPEZ-MARTINEZ, 1994; CURRIE *et al.*, 1994). A variedade de *C. neoformans* encontrada em excretas de pombos é invariavelmente *C. neoformans* var. *neoformans*, sendo virulenta para camundongos (CHEN *et al.*, 1996; CURRIE *et al.*, 1994, FRIEDMAN *et al.*, 2005).

*C. neoformans* pode crescer em densidades de 3 a  $6 \times 10^6$  de organismos por ml de excretas de pombo úmidas ou dessecadas. As excretas de pombos permitem a sobrevivência de *C. neoformans* por um longo tempo e os cultivos podem permanecer viáveis até dois anos quando mantidos em excretas de pombo dessecadas. Linhagens de *C. neoformans* quando crescem em excretas de pombos geralmente possuem pequena cápsula, com um diâmetro de 1,0 a 5,5  $\mu\text{m}$ , compatível com deposição alveolar (POWELL *et al.*, 1972).

Excretas de pombos são a fonte saprofítica mais comumente associada com *C. neoformans*, mas o fungo também tem sido isolado de uma variedade de outras excretas de aves, incluindo canários (GRISEO *et al.*, 1995), papagaios (BAWENS *et al.*, 1986; LOPEZ-MARTINEZ & CASTANON-OLIVARES, 1995; STAIB & SCHULZ-DIETERICH, 1984), galinhas (SWINNE *et al.*, 1986) e outras espécies (ABEGG *et al.*,

2006; GUSTIN & KELLEY, 1971; OSTROWSKI *et al.*, 1993; STAIB & HAISENHUBER, 1989; STAIB & SCHULZ-DIETERICH, 1984).

O fato de *C. neoformans* ser altamente prevalente em excrementos de pombos é provavelmente o resultado de uma notável adaptação bioquímica que permite sua sobrevivência e crescimento neste nicho ecológico. Existem relatos evidenciando que a associação entre *C. neoformans* e excretas de pombos pode ser devida à habilidade única de *C. neoformans* em assimilar creatinina como fonte de nitrogênio (STAIB *et al.*, 1976). Excretas de pombos também contêm ácido úrico e purinas, as quais *C. neoformans* também pode assimilar (KELLEY & O'CONNELL, 1993; STAIB *et al.*, 1976). A assimilação de creatinina é uma característica que não é comum para a maioria das leveduras (KELLEY & O'CONNELL, 1993; KWON-CHUNG, 1991; STAIB *et al.*, 1976). Assim, excretas de pombos podem servir como um meio seletivo para *C. neoformans* por causa da sua alta concentração de creatinina (KWON-CHUNG, 1991). A enzima responsável pelo metabolismo de creatinina é a deiminase que catalisa a conversão em metil-hidantoína e amônia (KWON-CHUNG, 1991; POLACHEK & KWON-CHUNG, 1980).

É interessante que *C. neoformans* var. *gatti* não é associada com excretas de aves, apesar de também ser capaz de assimilar creatinina (KWON-CHUNG, 1991; POLACHEK & KWON-CHUNG, 1980). Creatinina deiminase é encontrada em ambas as variedades de *C. neoformans* (KWON-CHUNG, 1991; POLACHEK & KWON-CHUNG, 1980). Entretanto, a inabilidade de *C. neoformans* var. *gattii* se desenvolver em excretas de aves pode refletir diferenças na regulação desta enzima (KWON-CHUNG, 1991; POLACHEK & KWON-CHUNG, 1980). A deiminase responsável pela degradação de creatinina na var. *neoformans* é reprimida por amônia, enquanto que na var. *gattii* não ocorre esta repressão (KWON-CHUNG, 1991; POLACHEK & KWON-CHUNG, 1980). A regulação da deiminase por amônia na var. *neoformans* tem sido proposta como auxiliar na conservação de energia e substâncias metabólicas necessárias para sobrevivência da levedura em excretas de aves (KWON-CHUNG, 1991; POLACHEK & KWON-CHUNG, 1980).

A sobrevivência de *C. neoformans* em excretas de aves, solos contaminados por excretas de aves e outras fontes saprofíticas pode ser influenciada por diversos fatores, incluindo o pH, a umidade, a temperatura, a luz solar e outros fatores bióticos

(HUBALEK, 1975). *C. neoformans* pode sobreviver em excretas de pombos por até dois anos. O aumento na umidade pode favorecer a sobrevivência e proliferação de fungos no solo em baixas temperaturas (4 a 26<sup>0</sup>C), mas não a 37<sup>0</sup>C. A luz solar direta pode reduzir significativamente a sobrevivência de *C. neoformans* no solo e pode contribuir para o fato que sítios ao ar livre sejam menos pesadamente contaminados que excretas de pombos em interiores (HUBALEK, 1975). O isolamento da levedura *C. neoformans* em sítios ambientais protegidos é mais comum de resultarem em culturas positivas do que locais expostos à luz solar.

Embora a levedura seja encontrada nas excretas de pombo, o pombo devido à sua alta temperatura corporal não é infectado. A associação entre *C. neoformans* e excretas de pombo têm sido confirmada em diversos estudos (CURRIE *et al.*, 1994; KWON-CHUNG & BENNET, 1992; RUIZ *et al.*, 1981). Entretanto, somente poucos casos relatados de criptococose podem ser relacionados à exposição direta com fezes de pombo, tais como ocorridas com criadores de pombos (FESSEL, 1993).

Devido à alta concentração de *C. neoformans* em excreta de pombos, a alta prevalência de pombos em muitas áreas urbanas, e o risco de infecção criptocócica em humanos, existe um considerável interesse na relação entre os pássaros, suas excretas, e a criptococose humana (POWELL *et al.*, 1972). *C. neoformans* tem sido isolado de poeira em ar condicionado contaminado com excretas de aves, confirmando que a ventilação mecânica pode auxiliar a disseminar *C. neoformans* se as entradas de ar estão contaminadas (FRANCISCO *et al.*, 1977). MUCHMORE *et al.*, relataram três casos de meningite criptocócica em um ano em uma pequena comunidade em Oklahoma. Análises de excrementos de pássaros revelaram *C. neoformans* no ambiente próximo de cada paciente, confirmando a especulação que a infecção ocorreu pela exposição à excrementos de pássaros contaminados.

Em indivíduos hígidos a forma pulmonar de criptococose é a usual. Em pacientes imunocomprometidos, a infecção pulmonar tende a disseminação ao cérebro e meninges, sendo usualmente fatal (DROMER *et al.*, 1994; DROMER *et al.*, 2004; MITCHELL & PERFECT, 1995). Existem evidências de que infecção subclínica possa ocorrer após exposição a pombos e suas excretas, originadas a partir de estudos sorológicos com alimentadores de pássaros. Pela técnica de fixação de complemento, foi demonstrado que

22% de indivíduos com contato com pombos apresentavam anticorpos contra *C. neoformans*, comparado com um grupo controle onde somente 3% apresentaram tais anticorpos. Também reações intradérmicas com preparações de antígenos criptocócios apresentam uma prevalência de 32% entre indivíduos que alimentam pombos comparados a taxa de 4% em grupo controle (MITCHELL & PERFECT, 1995).

As evidências sugerindo as excretas de pombos como fonte de infecção humana são confirmadas pela identificação de mesmas linhagens em excretas de pombos e isolados em amostras clínicas através de métodos de tipagem de DNA em estudos independentes (CURRIE *et al.*, 1994; FRANZOT *et al.*, 1997; YAMAMOTO *et al.*, 1995). A descoberta de partículas infecciosas de *C. neoformans* de excretas de pombos com um tamanho compatível com deposição alveolar (POWELL *et al.*, 1972), a recuperação de *C. neoformans* do ar sobre sítios contaminados com excretas de aves (SWINNE-DESGAIN, 1975), a virulência das linhagens isoladas, e a alta prevalência de anticorpos em inquéritos sorológicos e testes intradérmicos em criadores de pombos, também trazem subsídios para sugerir que a origem ambiental da infecção seja proveniente destas fontes ambientais (HAYNES *et al.*, 1995; MEYER *et al.*, 1999; PFALLER, 1995; PFALLER & WENZEL, 1992).

Entretanto, existem muitas questões não respondidas a respeito da ecologia de *C. neoformans* e da patogênese da infecção humana que podem definitivamente associar entre linhagens em excretas de pombos e aquelas que causam infecção em humanos. Um exemplo desta dificuldade é a incerteza de que uma infecção seja resultante de uma exposição aguda ou reativação de uma infecção latente, sendo difícil fazer a ligação entre casos de infecção e fontes pontuais no ambiente (GARCIA-HERMOSO *et al.*, 1999). É possível que linhagens de *C. neoformans* var. *neoformans* em excretas de pombos se originem de uma terceira, ainda não descoberta, fonte ambiental (ELLIS & PFEIFFER, 1990; SULLIVAN *et al.*, 1996; VIVIANI *et al.*, 1997).

### **1.2.1 Isolamento de *C. neoformans* do ambiente**

Muitos dos estudos iniciais para o isolamento a partir de fontes saprofíticas de *C. neoformans* contavam com a inoculação da amostra em questão em camundongos, pois os

camundongos são altamente susceptíveis a *C. neoformans*, mas resistentes a outras leveduras. Estudos posteriores da prevalência de *C. neoformans* no ambiente têm utilizado meios seletivos, por razões óbvias de custo e facilidade de estudo (CURRIE *et al.*, 1994).

Meios de cultivo seletivos são necessários para o isolamento de *C. neoformans* de fontes ambientais, e diversos destes meios têm sido descritos (CURRIE *et al.*, 1994; RANDHAWA *et al.*, 1973; STAIB *et al.*, 1987). O meio utilizado deve atender três objetivos: (i) inibir bactérias, (ii) inibir o crescimento de fungos filamentosos, (iii) permitir a identificação visual de colônias de *C. neoformans*. Em geral, devido ao lento crescimento de *C. neoformans* em relação a outros fungos, é importante usar meios seletivos que permitam o crescimento de *C. neoformans* enquanto simultaneamente inibam outros microrganismos. Bactérias podem ser inibidas pela adição de antibióticos e com a utilização de pH do meio em uma faixa ácida (pH 4.0 a 5.0). A maioria dos fungos filamentosos pode ser inibida pela adição de bifenil ao ágar (SHIELDS & AJELLO, 1966) e incubação das placas em temperatura de 37°C, uma temperatura que não é permissiva para a maioria dos fungos filamentosos não patogênicos. A identificação visual de colônias de *C. neoformans* pode ser facilitada pela adição de substratos apropriados para a produção de melanina. Um meio largamente utilizado é o ágar creatinina *Guizotia abyssinica* (semente de níger) suplementado com bifenil 0,1% (STAIB, 1985).

Fatores bióticos que influenciam a sobrevivência de *C. neoformans* no ambiente incluem bactérias, amebas e ácaros (RUIZ *et al.*, 1982). *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis* isolados de excretas de pombos podem inibir *C. neoformans* (RUIZ *et al.*, 1982; TEOH-CHAN *et al.*, 1975). Tem sido mostrado que amebas (*Acanthamoeba palestinensis*) isoladas de excreta de pombos fagocitam *C. neoformans* e inibem seu crescimento “*in vitro*” (RUIZ *et al.*, 1982). Interessantemente, as pseudohifas de *C. neoformans* parecem ser mais resistentes a fagocitose por amebas, sugerindo que estas formas fúngicas podem persistir em sítios habitados por amebas (NEILSON *et al.*, 1978). Outros fungos podem inibir o crescimento de *C. neoformans* pela produção de toxinas (BOEKHOUT & SCORZETTI, 1997).

### 1.3 Manifestações Clínicas

As micoses sistêmicas geralmente são infecções crônicas devido ao lento crescimento dos fungos, freqüentemente difíceis de serem diagnosticadas e tratadas, sendo as drogas antifúngicas atualmente utilizadas pouco efetivas em indivíduos com comprometimento do sistema imune. Usualmente causadas por fungos que habitam o solo, a inalação de esporos é a rota principal da infecção que se inicia tipicamente nos pulmões e dissemina-se para outros tecidos do corpo (HULL & HEITMAN, 2002).

A manifestação clínica da criptococose em pacientes infectados com o HIV pode variar significativamente em relação aos indivíduos imunocompetentes ou em pacientes imunocomprometidos devido à outra doença subjacente. Embora a infecção criptocócica pulmonar seja diagnosticada menos freqüentemente que a meningite em pacientes com AIDS, o pulmão é o sítio primário da infecção (CAMERON *et al.*, 1991; DROMER *et al.*, 1994; DROMER *et al.*, 2004; KIERTIBURANAKUL *et al.*, 2006).

A pneumonia causada por *C. neoformans* pode ser assintomática ou sintomática, com ou sem evidências de disseminação. Não está claro se a doença disseminada representa uma progressão ou reativação da doença pulmonar, porque muitos pacientes não têm evidências de envolvimento pulmonar no momento do diagnóstico de doença disseminada. Devido aos sinais e sintomas relativamente inespecíficos, resultados radiológicos variáveis, e aumento da freqüência de outras infecções oportunistas, é comum que a pneumonia criptocócica não seja diagnosticada antes da disseminação (ABERG & POWDERLY, 1998; SCHOLER, 1985; SPITZER & SPITZER, 1992). Em estudos retrospectivos, grandes percentuais de pacientes com meningite criptocócica tinham evidências de criptococose pulmonar (CAMERON *et al.*, 1991; DRIVER *et al.*, 1995; FRIEDMAN *et al.*, 2005; HOANG *et al.*, 2004). Estes pacientes podem apresentar tosse, mal estar, pouca produção de escarro, e pouca febre, podendo ser estas, as manifestações iniciais da infecção por *C. neoformans*. Na ausência de uma resposta imune efetiva do hospedeiro, a infecção com *C. neoformans* pode progredir para a disseminação e causar doença freqüentemente fatal. A maioria das infecções pulmonares devido a *C. neoformans* não é detectada porque a exposição inicial e a infecção são assintomáticas ou subclínicas (DROMER *et al.*, 1994; KERKERING *et al.*, 1981 MITCHELL & PERFECT, 1995).

A doença invasiva pulmonar quase sempre ocorre na condição de imunossupressão ou em casos de doenças crônicas. O exame radiológico de tórax revela nódulos ou

infiltrados em pacientes com infecção pulmonar invasiva. Em pacientes com teste positivo para a pesquisa de antígenos criptocócicos, a avaliação de doença disseminada é mandatória, sendo também recomendado que todos os pacientes com pneumonia criptocócica sejam examinados para uma possível meningite por punção lombar (MITCHELL & PERFECT, 1995).

O sistema nervoso central é o sítio de infecção mais comum de criptococose disseminada. Criptococemia frequentemente precede a invasão do SNC e pode persistir por um período de 1 a 16 semanas apesar do tratamento (ROZENBAUM & GONÇALVES, 1994). A invasão do SNC pode ser secundária a infecção hematogênica ou representar reativação da doença similar a histoplasmose ou tuberculose. O espaço de tempo entre o aparecimento de sintomas e o diagnóstico varia de dias a meses (ROZENBAUM & GONÇALVES, 1994). Em pacientes infectados com HIV, a manifestação clínica da infecção criptocócica, particularmente meningite, pode ser súbita, com poucos sinais ou sintomas. Os sintomas mais comuns são dores de cabeça, mal-estar, e febre. Mudanças comportamentais, perda de memória, e confusão mental são também comuns. Dentre as infecções criptocócicas, a meningite é a forma mais comum de infecção em pacientes portadores de HIV (ABERG & POWDERLY, 1998; KOVACS *et al.*, 1985). Em pacientes com meningite criptocócica, 36 a 68% apresentam culturas positivas de materiais de sítios extraneurais, usualmente sangue, evidenciando então doença disseminada.

Anormalidades ao exame de líquido, tais como pleocitose, baixa concentração de glicose, e alta concentração de proteínas, são encontradas em aproximadamente 40% de pacientes com AIDS. Uma resposta inflamatória mínima, caracterizada por menos que dez linfócitos/mm<sup>3</sup> em exame de líquido é encontrada em aproximadamente 55% dos casos (ROZENBAUM & GONÇALVES, 1994). Consistente com relatos prévios de literatura, 26% de pacientes HIV-positivos apresentando meningite criptocócica apresentam exames de LCR normais. Entretanto, um exame de LCR aparentemente normal não pode excluir a possibilidade de infecção criptocócica (DARRAS-JOLY *et al.*, 1996).

A criptococose cutânea é um sinal de disseminação presente em aproximadamente 10% dos pacientes e pode preceder por diversas semanas uma doença com risco de vida (MURAKAWA *et al.*, 1996; RICCHI *et al.*, 1991). As lesões variam grandemente na sua apresentação e podem simular outras entidades dermatológicas. As lesões podem aparecer



como pápulas, vesículas, placas, abscessos, púrpuras, ou úlceras (MURAKAWA *et al.*, 1996; RICCHI *et al.*, 1991).

#### 1.4 *Cryptococcus neoformans* e criptococose

O termo criptococose é usado para referir a infecção causada pela levedura encapsulada *C. neoformans*, um Basidiomiceto que geralmente acomete pacientes imunocomprometidos, sejam estes devido à terapia imunomoduladora, seja por doenças que afetam o sistema imune como a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS). Este fungo se apresenta majoritariamente na forma leveduriforme, tendo como principal habitat o solo e excretas de aves domésticas (BOEKHOUT, 2003; CHATURVEDI *et al.*, 2005; DROMER *et al.*, 1994; DROMER *et al.*, 2004; HORTA *et al.*, 2002).

*C. neoformans*, é uma levedura que se caracteriza por apresentar células com considerável heterogeneidade em tamanho e forma (redondas ou ovais) e uma eminente cápsula mucinosa evidente em cultura e nos tecidos do hospedeiro, que a distingue de outras leveduras de importância médica (CASADEVALL & PERFECT, 1998; MITCHELL & PERFECT, 1995). A cápsula é composta primariamente de polissacarídeos, entretanto pode também conter componentes não-polissacarídicos tais como enzimas e proteínas. A cápsula é encontrada imediatamente externa a parede celular e pode variar no tamanho, dependendo do isolado, ambiente e condições de crescimento. A maioria dos isolados produz cápsulas maiores *in vivo* do que *in vitro*, um fenômeno que pode estar relacionado à alta tensão de CO<sub>2</sub> nos tecidos e/ou fatores nutricionais (CASADEVALL & PERFECT, 1998; GATES *et al.*, 2004). A presença do polissacarídeo capsular associada à produção da enzima fenoxidase (responsável pela conversão de substratos hidroxibenzóicos, incluindo catecolaminas, em melanina) e a capacidade de crescer em temperatura de 37°C, são importantes fatores envolvidos na virulência do *C. neoformans* (CASADEVALL & PERFECT, 1998; MITCHELL & PERFECT, 1995).

A natureza polissacarídica da cápsula, consistindo principalmente dos polissacarídeos glicuronoxilomanana, galactoxilomanana e manoproteína (FRIES *et al.*, 1999), permite a classificação em três variedades: *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A), *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D) e *C. neoformans* var. *gattii* (sorotipos B e C) (KATSU *et al.*, 2004; SORREL *et al.*, 1996;). Estudos sugerem que *C. neoformans* var.

*grubii* (sorotipo A) e *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D) apresentam distribuição mundial, enquanto que *C. neoformans* var. *gattii* (sorotipos B e C) é restrito a regiões de clima tropical e subtropical (KROCKENBERGER *et al.*, 2002; SEATON *et al.*, 1996). Os representantes relativos aos sorotipos A e D geralmente encontram-se habitando solos e fezes de aves domésticas - pombos e perus - sendo usualmente os agentes causadores da criptococose em pacientes imunocomprometidos; já a var. *gattii* tem sido associada a eucaliptos, infectando pacientes desprovidos de complicações imunológicas (KATSU *et al.*, 2004; KROCKENBERGER *et al.*, 2002; STEENBERGEN & CASADEVALL, 2000).

Diferenças na apresentação clínica de criptococose causada por linhagens da var. *neoformans*, var. *grubii* e var. *gattii* têm sido descritas (DROMER *et al.*, 2004; SPEED & DUNT, 1995). Em um estudo realizado na Austrália, foi observada uma alta mortalidade em infecções causadas pela var. *neoformans*. Por outro lado, infecções causadas pela var. *gattii* apresentaram baixa mortalidade mas estas foram usualmente complicadas por sequelas neurológicas (CHATURVEDI *et al.*, 2005; DROMER *et al.*, 2004; SPEED & DUNT, 1995). A necessidade de cirurgia e de tratamento prolongado em pacientes infectados com a var. *gattii* foi também relatada por FISHER *et al.* (1993).

Existem ainda diferenças sorológicas e bioquímicas entre as variedades *grubii*, *neoformans* e *gattii*. As variedades são subdivididas em 5 sorotipos, *C. neoformans* var. *grubii* sorotipo A, *C. neoformans* var. *neoformans* sorotipo D e um híbrido AD e *C. neoformans* var. *gattii* sorotipos B e C (CHERNIAK & SUNDSTROM, 1994). As variedades diferem na sua habilidade em assimilar os ácidos L-málico, fumárico e succínico (BENNET *et al.*, 1978) e no metabolismo de creatinina (KWON-CHUNG *et al.*, 1982). As três variedades assimilam creatinina, mas o EDTA inibe a enzima urease em *C. neoformans* var. *gattii* mas não em *C. neoformans* var. *neoformans* (KWON-CHUNG *et al.*, 1982). Linhagens das distintas variedades também manifestam diferenças na susceptibilidade à drogas antifúngicas (SHADOMY *et al.*, 1987). Em geral, as linhagens da var. *gattii* são menos susceptíveis à flucitosina do que as linhagens das var. *grubii* e *neoformans* (SHADOMY *et al.*, 1987). Recente descrição de híbrido BD, *C. neoformans* e *C. gattii* obtido de isolados de paciente com criptococose apresentou cepa anômala conforme análise de seqüências que indicaram a presença de dois genótipos, as cepas foram classificadas sorologicamente como sendo um híbrido BD (BOVERS *et al.*, 2006).

Muitas linhagens de *C. neoformans* var. *neoformans* são susceptíveis à L-canavanina e a maioria não pode assimilar a glicina como única fonte de nitrogênio e carbono (KWON-CHUNG *et al.*, 1982).

A reprodução sexual em *C. neoformans* foi observada somente em laboratório, e seu papel na patogênese é incerto. O estado teleomórfico ou sexuado do *C. neoformans* é denominado *Filobasidiella neoformans*, um basidiomiceto pertencente à Família *Filobasidiaceae*. Sob condições laboratoriais *F. neoformans* pode ser obtida através do cruzamento de duas linhagens compatíveis da levedura,  $a$  e  $\alpha$ , com produção de micélio dicariótico e grampos de conexão típicos dos basidiomicetos. Basídios são então gerados na extremidade das hifas onde ocorre meiose com produção de basidiosporos (WICKES *et al.*, 1996). As variedades *C. neoformans* var. *neoformans* e *C. neoformans* var. *gattii* são similares na forma leveduriforme, ou estado anamórfico. Contudo, diferenças fenotípicas distintas são evidentes no estado teleomórfico: os basidiosporos da variedade *neoformans* são esféricos, elípticos oblongos ou cilíndricos, com paredes rugosas, enquanto que aqueles da variedade *gattii* são baciliformes e com parede lisa (CASADEVALL & PERFECT, 1998). WICKES *et al.* (1996) demonstraram a capacidade de *C. neoformans* produzir hifas e basidiosporos na ausência de cruzamento, ou seja, em fase vegetativa. Esta descoberta indicou que um basidiosporo assexuado produzido durante uma frutificação haplóide é a partícula responsável pela infecção. O hospedeiro humano seria colonizado pelo *C. neoformans* através da inalação de basidiosporos produzidos assexuadamente, os quais são menores, facilmente aerossolizados e mais resistentes a dessecação quando comparados às células leveduriformes (HULL & HEITMAN, 2002; WICKES *et al.*, 1996).

### 1.5 Diagnóstico e aspectos imunológicos

O diagnóstico da criptococose requer avaliação clínica e isolamento do agente etiológico com a identificação de suas características ambientais, morfológicas e bioquímicas. No entanto, o diagnóstico da infecção em sua fase inicial é difícil em decorrência desta fase usualmente ser assintomática (CASADEVALL & PERFECT, 1998). Os métodos laboratoriais de diagnósticos da criptococose consistem no exame microscópico do espécime clínico empregando tinta da Índia (evidenciação da cápsula) ou preparações histológicas; na detecção de antígeno criptocócico pela aglutinação em látex e no isolamento de *C. neoformans* por cultivo. Contudo, alguns problemas de sensibilidade e especificidade apresentados na microscopia direta e na detecção de antígenos tornam o isolamento de *C. neoformans* por cultivo a metodologia padrão no diagnóstico de *C. neoformans* (BARAFANGER *et al.*, 2004; CASADEVALL & PERFECT, 1998; RICHARDSON & WARNOCK, 1993)

O exame de *C. neoformans* por microscopia óptica comum revela células de levedura de tamanho variável, com diâmetro médio de 4 a 6  $\mu\text{m}$ , usualmente ovais ou redondas, com um duplo contorno que as tornam altamente refráteis e que se reproduzem por brotamento. A cápsula de *C. neoformans* normalmente não é visível por microscopia óptica em suspensões aquosas. O método mais comum para sua visualização é o exame de suspensões diluídas em tinta da Índia, onde as partículas da tinta são excluídas pela cápsula, a qual aparece como uma zona clara ao redor da célula da levedura (ZERPA *et al.*, 1996). A cápsula também pode ser visualizada pela adição de anticorpos específicos contra os polissacarídeos capsulares (CLEARE *et al.*, 1994; PIDCOE & KAUFMANN, 1968) ou por microscopia eletrônica (SAKAGUCHI, 1993). As três técnicas de coloração mais utilizadas para evidênciação desta levedura são, (i) preparação com tinta da Índia, (ii) impregnação com sais de prata e, (iii) coloração com hematoxilina e eosina (ABERG & POWDERLY, 1998). O isolamento de *C. neoformans* de sítios anatômicos normalmente estéreis é a prova conclusiva no diagnóstico da doença criptocócica. Também tem sido aceito que o diagnóstico pode ser baseado na presença de antígeno polissacarídico capsular no soro ou líquido (CASADEVALL & PERFECT, 1998; GOLDMAN *et al.*, 1994). O método para detectar o antígeno criptocócico em fluídos corporais foi primeiro relatado por BLOOMFIELD *et al.* (1963) usando um teste de aglutinação de partículas de látex recobertas com anticorpos frente a estes antígenos. Um refinamento deste teste foi a

utilização da enzima pronase para da amostra e posterior aquecimento para minimizar resultados falsos negativos e falsos positivos, tornando o teste mais sensível, específico e não invasivo para o diagnóstico da criptococose (CASADEVALL & PERFECT, 1998; TANNER *et al.*, 1994).

Lesões da criptococose podem ser encontradas como achados incidentais em autópsias de indivíduos assintomáticos (BAKER, 1976; SCHOLER, 1985) consistindo usualmente de uma ou mais lesões granulomatosas, quiescentes localizadas no parênquima pulmonar ou linfonodos pulmonares. A antigenemia também tem sido encontrada em indivíduos assintomáticos, levando ao desenvolvimento de criptococose clínica se a terapia antifúngica não for instituída (FELDMESSER *et al.*, 1996; NUNEZ *et al.*, 2000). Evidências moleculares apontam para a existência de doença subclínica em indivíduos com lesões quiescentes, podendo existir a evolução para doença clínica a partir de uma imunossupressão subsequente (GARCIA-HERMOSO *et al.*, 1999).

A presença de antígeno criptocócico em amostras de soro implica em invasão tecidual (FELDMESSER *et al.*, 1996). Embora o significado de baixos títulos de antígenos em pacientes não esteja claro, existem casos bem documentados de criptococose pulmonar com títulos com valores entre 2 e 4 (NUNEZ *et al.*, 2000); títulos com valores superiores a 8 são indicativos de doença ativa (MITCHELL & PERFECT, 1995). Em locais com alta incidência de meningite criptocócica entre pacientes com AIDS, e por essa razão com a suspeita de alta concentração ambiental de *C. neoformans*, a pesquisa de antígeno criptocócico no soro é um método útil na triagem da detecção precoce de criptococose, entretanto este teste não facilita a precoce identificação de criptococose em áreas de baixa concentração ambiental de *C. neoformans* (HOFFMAN *et al.*, 1991; NEGRONI *et al.*, 1995; McFADDEN *et al.*, 2004).

A criptococose é associada com uma diminuição da resposta imune mediada por células (LORTHOLARY *et al.*, 2002; MITCHELL & PERFECT, 1995; NEUVILLE *et al.*, 2000). Pacientes com AIDS, transplantados, portadores de doenças linfoproliferativas e pacientes recebendo terapia imunossupressora apresentam alto risco para adquirirem a infecção, diferentemente de indivíduos imunocompetentes. Estudos histopatológicos de criptococose experimental em roedores e coelhos indicam que a inflamação granulomatosa apresenta um papel crítico, contribuindo para o êxito das defesas do hospedeiro contra a

levedura *C. neoformans* (GOLDMAN *et al.*, 1994; MURPHY, 1992; PERFECT *et al.*, 1980).

Durante a década passada diversos experimentos laboratoriais mostraram que a imunidade humoral também pode ser importante para as defesas do hospedeiro contra *C. neoformans* (CASADEVALL, 1995; CASADEVALL *et al.*, 1998; PIROFSKI & CASADEVALL, 1996). A maioria destes estudos que avaliam a resposta de anticorpos contra *C. neoformans* tem focado o polissacarídeo capsular e antígenos da parede celular, sendo encontrados alguns anticorpos monoclonais protetores contra a criptococose murina (DESHAW & PIROFSKI, 1995; KELLER *et al.*, 1994; ZHANG *et al.*, 1997; VECCHIARELLI, 2005). Em contraste, poucos estudos têm investigado a resposta de anticorpos contra antígenos protéicos (CASADEVALL & PERFECT, 1998; HAMILTON *et al.*, 1997; KAKEYA *et al.*, 1997).

Evidências sorológicas sugerem que as infecções por *C. neoformans* são comuns entre indivíduos imunocompetentes, incluindo crianças, mas que a doença é rara (DIXON, 2002; GOLDMAN *et al.*, 2001; RAMSAY, 2001). É improvável que isto ocorra devido à falta de exposição ao fungo durante a infância, de acordo com David Goldman e seus colegas do Albert Einstein College of Medicine (New York, NY, USA). Estes estudos são consistentes com os estudos conduzidos por ABADI & PIROFSKI (1999), que encontraram anticorpos reativos contra o polissacarídeo capsular no soro de crianças que não apresentavam criptococose clínica.

O tempo decorrido entre a aquisição da infecção e o desenvolvimento da criptococose clínica tem sido um tópico para consideráveis discussões e representa uma falha em nosso conhecimento da patogênese da doença (CASADEVALL *et al.*, 2003). As reativações de lesões focais quiescentes têm sido consideradas comuns, baseando-se em informações epidemiológicas e em achados de necropsia (GARCIA-HERMOSO *et al.*, 1999; SORREL *et al.*, 1996). Sorrel e colaboradores (1996) mostraram que a infecção de alguns indivíduos examinados neste estudo foi adquirida do ambiente, chegando a esta conclusão baseados nos perfis de RAPD de isolados clínicos e ambientais. Mais recentemente, GARCIA-HERMOSO *et al.*, (1999) mostraram que isolados de *C. neoformans* var. *grubii* originários de um grupo de pacientes na França, haviam sido adquiridos diversos anos antes do desenvolvimento da doença clínica.

Estudos sorológicos fornecem os elementos para a fundamentação e a compreensão da epidemiologia e patogênese de muitas doenças infecciosas. Muitos estudos têm analisado os perfis de anticorpos séricos humanos que são reativos contra o polissacarídeo capsular glicuronoxilomanana. Uma das principais conclusões destes estudos é a de que humanos apresentam anticorpos pré-existentes, reativos contra o polissacarídeo glicuronoxilomanana, e estes anticorpos são encontrados em indivíduos HIV positivos, uma população suscetível a criptococose e em indivíduos HIV negativos, uma população relativamente resistente. Conclusões definitivas sobre estes estudos sorológicos podem ser difíceis, em decorrência da presença de reatividade cruzada com outros polissacarídeos fúngicos, e que a resposta contra este principal polissacarídeo é classicamente pequena em termos de produção de anticorpos (CASADEVALL *et al.*, 2002; DESHAW & PIROFSKI, 1995; HOUPPT *et al.*, 1994; ZHANG *et al.*, 1997).

Existe a necessidade do desenvolvimento de ferramentas sorológicas para investigar problemas na epidemiologia e patogênese de infecções pela levedura *C. neoformans* (CASADEVALL & PIROFSKI, 2005; KATSU *et al.*, 2003; MANSUR *et al.*, 2006; STEENBERGEN & CASADEVALL, 2003). Estudos sobre a soroprevalência de micoses sistêmicas são raramente realizados, mas também podem revelar áreas de transmissão de fungos, detectando casos de doença e indivíduos infectados assintomáticos que desenvolvem e mantêm anticorpos em títulos mensuráveis. No entanto, em razão do pequeno número de isolamentos obtidos, permanecem desconhecidos, em grandes extensões do território brasileiro, os locais onde os fungos fazem o ciclo de vida saprofítica e onde poderiam infectar o homem (MARTINEZ *et al.*, 2002).

A caracterização da resposta de anticorpos frente a proteínas da levedura *C. neoformans* em humanos é importante porque pode apresentar indícios para a patogênese da infecção e assim, auxiliar a identificação de antígenos reconhecidos pelo sistema imune. Existem evidências conclusivas demonstrando que a imunidade mediada por anticorpos pode influenciar o curso da infecção em benefício do hospedeiro humano (BIONDO *et al.*, 2005; CASADEVALL *et al.*, 2002; CHEN *et al.*, 1999; LAMURA *et al.*, 2000; SUBRAMANIAN *et al.*, 2005; VECCHIARELLI, 2005).

## **2. OBJETIVOS**

## 2.1 Objetivo Geral

Analisar a prevalência de anticorpos IgG frente a proteínas de *Cryptococcus neoformans* entre pacientes com criptococose e em indivíduos saudáveis com distintos graus de exposição a este fungo.

## 2.2 Objetivos Específicos:

- Analisar extratos de proteínas obtidas da levedura *C. neoformans*;
- Pesquisar o polissacarídeo capsular de *C. neoformans* em amostras clínicas;
- Utilizar a técnica ELISA para a quantificação de anticorpos frente a proteínas da levedura *C. neoformans*;
- Aplicar a técnica de *Western blot* para a identificação de antígenos criptocócicos envolvidos na resposta imunológica;
- Comparar resultados entre as metodologias utilizadas: pesquisa de polissacarídeo capsular, ELISA e *Western blot*.



### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Isolados e condições de cultivo**

Foram utilizadas as seguintes amostras, dois isolados de *C. neoformans*: a cepa ATCC 32045 sorotipo A, um isolado clínico recente sorotipo A (C 101), pertencente à coleção da prof<sup>a</sup> Marilene H. Vainstein do Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica do Centro de Biotecnologia da UFRGS, e a cepa de *Candida albicans* ATCC 18804 obtida da micoteca da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. Todos os fungos foram cultivados em ágar Sabouraud dextrose (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) e conservados em glicerol a 50% a -20°C.

#### **3.2 Extratos de proteínas fúngicas**

Foi usado neste estudo um extrato antigênico total de *C. neoformans*. Para o preparo deste extrato, *C. neoformans* foi cultivado por 24 horas a 30°C em caldo Sabouraud dextrose. Os volumes dos cultivos foram usualmente de 50 mL e a concentração inicial de células foi de aproximadamente  $10^4$ /mL. As células foram coletadas por centrifugação (12000 x g, 10 a 15 minutos a 4°C) e o sedimento de células foi lavado duas vezes com água destilada gelada estéril e ressuspensão em tampão de lise gelado contendo 1 µM de pepstatina A, 2 mM de fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF), 10 mM Tris-HCL (pH 7,5) e 5 mM EDTA. A amostra foi dividida em dois tubos de microcentrífuga, cada um contendo 1,2 mL de suspensão de células; 0,6 g. de pérolas de vidro (0,15 a 0,20 mm de diâmetro) foram adicionadas em cada tubo e as células foram rompidas por agitação em vortex três vezes por 1 minuto a 4°C. Para a ruptura das células o volume total de suspensão de células-pérolas foi de 2 a 2,5 mL. Os restos celulares foram removidos por centrifugação (3000 x g, 2 minutos, 4°C) e o sobrenadante, representando o extrato celular total, foi transferido para tubos do tipo eppendorf e conservado a -20°C. As concentrações protéicas resultantes foram determinadas pelo método de Bradford, utilizando o kit “Bio-Rad Protein Assay”, conforme as instruções do fabricante (Bio-Rad, Hercules, Calif.). Extratos protéicos das células de *C. albicans* foram preparados como descrito acima para as células de *C. neoformans*.

#### **3.3 Teste imunoenzimático ELISA.**

Microplacas de titulação foram sensibilizadas por adsorção física com o antígeno protéico total de *C. neoformans* diluído em solução tamponada carbonato-bicarbonato ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,02 M;  $\text{NaHCO}_3$  0,03 M; pH 9,6) na concentração de 1  $\mu\text{g}$  de proteínas por unidade de suporte e incubadas “overnight” a 4°C. Logo após, os poços das microplacas sensibilizadas foram lavados três vezes com solução salina tamponada com fosfatos, (PBS 0,01M contendo 0,05% de Tween-20®, pH 7,4 [PBS-Tween]) com incubação à temperatura ambiente por cinco minutos. Ligações não-específicas foram bloqueadas por incubação das placas por 60 min. a 37°C com 1% de soro-albumina bovina (BSA) diluído em PBS-Tween. As placas foram novamente lavadas três vezes com PBS-Tween com incubação à temperatura ambiente por 5 minutos. A cada poço sensibilizado foram adicionados 0,1mL das amostras de soro diluídas 1:200 em PBS-Tween + 1% BSA, incubando por 60 minutos a 37°C. Após 5 lavagens, de 5 minutos cada, com PBS-Tween, adicionou-se 0,1mL de conjugado anti-IgG humana-peroxidase (Pharmacia) na diluição 1:7500 em PBS-Tween + 1% BSA. Após um novo ciclo de incubação e lavagens (quatro lavagens com PBS-Tween e uma última com PBS 1X) foi adicionado em cada poço 0,1mL de solução cromógena (Orto-fenilenodiamino 0,2 mg/mL) – OPD em 0,01 M de tampão citrato de sódio pH 5,0 e 0,005% de peróxido de hidrogênio, como substrato para a enzima. Nesta etapa, a incubação foi de 15 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A reação enzimática foi interrompida com a adição de 0,1 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 N. Os controles negativos consistiram de poços contendo apenas PBS-Tween + 1% BSA. A reatividade foi avaliada espectrofotometricamente através das leituras de densidade ótica (OD) em comprimento de onda de 490 nm (CHEN *et al.*, 1999).

### **3.4 Eletroforese em SDS-PAGE**

Os géis de poliacrilamida foram preparados em uma concentração final de acrilamida de 12 %. Foi adicionado às amostras um tampão de carregamento para condições redutoras (pela presença de  $\beta$ -mercaptoetanol). Após serem fervidas por 5 minutos, as amostras foram imediatamente colocadas em banho de gelo e então aplicadas nos géis: *C. neoformans* 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; *C. albicans* 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

A primeira etapa da migração consistiu de um gel de empilhamento a 4 % de acrilamida seguido do gel de corrida, o qual nunca é inferior a 10 cm em comprimento. O tampão utilizado foi Tris-Glicina 1X e a amperagem mantida a 10 mA durante a migração pelo gel de empilhamento e entre 15 mA e 20 mA durante a migração pelo gel de separação. Ao fim da migração o gel foi corado com Azul de Coomassie, por 10 minutos e lavado com ácido acético glacial 7 %, ou submetido à transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose (TOWBIN *et al.*, 1979).

### **3.5 Transferência de proteínas para membrana de nitrocelulose**

Após o término da migração das amostras no gel de poliacrilamida o mesmo foi colocado em contato direto com uma membrana de nitrocelulose de mesmo tamanho, sendo ambos envolvidos por papéis-filtro. Tanto os papéis-filtro como a nitrocelulose foram previamente umedecidos em tampão de transferência. Este “sanduíche” foi então submetido, em tampão de transferência, a uma voltagem de 70V por 1 hora.

### **3.6 Ensaio Imunoenzimático**

Após a transferência das proteínas, a nitrocelulose foi cortada em tiras de 0,5 cm, sendo todas imediatamente numeradas, com a exceção de uma tira, a qual é submetida à coloração com negro de amido. As tiras foram inicialmente lavadas por 30 minutos com TBS-T 1X (NaCl 137mM, Tris-HCl 20mM, Tween 20 0,05% pH 7,6) e a seguir bloqueadas por 2 horas com solução blotto 5 % (leite em pó desnatado 5% diluído em TBS-T 1X). As tiras foram então incubadas por mais 2 horas à temperatura ambiente (ou durante a noite a 4 °C) com os diferentes soros ou com blotto 5 %, no caso dos controles negativos, os quais foram diluídos para um volume final de 2 ml em blotto 5 %. As tiras foram posteriormente lavadas 3 vezes com blotto 5 %, por 10 minutos cada uma, e incubadas por 1 hora com o conjugado anti-IgG Humano diluído em blotto 5 % (volume final de 2 ml). As tiras foram por fim lavadas 2 vezes com blotto 1 % e 2 vezes com TBS-T 1X, com lavagens também de 10 minutos cada. A revelação foi realizada com a adição da solução de revelação, a qual segue a seguinte proporção:

- 5 mg de DAB (3,3-Diaminobenzidina);
- 30 mL de TBS-T 1X;

- 150 µL de água oxigenada 100 volumes (30 %);
- 1 mL de cloreto de cobalto 1 %.

Obs.: foram utilizados 2 mL de solução de revelação para cada tira e a interrupção da reação ocorreu com a adição de água destilada contendo azida sódica 0,001 %. Todas as lavagens e incubações foram realizadas à temperatura ambiente (com a exceção de algumas incubações dos soros feitas a 4 °C durante a noite, conforme citado acima) com agitação constante.

### **3.7 População estudada**

Neste estudo de soroprevalência foram utilizadas amostras de soro de 26 pacientes com meningite criptocócica, pertencentes a soroteca do serviço de Micologia Clínica do Hospital Universitário da cidade de Santa Maria – Rio Grande do Sul, da Universidade Federal de Santa Maria-RS. Foram utilizadas 24 amostras de soro originárias de trabalhadores de laboratórios de pesquisa, clinicamente sadios, que manipulam a levedura *C. neoformans* e 48 amostras de pacientes pediátricos (não-criptococócicos) que foram atendidos no ambulatório do Hospital Trombudo, no município de Vale do Sol e tiveram seu excesso de sangue coletado utilizado para esta investigação de soroprevalência. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Maria, onde os participantes que concordaram em fazer parte deste estudo assinaram um termo de consentimento antes da coleta de material para a análise sorológica.

### **3.8 Pesquisa de polissacarídeo capsular no soro**

O sistema Latex-Crypto Antigen Detection System (Immuno Mycologics, Inc., Norman, OK, USA) foi utilizado para a pesquisa de polissacarídeo capsular nas amostras de soro dos pacientes, estudados. Este sistema baseia-se em partículas de látex sensibilizadas com anticorpos contra antígenos polissacarídicos da cápsula de *C. neoformans* que, quando entram em contato com amostras que contêm estes antígenos, produzem aglutinação. Este teste detecta aproximadamente 3,2 ng/mL de antígenos capsulares em líquido ou soro. O material biológico (soro) foi tratado por 30 minutos a 56°C com a enzima Pronase para remover o fator reumatóide e, dessa forma, aumentar a especificidade do teste, em conformidade com as instruções do fabricante.

### 3.9 Estudos de adsorção

Para avaliar a especificidade da reatividade dos anticorpos presentes nos soros, foram realizados experimentos de adsorção com extratos protéicos de *C. neoformans* e *C. albicans* (CHEN *et al.*, 1999). A adsorção foi feita misturando 5  $\mu$ L de soro com 150  $\mu$ g de extrato protéico total de *C. albicans* - concentração 1:200 (75  $\mu$ g no caso do extrato protéico de *C. neoformans*) em um volume total de 25  $\mu$ L, seguido pela incubação por 90 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, a reatividade dos soros foi avaliada pela técnica de ELISA e *Western blot*.

### 3.10 Tratamento com periodato de Sódio

Os extratos antigênicos eram submetidos a SDS-PAGE 12% e, ao final, transferidos para uma membrana de nitrocelulose. A membrana contendo o antígeno imobilizado era tratada com 50 mM de m-periodato de sódio em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 4,5 a 25°C por 1 hora, lavada com PBS, e incubada com 50 mM de boroidrato de sódio em PBS a 25°C por 30 minutos ao abrigo da luz (SILVEIRA *et al.*, 2001), lavada em PBS e a seguir submetida ao protocolo de *Western blot*.

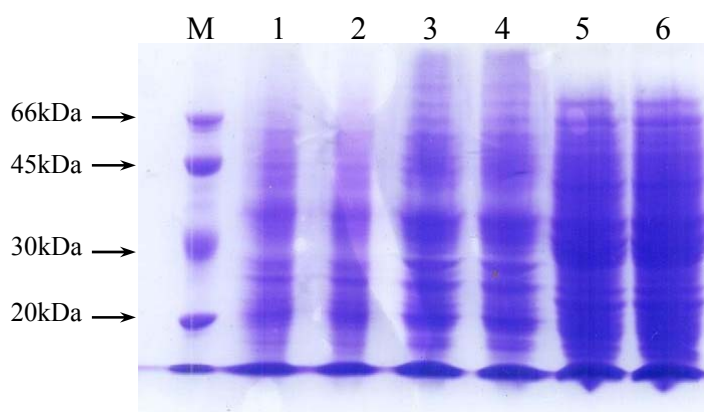
### 3.11 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o uso do programa para análise de dados S.P.S.S. Versão 6.0 para Windows, sendo comparadas às leituras da densidade ótica dos diferentes grupos (crianças, trabalhadores de laboratório e pacientes com meningite criptococócica) através do uso do teste *U* de Mann-Whitney, com valores de  $P < 0,05$  foram considerados significativos. As bandas de proteínas das análises por *Western blot* foram comparadas pelo teste de Mann-Whitney. O teste de Spearman foi utilizado para comparar as leituras OD de ELISA com o número de bandas detectadas nas amostras de soro.

#### 4. RESULTADOS

Este estudo teve como objetivo a análise da resposta imune humoral humana frente a proteínas da levedura *Cryptococcus neoformans*. Além do estudo da prevalência e a especificidade dos anticorpos presentes nas amostras clínicas, foi realizada a quantificação dos títulos de Imunoglobulina G (IgG total) através da utilização do método ELISA.

A Figura 4 apresenta um gel de SDS-PAGE a 12% de diferentes extratos de proteínas de *C. neoformans*, mostrando a ampla faixa de proteínas usadas neste estudo para a avaliação da resposta imunológica. Um *pool* dos diferentes extratos protéicos foi utilizado nos ensaios de avaliação da resposta imune humoral através da metodologia de *Western blot*.



**FIGURA 4:** Análise das proteínas de *Cryptococcus neoformans* por eletroforese em SDS-PAGE a 12% corado com Azul de Coomassie: M, marcador de massa molecular; canaletas 1 e 2; extrato protéico de isolado clínico de *C. neoformans* (250 µg/mL); canaletas 3 e 4; extrato protéico de cepa ATCC sorotipo A de *C. neoformans* (250 µg/mL); canaletas 5 e 6 extrato protéico de *C. albicans* (300 µg/mL).

Os dados epidemiológicos disponíveis dos pacientes com meningite criptocócica são apresentados na Tabela 2, juntamente com os títulos da pesquisa do polissacarídeo capsular pela técnica de látex. A faixa etária dos 26 pacientes, sendo 18 do sexo masculino e 8 do sexo feminino, foi de 22 a 68 anos. Dois pacientes com meningite criptocócica, um do sexo masculino e outro do sexo feminino não eram portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV), mesmo assim apresentavam comprometimento do sistema imune. Os resultados dos testes da pesquisa do polissacarídeo capsular pela técnica

do látex foram comparáveis aos resultados dos cultivos fúngicos, possibilitando a caracterização do grupo de pacientes com meningite criptocócica, que apresentaram o teste de látex positivo, em relação aos demais grupos que compõe este estudo de soroprevalência, crianças e trabalhadores de laboratório com resultados negativos nesta pesquisa. Para a avaliação do estado imunitário dos pacientes com meningite criptocócica foi utilizada a contagem de linfócitos CD4, onde todos os pacientes que fazem parte deste estudo apresentaram como resultados contagens inferiores a 100 células/mm<sup>3</sup>.

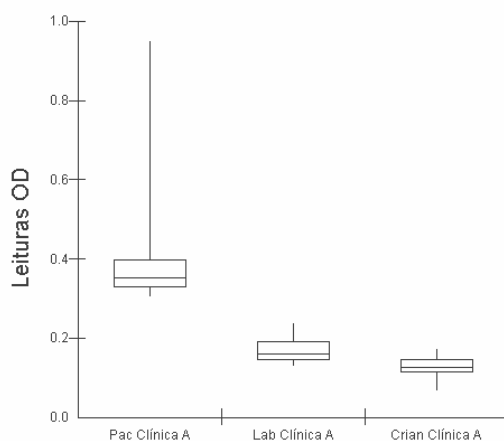
**TABELA 2:** Fonte e características dos soros de pacientes com criptococose utilizados neste estudo

<b>Paciente nº</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade</b>	<b>Status HIV</b>	<b>Título látex</b>
1	Masculino	41	Positivo	512
2	Masculino	23	Positivo	256
3	Masculino	30	Positivo	32
4	Masculino	29	Positivo	64
5	Feminino	35	Positivo	64
6	Masculino	39	Positivo	64
7	Masculino	31	Positivo	32
8	Feminino	34	Positivo	64
9	Masculino	36	Positivo	8
10	Feminino	32	Positivo	1024
11	Masculino	34	Positivo	256
12	Masculino	49	Positivo	64
13	Feminino	42	Positivo	64
14	Masculino	29	Positivo	256
15	Masculino	31	Positivo	256
16	Feminino	22	Positivo	32
17	Masculino	34	Positivo	256
18	Feminino	68	Negativo	16
19	Feminino	25	Positivo	8
20	Masculino	29	Positivo	64
21	Masculino	37	Positivo	64
22	Masculino	33	Positivo	256
23	Masculino	32	Positivo	32
24	Masculino	63	Negativo	16
25	Feminino	31	Positivo	128
26	Masculino	32	Positivo	64



As análises por ELISA de IgG total sérica, utilizando o extrato protéico de isolado clínico recente de *C. neoformans* sorotipo A, são apresentadas na Figura 5. Dentre os três grupos que compõe este estudo, os resultados das análises de ELISA da densidade ótica (OD) do grupo de pacientes com meningite criptocócica apresentaram os valores mais elevados em comparação com os grupos de trabalhadores de laboratório e crianças que não apresentaram diferenças significativas nas respectivas faixas de leituras de OD ( $P>0,05$ ).

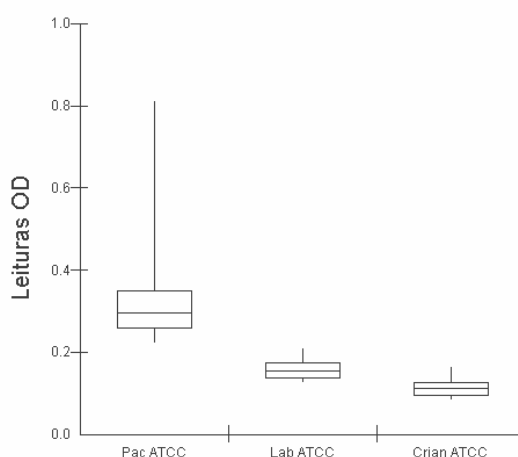
As médias de leituras de densidade ótica (OD) de anticorpos de classe IgG total para os três grupos que fizeram parte deste estudo com a utilização de extrato protéico de isolado clínico recente de *C. neoformans* sorotipo A foram: pacientes  $0,4080 \pm 0,1558$ ; trabalhadores em laboratório  $0,1696 \pm 0,0296$  e crianças  $0,1278 \pm 0,0272$  (Fig. 5).



**FIGURA 5:** Análise por ELISA de IgG total sérica de 26 pacientes adultos, 24 trabalhadores em laboratório e 48 crianças, frente a extrato de proteínas de isolado clínico de *C. neoformans* sorotipo A. Os limites inferiores e superiores das caixas indicam os quartis inferior e superior, respectivamente; linha horizontal escura indica valor da mediana; linhas verticais indicam o limite superior e inferior. Densidades óticas (OD) medidas a 492 nm.

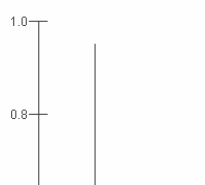
Os resultados das análises através da técnica de ELISA, de IgG total sérica das amostras, das leituras de densidade ótica, utilizando o extrato protéico de *C. neoformans* ATCC 32045 sorotipo A, similarmente aos resultados obtidos com extrato protéico de isolado clínico recente, situaram-se no caso dos pacientes com meningite criptocócica em faixas de valores significativamente superiores as leituras de densidade ótica (OD) dos demais grupos participantes neste estudo de soroprevalência, trabalhadores de laboratório e crianças, conforme mostrado na Figura 6 ( $P<0,05$ ).

De maneira similar aos resultados encontrados com a utilização do extrato protéico de *C. neoformans* de isolado clínico sorotipo A, para o extrato protéico com a utilização da cepa de *C. neoformans* ATCC 32045 sorotipo A os valores de OD foram distintos nos três grupos. As médias de leituras de densidade ótica (OD) de anticorpos de classe IgG total para os três grupos que fizeram parte deste estudo com a utilização de extrato protéico de cepa ATCC de *C. neoformans* sorotipo A foram: pacientes  $0,3375 \pm 0,1296$ ; trabalhadores em laboratório  $0,1578 \pm 0,0244$  e crianças  $0,1153 \pm 0,0203$  (Fig. 6).



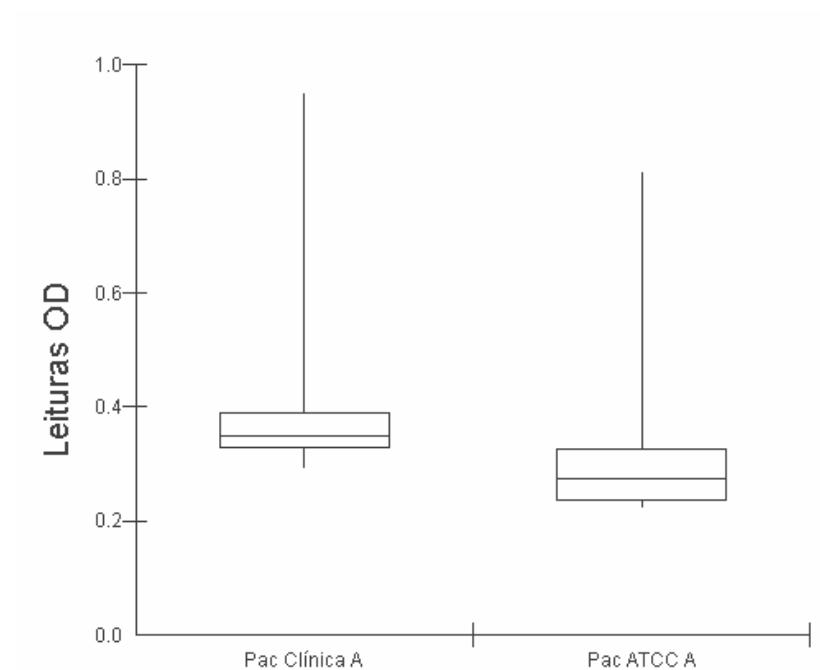
**FIGURA 6:** Análise por ELISA de IgG total sérica de 26 pacientes adultos, 24 trabalhadores em laboratório e 48 crianças, frente a extrato de proteínas de *C. neoformans* ATCC 32045 sorotipo A. Os limites inferiores e superiores das caixas indicam os quartis inferior e superior, respectivamente; linha horizontal escura indica valor da mediana; linhas verticais indicam limite superior e inferior. Densidades óticas (OD) medidas a 492 nm.

A comparação dos resultados da técnica de ELISA das análises de IgG sérica das 96 amostras que compõem este estudo para os diferentes extratos utilizados neste estudo é apresentada na Figura 7, onde são mostradas as respostas das análises dos três grupos com as respectivas faixas de valores de densidade ótica de IgG sérica total medidas em 492 nm. As médias das leituras de OD de pacientes com a utilização dos dois tipos de extratos protéicos foram significativamente maiores que os dois grupos controles usados neste estudo ( $P < 0,05$ ).



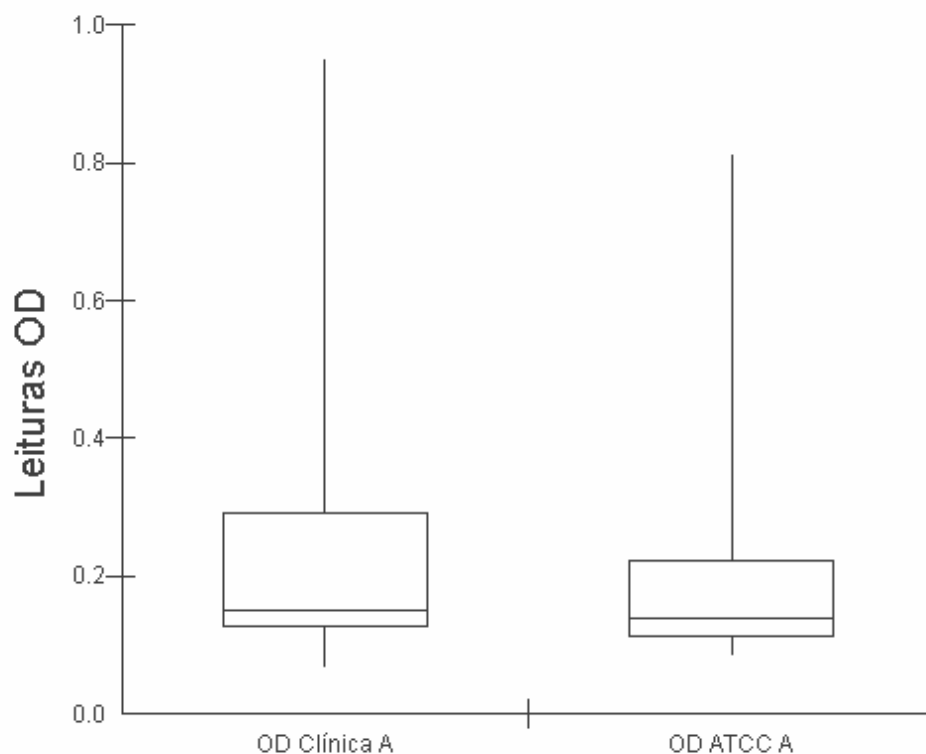
**FIGURA 7:** Análise por ELISA de IgG sérica de 26 pacientes adultos, 24 trabalhadores em laboratório e 48 crianças, frente a extrato de proteínas de *C. neoformans* de isolado clínico sorotipo A e ATCC 32045 sorotipo A. Os limites inferiores e superiores das caixas indicam quartis inferior e superior, respectivamente; linha horizontal escura indica valor da mediana; linhas verticais indicam limite superior e inferior. Densidades óticas (OD) medidas a 492 nm.

As análises por ELISA de IgG total sérica, comparativas das respostas de densidade ótica dos soros de 26 pacientes com meningite criptocócica nos mostram que os valores de OD, utilizando extrato protéico de isolado clínico recente, apresentaram valores mais elevados que os resultados encontrados com o extrato ATCC sorotipo A. Estes resultados foram considerados significativos ( $P < 0.05$ ), conforme apresentado na Figura 8.



**FIGURA 8:** Análises de leituras de densidade ótica (OD) de IgG sérica de 26 pacientes adultos, frente a extratos de proteínas de *C. neoformans* de isolado clínico sorotipo A e ATCC 32045 sorotipo A. Os limites inferiores e superiores das caixas indicam quartis inferior e superior, respectivamente; linha horizontal escura indica valor da mediana; linhas verticais indicam os limites superior e inferior, respectivamente.

As análises comparativas através da técnica de ELISA de IgG total sérica das respostas de densidade ótica do total de amostras de soros dos 98 indivíduos que compõem este estudo nos mostram que os valores de OD, utilizando os dois tipos de extratos protéicos apresentaram diferenças significativas nos resultados encontrados ( $P = 0,0437$ ), conforme mostrado na Figura 9.



**FIGURA 9:** Análises de leituras de densidade ótica (OD) de IgG sérica da amostra estudada frente a extratos de proteínas de *C. neoformans* de isolado clínico sorotipo A e ATCC 32045 sorotipo A. Os limites inferiores e superiores das caixas indicam quartis inferior e superior, respectivamente; linha horizontal escura indica valor da mediana; linhas verticais indicam limites superior e inferior.

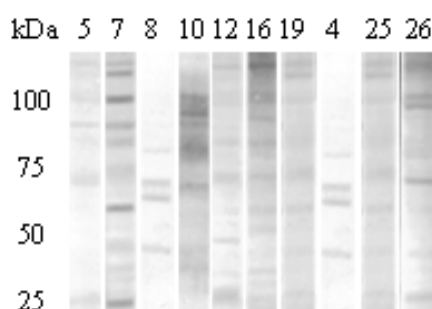
A comparação dos valores de OD para a cepa ATCC e o isolado clínico recente mostrou que o reconhecimento pelos soros foi significativamente maior com a utilização do isolado clínico sorotipo A que com a cepa ATCC sorotipo A ( $P= 0,0437$ ). A comparação das leituras de OD com a utilização da técnica de ELISA no grupo de pacientes também mostrou diferenças significativas entre os dois extratos protéicos ( $P= 0,0012$ ). Quando comparamos as leituras de densidade ótica por ELISA do grupo de crianças entre os extratos protéicos ATCC sorotipo A e isolado clínico recente sorotipo A os resultados também mostraram diferenças significativas em termos de reconhecimentos ( $P= 0,0008$ ). Análises comparativas com o grupo de adultos entre os dois tipos de extratos protéicos também mostraram diferenças significativas ( $P<0,05$ ).

Em relação à faixa etária, os grupos de adultos controles e pacientes apresentaram leituras de OD significativamente maiores que o grupo de crianças com a utilização dos dois tipos de extratos protéicos usados ( $P < 0,05$ ).

As leituras de densidade ótica de anticorpos frente aos extratos protéicos não apresentaram diferenças significativas em relação ao sexo nos diferentes grupos que fizeram parte deste estudo ( $P = 0,503$  e  $P = 0,610$  para as cepas ATCC e isolado clínico, respectivamente). Os valores de  $P$  no grupo de pacientes foram respectivamente de 1,000 e 0,8026 para as cepas ATCC e isolado clínico sorotipo A. Para os grupos de controle de trabalhadores e crianças, os valores de  $P$  foram 0,1440 e 0,9505 para o extrato protéico ATCC, e 0,3401 e 0,3465 para o extrato de isolado clínico, respectivamente.

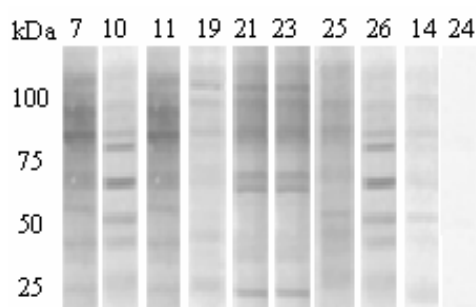
A avaliação da reatividade cruzada foi realizada através da incubação dos soros com extrato protéico de *C. neoformans* (ATCC e clínico) ocorrendo à redução na reatividade dos mesmos frente aos dois extratos protéicos avaliados. No caso da incubação com extrato protéico de *C. albicans* a reatividade não foi abolida.

A análise por *Western blot* com a utilização de extrato protéico da cepa ATCC sorotipo A como extrato antigênico total permitiu a identificação de diversos antígenos protéicos com massa molecular aproximada de 25, 34, 38, 50, 60, 70, 80, 95, 100 e 110 kDa, conforme análise por *Western blot* mostrada na Figura 10.



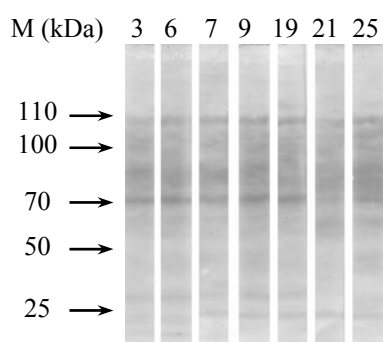
**FIGURA 10:** Análise por *Western blot* da reatividade de anticorpos de classe IgG de soro de pacientes com criptococose na diluição 1:100, frente a extrato protéico total de *C. neoformans* ATCC 32045 sorotipo A. O extrato antigênico foi fracionado por SDS-PAGE 12% e após transferido para membrana de nitrocelulose. Os números acima das tiras identificam as amostras de soro utilizadas.

A análise por *Western blot* da imunorreatividade de soro de pacientes com criptococose, com a utilização de extrato protéico de cepa clínica da levedura *C. neoformans* sorotipo A como extrato antigênico total, permitiu a identificação de diversos antígenos protéicos com massa molecular aproximada de 25, 34, 38, 50, 60, 70, 80, 95, 100 e 110 kDa, conforme mostrado na Figura 11.



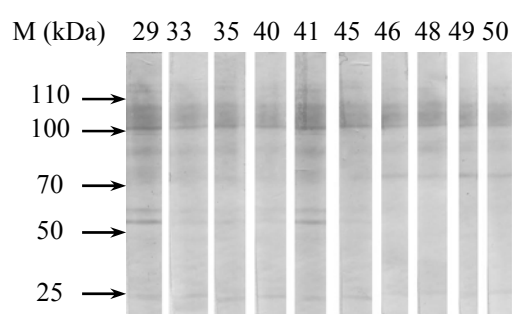
**FIGURA 11:** Análise por *Western blot* da reatividade de anticorpos de classe IgG de soro de pacientes com criptococose na diluição 1:100, frente a extrato protéico total de isolado clínico de *C. neoformans* sorotipo A. O extrato antigênico foi fracionado por SDS-PAGE 12% e após transferido para membrana de nitrocelulose. Os números acima das tiras identificam as amostras de soro utilizadas.

Para a avaliação de reatividade cruzada com a utilização da técnica de *Western blot* foi feita a utilização de extrato protéico total da levedura *C. albicans* e *C. neoformans* sendo pré-incubado com algumas amostras de soros de pacientes com criptococose. Os experimentos de adsorção, com extratos protéicos de *C. neoformans* e *C. albicans*, foram realizados misturando 5  $\mu$ L de soro com 150  $\mu$ g de extrato protéico total de *C. albicans* - concentração 1:200 (75  $\mu$ g no caso do extrato protéico de *C. neoformans*) em um volume total de 25  $\mu$ L, seguido pela incubação por 90 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, a reatividade dos soros foi avaliada por *Western blot*. Conforme mostrado na Figura 12, a reatividade dos anticorpos usualmente reconhecidos presente nos soros dos pacientes com criptococose não foi abolida, demonstrando a especificidade dos anticorpos identificados. A pré-incubação dos soros com o antígeno criptocócico diminuiu, mas não eliminou a reatividade dos soros dos pacientes.



**FIGURA 12:** Análise por *Western blot* com a utilização de extrato protéico total de *C. neoformans* ATCC 32045 sorotipo A. Reatividade de anticorpos de classe IgG do soro de pacientes com criptococose na diluição 1:100, adsorvidos com extrato protéico total da levedura *C. albicans*. O extrato antigênico foi fracionado por SDS-PAGE 12% e após transferido para membrana de nitrocelulose. Os números acima das tiras identificam as amostras de soro utilizadas.

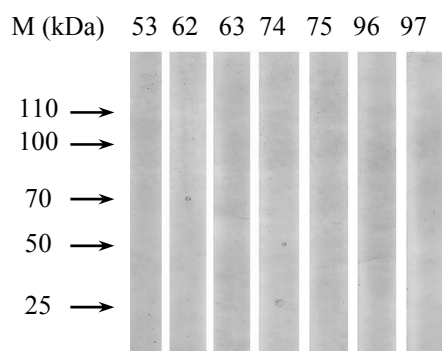
A partir de análise por *Western blot* da imunoreatividade de soro de trabalhadores em laboratório onde a levedura *C. neoformans* é manipulada, com a utilização de extrato protéico de cepa clínica da levedura *C. neoformans* como extrato antigênico total, foi possível a identificação de diversos antígenos protéicos com massa molecular aproximada de 25, 34, 38, 50, 70, 80, 90, 95, 100 e 110 kDa, conforme mostrado na figura 13.



**FIGURA 13:** Análise por *Western blot* da reatividade de anticorpos de classe IgG de soro de trabalhadores em laboratório na diluição 1:100, frente a extrato protéico total de isolado clínico de *C. neoformans* sorotipo A. O extrato antigênico foi fracionado por SDS-PAGE 12% e após transferido para membrana de nitrocelulose. Os números acima das tiras identificam as amostras de soro utilizadas.

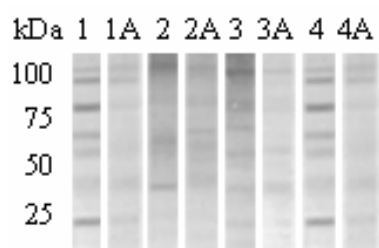


A utilização de extrato protéico total de isolado clínico da levedura *C. neoformans* como extrato antigênico total foi utilizada para a avaliação por *Western blot* da reatividade de amostras de crianças de diferentes faixas etárias. A Figura 14 mostra a ausência de reconhecimento dos antígenos presentes na membrana.



**FIGURA 14:** Análise por *Western blot* da reatividade de anticorpos de classe IgG de soro de crianças na diluição 1:100, frente a extrato protéico total de isolado clínico de *C. neoformans* sorotipo A. O extrato antigênico foi fracionado por SDS-PAGE 12% e após transferido para membrana de nitrocelulose. Os números acima das tiras identificam as amostras de soro utilizadas.

Para a avaliação dos reconhecimentos de antígenos de ambos extratos usados neste estudo serem de origem protéica foi realizado o tratamento com Periodato de sódio dos antígenos nas membranas de nitrocelulose conforme mostrado na Figura 15.



**FIGURA 15:** Análise por *Western blot* da reatividade de anticorpos de classe IgG de soro de pacientes na diluição 1:100, frente a extrato protéico total de isolado clínico de *C. neoformans* sorotipo A após tratamento com periodato de sódio. O extrato antigênico foi fracionado por SDS-PAGE 12% e depois de transferido para membrana de nitrocelulose.

A reatividade dos soros dos diferentes grupos foi avaliada comparando-se os reconhecimentos do número de proteínas nos diferentes grupos identificadas nas análises por *Western blot*. As amostras de soro de indivíduos que apresentaram reconhecimento de 6 a 10 proteínas foram consideradas como reagindo com muitas proteínas, soros que reconheceram de 3 a 5 proteínas foram considerados como reagindo com algumas proteínas e soros que reconheceram entre 0 e 2 proteínas foram considerados como reagindo com poucas ou nenhuma proteína. A tabela 3 apresenta a percentagem de reatividade dos diferentes grupos que fizeram parte deste estudo.

**TABELA 3:** Percentagem de reatividade dos soros frente aos diferentes extratos de *C. neoformans*.

GRUPO	n <sup>a</sup>	EXTRATO ATCC			EXTRATO CLÍNICO		
		M <sup>b</sup>	A <sup>c</sup>	P <sup>d</sup>	M <sup>b</sup>	A <sup>c</sup>	P <sup>d</sup>
Pacientes	26	46,2 (12)	23 (6)	30,8 (8)	50 (13)	19,2 (5)	30,8 (8)
Trabalhadores	24	25 (6)	16,7 (4)	58,3 (14)	25 (6)	12,5 (3)	62,5 (15)
Crianças	48	0 (0)	0 (0)	100 (48)	0 (0)	0 (0)	100 (48)

<sup>a</sup> Número de indivíduos no grupo.

<sup>b</sup> Reatividade com muitas, 6 a 10 proteínas.

<sup>c</sup> Reatividade com algumas, 3 a 5 proteínas.

<sup>d</sup> Reatividade com poucas ou nenhuma, 0 a 2 proteínas.

As respostas individuais de reconhecimento em termos percentuais de anticorpos frente aos antígenos protéicos dos dois tipos de extrato utilizados neste estudo, extrato ATCC e extrato de isolado clínico recente de *C. neoformans* sorotipo A, são apresentadas nas tabelas 4 e 5 respectivamente.

**TABELA 4:** Percentagem de pacientes, trabalhadores e crianças com reatividade contra proteínas de extrato protéico total de *C. neoformans* ATCC 32045 sorotipo A

GRUPOS	n <sup>a</sup>	% DE INDIVÍDUOS COM ANTICORPOS CONTRA ANTÍGENOS DE PROTEÍNAS COM MASSA MOLECULAR APROXIMADA EM kDa:									
		25	34	38	50	60	70	80	95	100	110
PACIENTES	26	69	65	65	57	50	61	46	42	42	42
TRABALHADORES	24	26	30	23	26	30	38	38	34	30	34
CRIANÇAS	48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

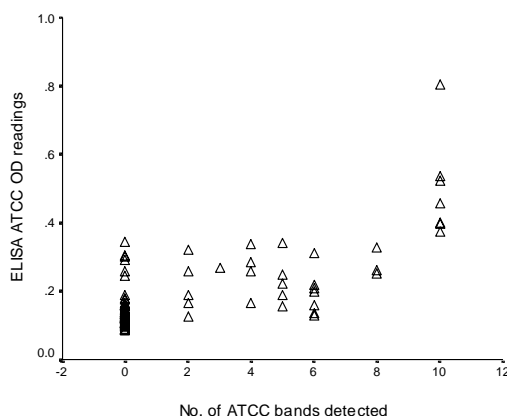
<sup>a</sup>Número de indivíduos no grupo.

**TABELA 5:** Percentagem de pacientes, trabalhadores e crianças com reatividade contra proteínas de extrato protéico de isolado clínico de *C. neoformans* sorotipo A

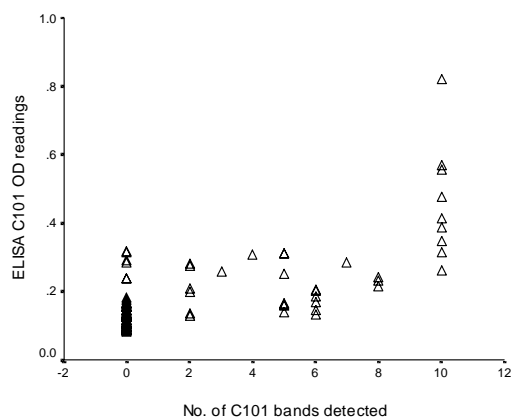
GRUPOS	n <sup>a</sup>	% DE INDIVÍDUOS COM ANTICORPOS CONTRA ANTÍGENOS DE PROTEÍNAS COM MASSA MOLECULAR APROXIMADA EM kDa:									
		25	34	38	50	60	70	80	95	100	110
PACIENTES	26	65	53	42	50	65	61	53	53	50	50
TRABALHADORES	24	38	38	23	23	26	38	34	34	34	34
CRIANÇAS	48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

<sup>a</sup>Número de indivíduos no grupo.

As Figuras 16 e 17 apresentam as correlações realizadas com o teste de Spearman entre os resultados das leituras de densidade ótica de IgG total sérica dos testes ELISA e os antígenos reconhecidos em número de bandas de proteínas detectadas pela técnica de *Western blot*.



**FIGURA 16:** Correlação entre leituras de ELISA e número de bandas detectadas no soro de pacientes com criptococose contra o extrato protéico ATCC ( $r = 0.501$ ).



**FIGURA 17:** Correlação entre leituras de ELISA e número de bandas detectadas no soro de pacientes com criptococose contra o extrato protéico C101 ( $r = 0.334$ ).

## 5. DISCUSSÃO

A infecção causada pela levedura *C. neoformans* é doença cada vez mais diagnosticada na prática clínica, sendo comumente observada em indivíduos imunocomprometidos. Nos pacientes avaliados neste estudo, a imunodeficiência associada à AIDS foi o fator de risco prevalente em 24 dos 26 pacientes com meningite criptocócica, correspondendo a um percentual de 92,30% do total de pacientes com meningite criptocócica que fizeram parte deste estudo. A meningite criptocócica associada a AIDS é o principal fator predisponente para este tipo de infecção de acordo com a maioria dos estudos epidemiológicos desta infecção fúngica (DROMER *et al.*, 2004; FRIEDMAN *et al.*, 2005; HOANG *et al.*, 2004).

Neste estudo de soroprevalência foi padronizado um protocolo para a extração de proteínas totais de *C. neoformans*, sendo este extrato antigênico total composto por uma ampla faixa de proteínas que são evidenciadas na análise por eletroforese em gel SDS-PAGE a 12%.

A detecção do polissacarídeo criptocócico no soro dos pacientes, com a utilização do teste de aglutinação em látex, fornece uma evidência direta de infecção por *C. neoformans*, embora as reações do fator reumatóide possam causar um resultado falso positivo nestas avaliações, o que pode ser contornado pelo uso da enzima pronase, que elimina esta possibilidade (CASADEVALL & PERFECT, 1998; GOLDMAN *et al.*, 2001; TANNER *et al.*, 1994).

A confirmação da suspeita clínica da meningite criptocócica pode ser realizada através da pesquisa do polissacarídeo capsular pela técnica de Látex, inclusive existindo proposta para que análises de cultivos fúngicos de amostras clínicas sejam descontinuadas e o diagnóstico seja embasado na pesquisa do antígeno polissacarídico capsular da levedura *C. neoformans* juntamente com o uso de meios de cultivo bacterianos (BARAFANGER *et al.*, 2004). A quantificação do antígeno criptocócico no soro e líquido pode também ser utilizada para avaliar a resposta clínica frente ao tratamento com antifúngicos, onde uma diminuição nos títulos pode ser correlacionada com melhora clínica do paciente (McFADDEN *et al.*, 2004).

Nossos resultados de pesquisa de polissacarídeo capsular foram comparáveis aos resultados encontrados nos cultivos das amostras clínicas do líquido dos pacientes com

meningite criptocócica, onde obtivemos concordância de 100% com os resultados dos cultivos fúngicos que são considerados o Padrão ouro para o diagnóstico da criptococose (CASADEVALL & PERFECT, 1998). Assim como em outros estudos, em relação ao comparativo dos resultados da pesquisa de polissacarídeo capsular e as pesquisas de anticorpos não encontramos uma correlação positiva, onde os maiores títulos de Látex não corresponderam as maiores leituras de quantificação de anticorpos pelas leituras de absorbância pela metodologia de ELISA, fato que pode ser explicado pelo estado imunitário dos pacientes no momento das coletas sendo refletido em baixos níveis de anticorpos mesmo com altos títulos de antígenos polissacarídeos presentes nas amostras de soro dos pacientes (HAMILTON *et al.*, 1997; LORTHOLARY *et al.*, 2002; SEATON *et al.*, 1996; SUBRAMANIAN *et al.*, 2005).

A quantificação do polissacarídeo capsular no soro dos pacientes, por aglutinação em látex, pode apresentar uma instabilidade em relação a imunorreatividade do polissacarídeo capsular presente no soro humano, que com o passar do tempo pode passar a não ser mais detectado (McFADDEN *et al.*, 2004). A instabilidade do polissacarídeo capsular no soro não é um problema no sistema de análise com a utilização da técnica ELISA que, por ser muito mais sensível e específico que o teste de agutinação em látex, é utilizado como um método confirmatório.

Outro aspecto importante do nosso estudo reside no fato de ser o primeiro trabalho que analisa o comportamento soroepidemiológico de resposta de anticorpos frente aos principais antígenos protéicos identificados e faz um comparativo das respostas de aglutinação em Látex com as pesquisas de anticorpos frente às proteínas de *C. neoformans* utilizando as metodologias de ELISA e *Western blot* (CHEN *et al.*, 1999; HAMILTON *et al.*, 1997; LORTHOLARY *et al.*, 2002). Este é o primeiro estudo brasileiro que enfoca estes aspectos epidemiológicos da pesquisa de anticorpos na criptococose, um dos poucos realizados fora dos principais centros de estudo da criptococose como Austrália, Estados Unidos, França e Itália, todos países desenvolvidos também nesta área de soroepidemiologia de doenças infecciosas, sendo uma importante contribuição para o conhecimento da epidemiologia da infecção criptocócica.

Aspectos epidemiológicos importantes na infecção criptocócica, sexo e idade aliados a imunodeficiência causada pela AIDS, também aqui foram corroborados em relação a outros estudos epidemiológicos. A infecção pelo HIV como principal fator de

risco para a aquisição da criptococose foi responsável por mais de 90% dos casos descritos em nosso estudo, principalmente em adultos e do sexo masculino, 100% e 69,23% respectivamente. A frequência de portadores de meningite criptocócica foi significativamente maior entre os pacientes do que entre os grupos controle ( $P < 0,005$ ) (DROMER *et al.*, 2004; FRIEDMAN *et al.*, 2005; SUBRAMANIAN *et al.*, 2005).

Em relação ao sexo, em concordância com nosso estudo, a predominância da infecção no sexo masculino que também ocorre em outras micoses, parece bastante clara, onde diversos estudos já demonstraram a influência dos hormônios femininos no curso da infecção (HAMILTON *et al.*, 1997; LORTHOLARY *et al.*, 2002; SUBRAMANIAN *et al.*, 2005).

Outro aspecto epidemiológico importante na aquisição da criptococose e já ressaltado anteriormente é a idade. Em nosso estudo os adultos, em concordância com outros estudos epidemiológicos, foram os grupos mais suscetíveis à infecção em comparação com os demais grupos que fizeram parte deste estudo, crianças e trabalhadores de laboratório que manipulam a levedura *C. neoformans*. Dados semelhantes foram obtidos em diversos inquéritos sorológicos como na França, Itália, Estados Unidos e Austrália. Estes estudos sugerem que quanto maior a possibilidade de contato com o fungo que tem ampla distribuição na natureza (ubíquo), maior a possibilidade de adquirirmos a infecção, mesmo em crianças que com o passar do tempo e assim que elas começam a andar tornam-se mais expostas ao contato e passíveis de adquirirem a infecção (HAMILTON *et al.*, 1997; KIERTIBURANAKUL *et al.*, 2006; SEATON *et al.*, 1996; SUBRAMANIAM *et al.*, 2005).

A utilização do método de ELISA possibilitou verificar diferenças significativas com os valores de densidade ótica (OD) das leituras de IgG sérica total entre os três grupos que fizeram parte deste estudo: pacientes, trabalhadores em laboratório e crianças, tanto frente ao extrato de proteínas de *C. neoformans* de isolado clínico sorotipo A, quanto de ATCC 32045 sorotipo A.

As análises comparativas das respostas de densidade ótica dos soros de 26 pacientes com meningite criptocócica nos mostraram que os valores de ELISA, utilizando extrato protéico de isolado clínico recente de *C. neoformans* sorotipo A, apresentaram níveis de reconhecimento de IgG sérica total mais elevados que os encontrados com o extrato ATCC sorotipo A, sendo estes resultados considerados significativos ( $P < 0,05$ ),

reconhecimentos significativamente maiores que podem ser explicados pelas diferenças genotípicas já demonstradas em outros estudos entre isolados de diferentes regiões: a cepa ATCC é americana, enquanto o isolado clínico pertencente a nossa coleção de fungos foi obtido no estado do Rio Grande do Sul (CASALI *et al.*, 2003; HORTA *et al.* 2002).

A comparação entre os níveis de reconhecimentos de leituras de densidade ótica de IgG sérica total das respostas de ELISA dos soros dos 98 indivíduos envolvidos neste estudo com os dois diferentes extratos antigênicos nos mostraram que os valores de leituras dos níveis de IgG correspondentes as faixas de OD também apresentaram diferenças significativas quando comparados os dois tipos de extratos protéicos ( $P=0,0437$ ).

Os comparativos das análises de anticorpos de IgG sérica total de ambos extratos, cepa ATCC sorotipo A e isolado clínico recente, encontrados com a utilização da técnica de ELISA não demonstraram a influência do sexo ou da faixa etária na prevalência da infecção criptocócica na população estudada ( $P>0,05$ ). A maior incidência da infecção no sexo masculino e na idade adulta, aspectos epidemiológicos já apontados anteriormente em outros estudos com uma prevalência maior no sexo masculino devido a maior exposição aos antígenos criptocócicos não foi confirmada provavelmente em decorrência que os níveis de anticorpos uma vez formados que foram detectados não sofrem a influência do sexo ou de hormônios femininos (LORTHOLARY *et al.*, 2002; SEATON *et al.*, 1996; SUBRAMANIAN *et al.*, 2005). Por outro lado, grande parte de nossas amostras pediátricas foram oriundas de crianças de idades variando de 1 a 5 anos, uma faixa etária onde provavelmente ainda não ocorreu uma grande exposição ambiental ao fungo, principalmente como ocorre em pequenas comunidades no interior, em locais afastados dos grandes centros.

Foi observado em inquéritos soropidemiológicos anteriores, a presença de anticorpos reativos pré-existent frente ao polissacarídeo capsular da levedura *C. neoformans*, sendo estes anticorpos encontrados tanto em pacientes HIV+, quanto HIV-, ou seja, tanto numa população que é suscetível a criptococose, bem como em uma que é relativamente resistente (CASADEVALL *et al.*, 2002; PITZURRA *et al.*, 2003; SUBRAMANIAN *et al.*, 2005). Conclusões definitivas sobre estes estudos sorológicos podem ser difíceis, em decorrência da presença de reatividade cruzada com outros polissacarídeos fúngicos, e que a resposta contra este principal polissacarídeo é



classicamente pequena em termos de produção de anticorpos (CASADEVALL *et al.*, 2002; DESHAW & PIROFSKI, 1995; HOUPPT *et al.*, 1994; ZHANG *et al.*, 1997).

A grande maioria dos estudos que avaliam a resposta imune humoral humana frente à levedura *C. neoformans*, avaliam a resposta de anticorpos frente ao polissacarídeo capsular, apresentando resultados altamente variados, dependendo do tipo de ensaio empregado (SEATON *et al.*, 1996). Em contraste, poucos estudos têm investigado a resposta de anticorpos contra antígenos protéicos (CASADEVALL & PERFECT, 1998; HAMILTON *et al.*, 1997; KAKEYA *et al.*, 1997). Com a constatação da presença de reatividade cruzada de anticorpos contra outros antígenos polissacarídicos, a utilização da medida dos níveis de anticorpos IgG contra antígenos protéicos torna-se uma abordagem alternativa necessária.

Nossa estratégia de utilização da combinação da técnica de ELISA e *Western blot* de pesquisar anticorpos frente a proteínas da levedura *C. neoformans* como maneira de avaliar o estado imunitário em relação ao desenvolvimento da criptococose buscou também evitar a presença de anticorpos pré-existente frente aos antígenos polissacarídicos que são causadores de reatividade cruzada entre diferentes microrganismos.

Nossos resultados dos níveis de IgG total sérica avaliados pela técnica de ELISA com leitura em espectrofotômetro em 492 nm possibilitaram a diferenciação entre os diferentes grupos de paciente e controles que fizeram parte deste estudo, o que tornou viável a partir dessa análise comparativa, a utilização de extrato protéico de isolados regionais para a avaliação do estado imunitário frente ao desenvolvimento da criptococose, bem como para sua utilização como uma ferramenta auxiliar para diagnósticos clínicos e para a utilização em inquéritos soropidemiológicos que avaliam a resposta imunológica frente a proteínas da levedura *C. neoformans*.

Embora nossos achados possam ser interpretados por representar anticorpos de reatividade cruzada, diversas linhas de evidências sugerem que as respostas de anticorpos observadas são resultado da exposição à levedura *C. neoformans*. Primeiro, a pré-incubação do soro com extrato de *C. neoformans* reduziu a resposta de reconhecimentos avaliados com a utilização da técnica de ELISA. Segundo, a pré-incubação do soro com extrato de *C. albicans* não reduziu os níveis de reconhecimento de anticorpos de IgG sérica total através da técnica de ELISA. Finalmente, a distribuição de anticorpos em relação aos distintos grupos que fizeram parte deste estudo foi diferente, conforme observação na

elevação dos títulos de anticorpos de acordo com o aumento da exposição ambiental e da idade (HAMILTON *et al.*, 1997; GOLDMAN *et al.*, 2001; SEATON *et al.*, 1996; ZHANG *et al.*, 1997).

Nossos achados também sugerem que as crianças, em áreas urbanas, apresentam anticorpos reativos contra antígenos protéicos de *C. neoformans* com a utilização da técnica de ELISA. Estes achados são consistentes com infecção persistente ou recidiva por *C. neoformans* (ABADI & PIROFSKI, 1999; RAMSAY, 2001). Um estudo prospectivo é necessário para definir os sintomas associados com a infecção primária criptocócica em crianças. A infecção primária pulmonar pode ser assintomática ou produzir sintomas que podem ser confundidos com infecções virais e então não ser reconhecida clinicamente, similar a outras infecções causadas por micoses endêmicas (GOLDMAN *et al.*, 2001; SUBRAMANIAM, 2005).

A utilização da técnica de *Western blot* possibilitou a identificação de diferenças nas respostas individuais entre os pacientes com criptococose, tanto frente ao extrato de proteínas de *C. neoformans* de isolado clínico sorotipo A, quanto da cepa de *C. neoformans* ATCC 32045 sorotipo A. As diferenças em relação aos antígenos reconhecidos podem estar relacionadas às cepas avaliadas, ao estado imunitário no momento em que foram realizadas as coletas de amostras para este inquérito soroepidemiológico e inclusive em relação ao meio de cultivo utilizado para a obtenção dos extratos protéicos que podem influenciar nos antígenos usadas para a avaliação da resposta de anticorpos nos grupos de pacientes e controles. A utilização de caldo Sabouraud como meio para a preparação dos extratos antigênicos é implicada em termos de produção de bandas de proteínas em um pequeno número de reconhecimentos (HAMILTON *et al.*, 1997; LORTHOLARY *et al.* 2002; SUBRAMANIAM *et al.*, 2005). Diferenças genotípicas podem significar a expressão de um padrão de proteínas diferentes que possam significar um menor reconhecimento em termos de resposta de anticorpos como nos nossos resultados encontrados neste comparativo entre uma cepa ATCC e um isolado clínico recente.

Em concordância com outros estudos, às análises comparativas das respostas de prevalência de anticorpos no soro dos pacientes com meningite criptocócica nos mostram que os antígenos reconhecidos apresentaram uma variação de reconhecimentos, mesmo que os principais antígenos reconhecidos tenham sido semelhantes. Diferenças em termos

de reconhecimentos dos antígenos também pode ser decorrência dos níveis de exposição ambiental ao fungo e ao tempo das coletas das amostras analisadas (HORTA *et al.*, 2002; SANTANGELO *et al.*, 2005; SUBRAMANIAM *et al.*, 2005).

A avaliação da resposta imunológica também deve levar em conta além dos fatores relacionados à levedura *C. neoformans* utilizada na produção dos antígenos protéicos como também aos aspectos relacionados ao hospedeiro, como a severidade da infecção que durante a fase aguda é diferente da fase crônica e que pode levar a diferentes respostas em termos de produção de anticorpos (NEUVILLE *et al.*, 2000). A resposta imunológica celular também irá diferir em relação ao órgão afetado seja como infecção primária pulmonar ou doença sistêmica disseminada como no caso da meningite criptocócica aqui descrita em nosso estudo.

A massa molecular aproximada dos principais antígenos reconhecidos é correspondente a algumas das proteínas já anteriormente descritas como envolvidas no processo de infecção e na sua importância em termos de reconhecimento imunológico apontando para uma resposta que pode ser considerada protetora. A resposta humoral contra duas manoproteínas reconhecidas pelo sistema imunológico e produzidas pela levedura *C. neoformans* com massa molecular de 80 e 105 kDa é produzida em indivíduos saudáveis e a falta da produção destes anticorpos pode estar relacionada a incapacidade de montar ou manter uma resposta imunológica ou refletir um defeito específico predisponente a criptococose (PITZURRA *et al.*, 2003).

Os principais constituintes de sobrenadantes de cultivos de *C. neoformans* têm sido caracterizados como glicuronoxilomananas, galactoxilomananas e manoproteínas. A identificação de uma deacetilase criptocócica, com massa molecular de 25 kDa, que produz resposta imune protetora e pode ter um importante papel na síntese da parede celular também é reconhecida como possível alvo de quimioterapia antifúngica, por apresentar importante papel na biossíntese de componentes da parede celular fúngica (BIONDO *et al.*, 2005; BIONDO *et al.*, 2006).

Membros da família de proteínas HSP 70, com massa molecular 77 kDa, podem mediar efeitos protetores em criptococose murina sendo uma das principais moléculas alvo da resposta imune humoral da infecção criptocócica pulmonar murina ( KAKEYA *et al.*, 1997). Nós estudamos sistematicamente proteínas secretadas ou liberadas de *C. neoformans*. Observamos múltiplas proteínas cuja expressão pode variar com as condições

de cultivo e com as cepas utilizadas. Em condições padronizadas esta expressão foi reprodutível de experimento para experimento e que estas proteínas reconhecidas são candidatas para futuros estudos de fatores de virulência e antígenos que elicitam resposta imunológica (KAKEYA *et al.*, 1997; BIONDO *et al.*, 2005).

Glicoproteínas com massa molecular de 34 e 38 kDa produzidas como exoantígenos pela levedura *C. neoformans* apresentam potencial uso no sorodiagnóstico da infecção. Proteínas com massa molecular semelhante foram por nós também identificadas como um dos principais antígenos reconhecidos pelo sistema imune do grupo de pacientes com meningite criptocócica e o grupo controle de trabalhadores de laboratório que manipulam a levedura *C. neoformans* (HAMILTON *et al.*, 1997).

A reatividade cruzada também foi avaliada com a utilização da técnica de *Western blot*. Embora nossos achados possam ser interpretados por representar anticorpos de reatividade cruzada, algumas linhas de evidências sugerem que as respostas de anticorpos observadas são resultados da exposição à levedura *C. neoformans*. Primeiro, a pré-incubação do soro com extrato de *C. neoformans* aboliu a resposta de reconhecimento das proteínas criptocócicas em análises com a utilização da técnica de *Western blot*. Segundo, a pré-incubação dos soros com o extrato total de *C. albicans* não reduziu a intensidade dos reconhecimentos obtidos através das análises por *Western blot*. Finalmente, a distribuição de proteínas reconhecidas por anticorpos de classe IgG em relação aos pacientes pode ser influenciada também de acordo com o aumento da exposição ambiental e da idade dos pacientes que compõe a nossa amostra (GOLDMAN *et al.*, 2001; ZHANG *et al.*, 1997).

As análises comparativas das respostas de prevalência e especificidade de anticorpos de classe IgG no soro dos pacientes com meningite criptocócica nos mostram que os antígenos reconhecidos podem apresentar uma ampla variabilidade de indivíduo para indivíduo. Esta variabilidade pode ser influenciada inclusive como decorrência do estado imunitário no momento da coleta das amostras dos soros dos pacientes que participaram deste inquérito de soroprevalência. A utilização de diferentes extratos protéicos, um extrato protéico originário de cepa ATCC de *C. neoformans* e um extrato protéico oriundo de isolado clínico recente pertencente a nossa coleção de fungos de importância médica, também possibilita que os resultados encontrados neste estudo apresentem diferenças nos padrões de reconhecimento dos anticorpos entre os diferentes indivíduos que fizeram parte deste estudo (CASALI *et al.*, 2003; HORTA *et al.*, 2002).

Nossos resultados das análises de soros de crianças indicaram uma falta de reconhecimento de antígenos criptocócicos com a utilização da técnica de *Western blot* em relação à reatividade de anticorpos de classe IgG frente a proteínas criptocócicas. Esta discordância com relação a outros estudos pode refletir diferenças nas metodologias usadas nestes estudos ou inclusive diferenças individuais na exposição à levedura *C. neoformans* em diferentes países e regiões (GOLDMAN *et al.*, 2001).

O tratamento da membrana de nitrocelulose com periodato de sódio, após a transferência das proteínas do gel de SDS-PAGE a 12% não alterou a capacidade do reconhecimento dos antígenos pelos anticorpos presentes nas amostras soro que fizeram parte deste estudo. Estes resultados, apresentados na Figura 15, indicam que os epitopos reconhecidos são protéicos e não glicídicos, no entanto, não excluindo a possibilidade de que os antígenos sejam glicoproteínas (HAMILTON *et al.*, 1997).

A comparação entre os resultados obtidos com a utilização da técnica ELISA e a técnica de *Western blot* apresentaram uma melhor qualidade de correlação para ambos os extratos, ATCC e amostra clínica C 101 de nossa coleção de fungos, conforme mostrado com a análise estatística apresentada nas Figuras 16 e 17.

A identificação dos principais antígenos da levedura *C. neoformans* reconhecidos pelo sistema imune é de relevância para a escolha de possíveis candidatos para a elaboração de vacinas porque concentrados de sobrenadantes da levedura já mostraram ser imunoprotetores em estudos prévios (BIONDO *et al.*, 2006; DATTA & PIROFSKI, 2006; MAGLIANI *et al.*, 2005).

O campo das doenças infecciosas necessita de novas abordagens na terapia antimicrobiana (MARTINEZ *et al.*, 2005). A utilização de anticorpos isotópicos tem obtido sucesso com certos tipos de câncer. Investigações preclínicas e clínicas recentemente publicadas tem mostrado que anticorpos isotópicos microrganismo-específicos localizam sítios teciduais de infecções bacterianas e fúngicas (DADACHOVA & CASADEVALL, 2005; DADACHOVA & CASADEVALL, 2006; MITCHELL, 2006).

Este estudo examinou a prevalência e distribuição de anticorpos de classe IgG, em diferentes grupos populacionais, frente a antígenos protéicos da levedura *C. neoformans* com a utilização das técnicas de ELISA e *Western blot*. Os antígenos usados compreendem um grande número de proteínas, sendo esta a primeira vez que esta técnica juntamente com a análise por *Western blot*, é utilizada com a finalidade de quantificar a resposta de IgG

total e com a posterior identificação dos principais antígenos reconhecidos pelo sistema imune.

Este estudo demonstra a necessidade da realização de mais inquéritos sorológicos, com análises em diferentes regiões e grupos populacionais distintos, para que seja possível investigar problemas na epidemiologia e patogênese das infecções por *C. neoformans*. Os principais antígenos identificados neste estudo podem também ser de grande relevância para a elaboração de testes diagnósticos, na identificação de possíveis alvos para a elaboração de vacinas e na avaliação do estado imunitário em relação ao desenvolvimento da criptococose.

Nossos resultados apresentados neste estudo mostram pela primeira vez que a detecção e a quantificação de anticorpos frente aos antígenos protéicos da levedura *C. neoformans* com a utilização combinada das técnicas de *Western blot* e ELISA são métodos sensíveis para o diagnóstico da criptococose, abrindo uma nova possibilidade onde os métodos convencionais possam apresentar limitações. A avaliação da reatividade de anticorpos frente a antígenos protéicos de *C. neoformans* em pacientes com meningite meningocócica também pode se tornar uma ferramenta útil para avaliar populações em áreas endêmicas e em inquéritos soropidemiológicos.

## 6. REFERÊNCIAS

- ABADI, J. & PIROFSKI, L.A. Antibodies reactive with the cryptococcal polysaccharide glucuronoxylomannan are present in sera from children with and without human immunodeficiency virus infection. *Journal of Infect. Diseases*. 180: 915-919. 1999.
- ABEGG, M.A. Isolamento e caracterização de *Cryptococcus neoformans* a partir de potenciais reservatórios ambientais inexplorados no Rio Grande do Sul. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2003.
- ABEGG, M. A.; CELLA, F. L.; FAGANELLO, J.; VALENTE, P.; SCHRANK, A. & VAINSTEIN, M. H. *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* isolated from the excreta of *Psittaciformes* in a Southern Brazilian Zoological Garden. *Mycopathologia*, 161: 83-91. 2006.
- ABERG, J. A. & POWDERLY, W. G. The AIDS knowledge base, epidemiology and transmission. CDC. The AIDS Knowledge Base editors. <http://www.hivinsite.ucsf.edu> (acesso em março de 2006).
- ABERG, J. A. & POWDERLY, W. G. The AIDS knowledge base, epidemiology and transmission. CDC. The AIDS Knowledge Base editors. 1998.
- ABOU-GABAL, M. & ATIA, M. Study of the role of pigeons in the dissemination of *Cryptococcus neoformans* in nature. *Sabouraudia* 16: 63-68. 1978.
- ANSHENG, L.; NISHIMURA, K.; TAGUCHI, H.; TANAKA, R.; SHAOXI, W. & MIYAJI, M. The isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon droppings and serotyping of naturally and clinically sourced isolates in China. *Mycopathologia* 124: 1-5. 1993.
- BAKER, R. D. The primary pulmonary lymph node complex of cryptococcosis. *American Journal of Clinical Pathology*. 65: 86-92. 1976.
- BARAFANGER, J.; LAWHORN, J. & DRAKE, C. Nonvalue of culturing cerebrospinal fluid for fungi. *J Clin Microbiol*. 42(1): 236-8. 2004.

- BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W. & YARROW, D (ed.). Yeasts: Characteristics and identification, 2nd ed., p. 282-320. Cambridge University Press, Cambridge. 1990.
- BARÓ, T.; TORRES-RODRIGUES, J. M.; MENDONZA, M. H.; MONERA, Y. & ALÍA, C. First identification of autochthonous *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* isolated from goats with predominantly severe pulmonary disease in Spain. J. Clin. Microbiol. 36: 458-461. 1998.
- BARÓ, T.; TORRES-RODRIGUES, J. M.; MENDONZA, M. H.; MONERA, Y.; ALÍA, C.; LÓPEZ, O. & MÉNDEZ, R. Serotyping of *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Spain. J. Clin. Microbiol. 37: 1170-1172. 1999.
- BARRETO de OLIVEIRA, M.T.; BOEKHOUT, T.; THEELEN, B.; HAGEN, F.; BARONI, F.A.; LAZERA, M.S.; LENGLER, K.B.; HEITMAN, J.; RIVERA, I.N. & PAULA, C.R. *Cryptococcus neoformans* shows a remarkable genotypic diversity in Brazil. J. Clin. Microbiol. 42(3):1356-9. 2004.
- BAWENS, L.; SWINNE, D.; De VROEY, C. & MEURICHY, W. D. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in the aviaries of the Antwerp Zoological Gardens. Mykosen 29: 291-294. 1986.
- BENNETT, J. E.; KWON-CHUNG, K. J. & HOWARD, D. H. Epidemiologic differences among serotypes of *Cryptococcus neoformans*. Am. J. Epidemiol. 105: 582-586. 1977.
- BENNETT, J. E.; KWON-CHUNG, K. J. & THEODORE, T. S. Biochemical differences between serotypes of *Cryptococcus neoformans*. Sabouraudia 16: 167-174. 1978.
- BEYT, B. E. & WALTMANN, S. R. Cryptococcal endophthalmitis after corneal transplantation. N. Engl. J. Med. 298: 825-826. 1978.
- BIONDO, C.; MANCUSO, G.; MIDIRI, A.; BOMBACI, M.; MESSINA, L.; BENINATI, C. & TETI, G. Identification of major proteins secreted by *Cryptococcus neoformans*. FEMS Yeast Res. 6 (4):645-51. 2006.
- BIONDO, C.; MESSINA, L.; BOMBACI, M.; MANCUSO, G.; MIDIRI, A.; BENINATI, C.; CUSUMANO, V.; GERACE, E.; PAPASERGI, S. & TETI, G. Characterization of



- two novel cryptococcal mannoproteins recognized by immune sera. *Infect. Immun.* 73(11): 7348-55. 2005.
- BLOOMFIELD, N.; GORDON, M. A. & ELMENDORF, D. F. Detection of *Cryptococcus neoformans* antigen in body fluids by latex particle agglutination. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 114: 64-67. 1963.
- BOEKHOUT, T. & G. SCORZETTI. Differential killer toxin sensitivity patterns of varieties of *Cryptococcus neoformans*. *J. Med. Vet. Mycol.* 35: 147-149. 1997.
- BOEKHOUT, T. The 5<sup>th</sup> Conference on Cryptococcus and cryptococcosis, Adelaide, 2002. FEMS Yeast Research 3, III-IV, 2003.
- BOTTONE, E. P.; KIRSCHNER, P. A. & SALKIN, I. F. Isolation of highly encapsulated *Cryptococcus neoformans* serotype B from a patient in New York City. *J. Clin. Microbiol.* 23: 186-188. 1986.
- BOTTONE, E. J.; SALKIN, I. F.; HURD, N. J. & WORMSER, G. P. Serogroup distribution of *Cryptococcus neoformans* in patients with AIDS. *J. Infect. Dis.* 156: 242. 1987.
- BOVERS, M; HAGEN, F; KURAMAE, E. E.; DIAZ, M. R.; SPANJAARD, L.; DROMER, F.; HOOGVELD, H. L. & BOEKHOUT, T. Unique hybrids between the fungal pathogens *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *FEMS Yeast Res.*(4):599-607, 2006.
- CAMERON, M. L.; BARTLETT, J. A.; GALLIS, H. A. *et al.* Manifestations of pulmonary cryptococosis in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Rev. Infect. Dis.* 13: 64-67. 1991.
- CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans*: ecology and pathogenesis. *Cliniguide to Fungal Infections.* 4: 16. 1994.
- CASADEVALL, A. Antibody immunity and invasivic fungal infections. *Infect. Immun.* 63: 4211-4218, 1995.

- CASADEVALL, A.; CASSONE, A.; BISTONI, F.; CUTLER, J. E.; MAGLIANI, W.; MURPHY, J. W.; POLONELLI, L. & ROMANI, L. Antibody and/or cell-mediated immunity, protective mechanisms in fungal disease: an ongoing dilemma or an unnecessary dispute? *Med. Mycol.* 36: 95-105, 1998.
- CASADEVALL, A.; FELDMESSER, M. & PIROFSKI, L. Induced humoral immunity and vaccination against major human fungal pathogens. *Current Opinion in Microbiology.* 5:386-391. 2002.
- CASADEVALL, A.; & PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans*. Washington, DC: ASM Press, 1998.
- CASADEVALL, A. & PIROFSKI, L. A. Insights into mechanisms of antibody-mediated immunity from studies with *Cryptococcus neoformans*. *Curr. Mol. Med.* 5(4):421-33. 2005.
- 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 E SILVA, L. K.; RIBEIRO, A. M.; AMARAL, A. A.; ALVES, S. H.; SCHRANK, A.; MEYER, W. & VAINSTEIN, M. H. Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in Brazilian state Rio Grande do Sul. *FEMS Yeast Research.* 3: 405-415. 2003.
- CASTANON-OLIVARES, L. R. & LOPEZ-MARTINEZ, R. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon (*Columbia livia*) droppings in Mexico City. *Mycoses* 37: 325-327. 1994.
- CHATURVEDI, S.; DYAVAIAH, M.; LARSEN, R. A. & CHATURVEDI, V. *Cryptococcus gattii* in AIDS Patients, Southern California. *Emerg. Infect. Dis.* 11(11): 1686-1692. 2005.
- CHEN, S. C.; BROWNLEE, A. G.; SORREL, T. C.; RUMA, P.; ELLIS, D. H.; PFEIFFER, T. G.; SPEED, B. R. & NIMMO, G. Identification by random amplification of polymorphic DNA of a common molecular type of *Cryptococcus neoformans* var.

- neoformans* in patients with AIDS or other immunosuppressive conditions. J. Infect. Dis. 173: 754-758. 1996.
- CHEN, L.C.; GOLDMAN D. L.; DOERING T. L.; PIROFSKI L. A. & CASADEVALL, A. Antibody response to *Cryptococcus neoformans* proteins in rodents and humans. Infect. Immun. 67: 2218-2224.1999.
- CHEN, S. C.; SORREL, T.; NIMMO, G.; SPEED B. R.; CURRIE B.; ELLIS D.; MARRIOT, D.; PFEIFFER, T.; PAN, D. & BYTH, K. Epidemiology and Host- and Variety-Dependent Characteristics of infection due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zealand. Clin. Infect. Dis. 31(2): 499-508. 2000.
- CHERNIAK, R. & SUNDSTROM, J. B. Polysaccharide antigens of the capsule of *cryptococcus neoformans*. Infect. Immun., v. 62, p. 1507-1512, 1994.
- CLEARE, W.; MUKHERJEE, S.; SPITZER, E. D. & CASADEVALL, A. Prevalence in *Cryptococcus neoformans* strains of a polysaccharide epitope wich can elicited protective antibodies. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1: 737-740. 1994.
- COX, G. M.; MUKHERJEE, J.; COLE, G. T.; CASADEVALL, A. & PERFECT, J. R. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. Infect. Immun. 68: 443-448. 2000.
- CRAMPIN, A. C.; MATTHEWS, R. C.; HALL, D. & E. EVANS, G. V. PCR fingerprinting *Cryptococcus neoformans* by random amplification of polymorphic DNA. J. Med. Vet. Mycol. 31: 463-465. 1993.
- CUNA, T. & LUSINS, J. *Cryptococcus albidus* meningitis. South. Med. J. 66: 1230. 1973.
- CURRIE, B. P. & CASADEVALL, A. Estimation of the prevalence of cryptococcal infection among HIV infected individuals in New York City. Clin. Infect. Dis. 19: 1029-1033. 1994.
- CURRIE, B. P.; FREUNDLICH, L. F. & CASADEVALL, A. Restriction fragment length polymorphism analysis of *Cryptococcus neoformans* isolates from environmetal (pigeon excreta) and clinical sources in New York City. J. Clin. Microbiol. 32: 1188-1192. 1994.

- CURRIE, B. P.; VIGUS, T.; LEACH, G. & DWYER, B. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. Lancet 336: 1442. 1990.
- CURTIS, P.; HALLER, J. A. & JUAN, E. An unusual case of cryptococcal endophthalmitis. Retina 15: 300-304. 1995.
- DADACHOVA, E. & CASADEVALL, A. Antibodies as delivery vehicles for radioimmunotherapy of infectious diseases. Expert. Opin. Drug Deliv. 2 (6):1075-84. 2005.
- DADACHOVA, E. & CASADEVALL, A. Treatment of infection with radiolabeled antibodies. Q. J. Med. Mol. Imaging. 50 (3):193-204. 2006.
- DARRAS-JOLY, C.; CHEVRET, S. & WOLFF, M., *et al.* *Cryptococcus neoformans* infection in France: Epidemiologic features of and early prognostic parameters for 76 patients who were infected with human immunodeficiency virus. Clin. Infect. Dis. 23: 369-376. 1996.
- DATTA, K & PIROFSKI, L. A. Towards a vaccine for *Cryptococcus neoformans*: principles and caveats. FEMS Yeast Res. 6 (4):525-36. 2006.
- DENNING, D. W.; KIBBLER, C. C. & BARNES, R. A. British Society for Medical Mycology. Proposed Standards of Care for Patients with Invasive Fungal Infections. Lancet Infectious Diseases. 3: 230-240. 2003.
- DESHAW, M. & PIROFSKI, L. A. Antibodies to the *Cryptococcus neoformans* capsular glucuronoxylomannan are ubiquitous in serum from HIV+ and HIV- individuals. Clin. Exp. Immunol. 99: 425-432. 1995.
- DIXON, B. All in a day's work for a fungi. The Lancet Infectious Diseases. 2: 508. 2002.
- DRIVER, J. A.; SAUNDERS, C. A.; HEINZE-LACEY, B. *et al.* Cryptococcal pneumonia in AIDS: Is cryptococcal meningitis preceded by clinically recognizable pneumonia. J. Acquir Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol. 9: 168-171. 1995.
- DROMER, F.; MATHOULIN, S.; DUPONT, B.; LETENNEUR, L. & RONIN, O. Individual and environmental factors associated with infection due to *Cryptococcus neoformans* serotype D. Clin. Infect. Dis. 23: 91-96. 1996.

- DROMER, F.; MATHOULIN, S.; FONTANET, A.; RONIN, O.; DUPONT, B. & LORTHOLARY, O. Epidemiology of HIV-associated cryptococcosis in France (1985—2001): comparison of the pre- and post HAART eras. *AIDS*. 18(3): 555-562. 2004.
- DROMER, F.; MOULIGNIER, A.; DUPONT, B.; GHEHO, E.; BAUDRIMONT, M.; IMPROVISI, L.; PROVOST, F. & GONZALES-CAVALI, G. Myeloradiculitis due to *Cryptococcus curvatus* in AIDS. *AIDS* 9: 395-396. 1995.
- DROMER, F.; RONIN, O. & DUPONT, B. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from an Asian patient in France: evidence for dormant infection in healthy subjects. *J. Med. Vet Mycol.* 30: 395-397. 1992.
- DROMER, F.; VARMA, A.; RONIN, O.; MATHOULIN, S. & DUPONT, B. Molecular typing of *Cryptococcus neoformans* serotype D clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* 32:2364-2371. 1994.
- DONNELLY, J. P. Symptoms and Diagnosis of Nosocomial Fungal Infections: State-of-The-Arts. *European Journal of Medical Research.* 7: 192-199. 2002.
- DUARTE, A.; ORDONEZ, N. & CASTANEDA, E. Association de lavaduras del genero *Cryptococcus* con especies de *Eucalyptus* en Santa Fe de Bogota. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 36: 125-130. 1994.
- EGGERT, C.; TEMP, U. & ERICKSSON, K. E. The lignolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1151-1158. 1996.
- ELLIS, D. H. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Austrália. *J. Clin. Microbiol.* 25: 430-431. 1987.
- ELLIS, D. H. & PFEIFFER, T. J. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *J. Clin. Microbiol.* 28: 1642-1644. 1990.
- ELLIS, D.H. & PFEIFFER, T. J. The ecology of *Cryptococcus neoformans*. *Eur. J. Epidemiol.* 8: 321-325. 1992.

- EMMONS, C. W. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from soil. J. Bacteriol. 62: 685-690. 1951.
- ENG, R. H. K.; BISHBURG, E.; SMITH, S. M. & KAPILA, R.. Cryptococcal infections in patients with acquired immune deficiency syndrome. A. J. Med. 81: 19-23. 1986.
- FELDMESSER, M.; HARRIS, C. & REICHENBERG, S. Serum cryptococcal antigen in patients with AIDS. Clin. Inf. Dis. 23: 827-830: 1996.
- FESSEL, W. J. Cryptococcal meningitis after unusual exposure to birds. N. Engl. J. Med. 328: 1354-1355. 1993.
- FISHER, D.; BURROW, J.; LO, D. & CURRIE, B. *Cryptococcus neoformans* in tropical northern Australia: predominantly variant gattii with good outcomes. Aust. N. Z. J. Med. 23: 678-682. 1993.
- FRANCISCO, R.; DURANT, J. R. & GAMS, R. A. Demonstration of *Cryptococcus neoformans* in a stained bone marrow specimens. Arch. Intern. Med. 137: 688-690. 1977.
- FRANZOT, S.P.; SALKIN, I. F. & CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. J. Clin. Microbiol. 37: 838-840. 1999.
- FRANZOT, S.P.; HAMDAN, J. S.; CURRIE, B. P. & CASADEVALL, A. Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* in Brazil and the United States: evidence for both local genetic differences and a global clonal population structure. J. Clin. Microbiol. 35: 2243-2251. 1997.
- FRIEDMAN, G. D.; FESSEL, W. J.; UDALSOVA, N. V. & HURLEY, L. B. Cryptococcosis: the 1981-2000 epidemic. Mycosis. 48: 122-125. 2005.
- FRIES, B. C.; GOLDMAN, D. L.; CHERNIAK, R.; JU, R. & CASADEVALL, A. Phenotypic switching in *Cryptococcus neoformans* results in changes in cellular morphology and glucuronoxylomannan structure. Infection and Immunity. 67: 6076-6083.1999.

- FROMTLING, R. A.; SHADOMY, S.; SHADOMY, J. & DISMUKES, W. E. Serotypes B/C *Cryptococcus neoformans* isolated from patients in nonendemic areas. J. Clin. Microbiol. 16: 408-410. 1982.
- GARCIA-HERMOSO, D.; JANBON, G. & DROMER, F. Epidemiological evidence for dormant *Cryptococcus neoformans* infection. J. Clin. Microbiol. 37: 3204-3209. 1999.
- GATES, M.A.; THORKILDSON, P. & KOZEL, T.R. Molecular architecture of the *Cryptococcus neoformans* capsule. Mol Microbiol. 52(1): 13-24. 2004.
- GEZUELE, E.; CALEGARI, L.; SANABRIA, D.; DAVEL, G. & CIVILA, E. Isolation in Uruguay of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from a nest of the wasp *Polybia occidentalis*. Rev. Iber. Micol. 10:5-6. 1993.
- GLASER, J. B. & GARDEN, A. Inoculation of cryptococcosis without transmission of the acquired immunodeficiency syndrome. N. Eng. J. Med. 313: 266. 1985.
- GLUCK, J. L.; MYERS, J. P. & PASS, L. M. Cryptococemia due to *Cryptococcus albidus*. South. Med. J. 80: 511-513. 1987.
- GOLDMAN, D.; LEE, S. C. & CASADEVALL, A. Pathogenesis of pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection in the rat. Infect. Immun. 62: 4755-4761. 1994.
- GOLDMAN, D. L.; KHINE, H.; ABADI, J.; LINDENBERG, D. J.; PIROFSKI, L.; NIANG, R. & CASADEVALL, A. Serologic evidence for *Cryptococcus neoformans* infection in early childhood. Pediatrics. 107. 5: e66. 2001.
- GORDON, M. A. Pulmonary cryptococcosis. A case due to *Cryptococcus albidus*. Am. Ver. Respir. Dis. 106: 786-787. 1972.
- GRISEO, G.; BOLIGNANO, M. S.; DE LEO, F. & STAIB, F. Evidence of canary droppings as an important reservoir of *Cryptococcus neoformans*. Zentralbl. Bakteriol. 282: 244-254. 1995.
- GRISEO, G. & GALLO, M. Serotyping of *Cryptococcus neoformans* isolates from environmental and clinical sources in extreme southern Italy (Calabria and Sicily, central Mediterranean area). Mycoses 40: 90-95. 1997.

- GUGNAMI, H. C.; GUPIA, N. P. & SHRIVASTAV, J. B. Prevalence of *Cryptococcus neoformans* in Delhi Zoological Park and its recovery from the sputum of an employee. Indian J. Med. Res. 60: 182-185. 1972.
- GUSTIN, P. N. & KELLEY, D. C. A survey of zoo aviaries for the presence of *Histoplasma capsulatum* and *Cryptococcus neoformans*. Mycopathol. Mycol. Appl. 45: 93-102. 1971.
- HAJJEH, R.; FARLEY, M.; BAUGHMAN, W. *et al.* Multistate population-based surveillance for cryptococcal disease: 1992-1994. In: Program and Abstracts of the 36<sup>th</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, September 1996, New Orleans, American Society for Microbiology, Abstract 1053. 1996.
- HAMILTON, A.J.; FIGUEROA, J. I.; JEAUVONS, L. & SEATON, R. A. Recognition of cytoplasmic yeast antigens of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* by immune human sera. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 17: 111-119. 1997.
- HAYNES, K. A.; SULLIVAN, D. J.; COLEMAN, D. C.; CLARKE, J. C. K.; EMILIANUS, R.; ATKINSON, C. & CANN, K. J. Involvement of multiple *Cryptococcus neoformans* strains in a single episode of cryptococcosis and reinfection with novel strains in recurrent infection demonstrated by random amplification of polymorphic DNA and DNA fingerprinting. J. Clin. Microbiol. 33: 99-102. 1995.
- HOANG, L. M. N.; MAGUIRE, J. A.; DOYLE, P.; FYFE, M. & ROSCOE, D. L. *Cryptococcus neoformans* infections at Vancouver Hospital Sciences Centre (1997-2002): epidemiology, microbiology and histopathology. J. Med. Microbiol. 53: 935-940. 2004.
- HOFFMAN, S.; STENDERUP, J. & MATHIESEN, L. R. Low yield of screening for cryptococcal antigen by latex agglutination assay on serum and cerebrospinal fluid from Danish patients with AIDS or ARC. Scand. J. Infect. Dis. 23: 697-702. 1991.
- HORTA, J. A.; STAATS, C. C.; CASALI, A. K.; RIBEIRO, A. M.; SCHRANK, I. S.; SCHRANK, A. & VAINSTEIN, M. H.. Epidemiological aspects of clinical and



- environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. *Medical Mycology*. 40: 1-7. 2002.
- HOUPT, D. C.; PFROMMER, G. S. T.; YOUNG, B. J.; LARSON, T. A. & KOZEL, T. R. Occurrences, immunoglobulin classes, and biological activities antibodies in normal human serum that are reactive with *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan. *Infect. Immun.* 62: 3857-3864. 1994.
- HSU, M. M.; CHANG, J. C.; YOKOYAMA, K.; NISHIMURA, K. & MIYAJI, M. Serotypes and mating types of clinical strains of *Cryptococcus neoformans* in Taiwan. *Mycopathologia* 125: 77-81. 1994.
- HUBALEK, Z. Distribution of *Cryptococcus neoformans* in a pigeon habitat. *Folia Parasitol.* 22: 73-79. 1975.
- HULL, C. M. & HEITMAN, J. Genetics of *Cryptococcus neoformans*. *Annu. Rev. Genet.* 36: 557-615. 2002.
- INWIDHAYA, P. One year's experience with *Cryptococcus neoformans* in Thailand. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 88: 208. 1994.
- INWIDHAYA, P.; DITHAPRASOP, P. & EGLASAENG, C. Clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* in Bangkok (Thailand). *Mycopathologia* 108: 65-67. 1989.
- IROKANULO, E. A. O.; AKUESHI, C. O. & MAKINDE, A. A. Differentiation of *Cryptococcus neoformans* serotypes A and D using creatinine dextrose bromothymol blue thymine medium. *Br. J. Biomed. Sci.* 51:100-103. 1994.
- KAKEYA, H.; UDONO, H.; IKUNO, N.; YAMAMOTO, Y.; MITSUTAKE, K.; KOGA, H.; MIYAZAKI, T.; TOMONO, K.; TASHIRO, T.; NAKAYAMA, E. & KOHNO, S. A 77-kilodalton protein of *Cryptococcus neoformans* a member of the heat shock protein 70 family, is a major antigen detected in the sera of mice with pulmonary cryptococcosis. *Infect. Immun.* 65:1653-1658. 1997.
- KATSU, M.; KIDD, S.; ANDO, A.; MORETTI-BRANCHINI, M. L.; MIKAMI, Y.; NISHIMURA, K. & MEYER, W. The internal transcribed spacers and 5.8 S rRNA

- gene show extensive diversity among isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex. FEMS Yeast Research. 4:377-388. 2004.
- KATSU, M.; ANDO, A.; IKEDA, R.; MIKAMI, Y. & NISHIMURA, K. Immunomagnetic isolation of *Cryptococcus neoformans* by beads coated with anti-Cryptococcus serum. Jpn. J. Med. Mycol. 44:139-144. 2003.
- KELLER, R. G.; PFROMMER, G. S. & KOZEL, T. R. Occurrences, specificities, and functions of ubiquitous antibodies in human serum that are reactive with the *Cryptococcus neoformans* cell wall. Infect. Immun. 62: 215-220. 1994.
- KELLEY, R. F. & O'CONNEL, M. P. Thermodynamic analysis of an antibody functional epitope. Biochemistry 32: 6828-6835. 1993.
- KERKERING, T. M.; DUMA, R. J. & SHADOMY, S. The evolution of pulmonary cryptococcosis. Ann. Intern. Med. 94: 611-616. 1981.
- KIDD, S. E.; HAGEN, F.; TSCHARKE, R. L.; HUINH, M.; BARTLETT, K. H.; FYFE, M.; MACDOUGALL, L.; BOEKAHOUT, T. & MEYER, W. A rare genotype of *Cryptococcus gatti* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). Proc Nat. Acad. Sci USA. 101(49): 17258-63. 2004.
- KIERTIBURANAKUL, S.; WIROJTANANUGOON, S.; PRACHARKTAM, R. & SUNGKANUPARPH, S. Cryptococcosis in human immunodeficiency virus-negative patients. Int. J. Infect. Dis. 10: 72-78. 2006.
- KNOKE, M. & SCHWESINGER, G. One hundred years ago: the history of cryptococcosis in Greifswald. Medical mycology in the nineteenth century. Mycoses 37: 229-233. 1994.
- KOHL, R. H.; HOF, H.; SCHRETTENBRUNNER, A.; SEELIGER, H. P. R. & KWON-CHUNG, K. J. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Europe. Lancet i: 1515. 1985.
- KOVACS, J. A.; KOVACS, A. A.; POLIS, M.; C. WRIGHT, W.; GILL, V. J.; TUAZON, C. U.; GELMANN, E. P.; LANE, H. C.; LONGFIELD, R.; OVERTUF, G.; MACHER, A. M.; FAUCI, A. S.; PARRILO, J. E.; BENNETT, J. E. & MASUR, H.

- Cryptococcosis in the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann. Intern. Med.* 103: 533-538. 1985.
- KOZEL, T. R. & HERMERATH, C. A. Binding of cryptococcal polysaccharide to *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* 43: 879-886. 1984.
- KROCKENBERGER, M. B.; CANFIELD, P. J.; BARNES, J.; VOGELNEST, L.; CONNOLLY, J.; LEY, C. & MALIK, R. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in the koala (*Phascolarctos cinereus*): serological evidence for subclinical cryptococcosis. *Medical Mycology.* 40: 273-282. 2002.
- KRUMHOLZ, R. A. Pulmonary cryptococcosis. A case due to *Cryptococcus albidus*. *Am. Rev. Respir. Dis.* 105: 421-424. 1972.
- KWON-CHUNG, K. J. A new genus, *Filobasidiella*, the perfect state of *Cryptococcus neoformans*. *Mycologia* 67: 1197-1200. 1975.
- KWON-CHUNG, K. J. Morphogenesis of *Filobasidiella neoformans*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans*. 67: 821-833. 1976.
- KWON-CHUNG, K. J. The discovery of creatinine assimilation in *Cryptococcus neoformans*, and subsequent work on the characterization of the two varieties of *C. neoformans*. *Zentralbl. Bakteriol.* 275: 390-393. 1991.
- KWON-CHUNG, K. J. & BENNETT, J. E. High prevalence of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in tropical and subtropical regions. *Zentralbl. Bakteriol. Hyg. A* 257: 213-218. 1984.
- KWON-CHUNG, K. J. & BENNETT, J. E. Cryptococcosis: p.397-446. *In Medical Mycology.* Lea & Febiger, Philadelphia. 1992.
- KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. & RHODES, J. C. Taxonomic studies on *Filobasidiella* species and their anamorphs. *Antonie van Leeuwenhoek.* 48: 25-38. 1982.
- KWON-CHUNG, K. J.; BOEKHOUT, T.; FELL, J. W. & DIAZ, M. Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus*. *Taxon.* 51: 804-806. 2002.

- KWON-CHUNG, K. J.; POLACHECK, I. & BENNETT, J. E. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var *neofiformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var *gattii* (serotypes B and C). *J. Clin. Microbiol.* 15:535-537. 1982.
- KWON-CHUNG, K. J.; WICKES, B. L.; BOOTH, J. L.; VISHNIAC, H. S. & BENNETT, J. E.. Urease inhibition by EDTA in the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* 55: 1751-1754. 1987.
- KWON-CHUNG, K. J.; WICKES, B. L.; STOCKMAN, L.; ROBERTS, G. D.; ELLIS, D. & HOWARD, D. H. Virulence, serotype, and molecular characteristics of environmental strains of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *Infect. Immun.* 60:1869-1874. 1992.
- LAMURA L.; MATHEWS, R. C.; BARCHIESI, F.; DONAHOE, M.; BURNIE, J. P. & SCALISE, G. Analysis of Antibody response to *Cryptococcus neoformans* in five patients with AIDS and cryptococcosis by immunoblotting. *Journal of Infection.* 40: 64-68. 2000.
- LAZERA, M. S.; PIRES, F. D. A.; CAMILLO-COURA, L.; NISHIKAWA, M. M.; BEZERRA, C. C. F.; TRILLES, L. & Wanke, B. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *neofiformans* in decaying wood forming hollows in living trees. *J. Med. Vet. Mycol.* 34: 127-131. 1996.
- LAZERA, M. S.; WANKE, B. & NISHIKAWA, M. M. Isolation of both varieties of *Cryptococcus neoformans* from saprophytic sources in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *J. Med. Vet. Mycol.* 31: 449-454. 1993.
- LEHMANN, P. F.; MORGAN, R. J. & FREIMER, E. H. Infection with *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* leading to a pulmonary cryptococcoma and meningitis. *J. Infect.* 9: 301-306. 1984.
- LENGLER, K. B.; DAVISON, R. C.; D'SOUZA, C.; HARASHIMA, T.; SHEN, W. C.; WANG, P.; PAN, X.; WAUGH, M. & HEITMAN, J. Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiol. Mol. Biol.* 64(4): 746-85. 2000.

- LEVINSON, W. & JAWETZ, E. Medical Microbiology & Immunology. Appleton & Lange. 1996.
- LEVITZ, S. M. The ecology of *Cryptococcus neoformans* and the epidemiology of cryptococcosis. Rev. Infect. Dis. 13:1163-1169. 1991.
- LICEA, B. A.; GARZA, D. G. & ZUNIGA, M. T. Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* de *Eucalyptus tereticornis*. Rev. Iber. Micol. 13: 27-28. 1996.
- LITTMAN, M. L. Capsule synthesis by *Cryptococcus neoformans*. Trans. N. Y. Acad. Sci. 20: 623-648. 1958.
- LOPEZ-MARTINEZ, R. & CASTANON-OLIVARES, L. R. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* from bird droppings, fruits and vegetables in Mexico City. Mycopathologia 129: 25-28. 1995.
- LORTHOLARY, O.; IMPROVISI, L.; FITTING, C.; CAVILLON, J. M. & DROMER, F. Influence of gender and age on course of infection and cytokine responses in mice with disseminated *Cryptococcus neoformans* infection. Clinical Microbiology & Infection. 8: 31. 2002.
- LYNCH, J. P.; SCHABERG, D. R.; KISSNER, D. G. & KAUFFMAN, C. A. *Cryptococcus laurentii* lung abscess. Am. Rev. Respir. Dis. 123: 135-138. 1981.
- MAERTENS, J.; VREBOS, M. & BOOGAERTS, M. Assessing Risk Factors for Systemic Fungal Infections. European Journal of Cancer Care. 10: 56-62. 2001.
- MAGLIANI, W.; CONTI, S.; ARSENI, S.; SALATI, A.; RAVANETTI, L.; MAFFEI, D. L.; GIOVATI, L. & POLONELLI, L. Antibody-mediated protective immunity in fungal infections. New Microbiol. 28(4):299-309. 2005.
- MANSUR, M.; LATZ, E. & LEVITZ, S. M. *Cryptococcus neoformans* glycoantigens are captured by multiple lectin receptors and presented by dendritic cells. J. Immunol 176(5):3053-61. 2006.
- MARRA, R. E.; HUANG, J. C.; FUNG, E.; NIELSEN, K.; HEITMAN, J.; VILGALYS, R. & MITCHELL, T. G. A genetic linkage map of *Cryptococcus neoformans* variety *neoformans* serotype D (*Filobasidiella neoformans*). Genetics. 167(2): 619-631. 2004.

- MARTINEZ, L. R. & CASADEVALL, A. Specific antibody can prevent fungal biofilm formation and this effect correlates with protective efficacy. *Infect. Immun.* 73 (10):6350-62. 2005.
- MARTINEZ, R.; VITALI, L. H.; HENRIQUES, J. H S.; MACHADO, A. A.; ALBERNAZ, A. & LIMA, E. A. A. Inquérito soroepidemiológico para infecções por fungos causadores de micoses sistêmicas na Reserva Indígena Xacriabá, Estado de Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 35(4): 347-350. 2002.
- McFADDEN, D.C.; ZARAGOZA, O. & CASADEVALL, A. Immunoreactivity of Cryptococcal Antigen Is Not Stable under Prolonged Incubations in Human Serum. *J. Clin. Microbiol. Jun.* 42(6): 2786-8. 2004.
- McNEIL, M. M.; NASH, S. L.; HAJJEH, R. A.; PHELAN, M. A.; CONN, L. A.; PLIKAYTIS, B. D. & WARNOCK, D. W. Trends in Mortality due to Invasive Mycotic Disease in the United States, 1980-1997. *Clinical Infectious Diseases.* 33: 641-647. 2001.
- MEYER, W.; MARSZEWSKA, K.; AMIRMOSTOFIAN, M.; IGREJA, R. P.; HARDTKE, C.; METHLING, K.; VIVIANI, M. A.; CHINDAPORN, A.; SUKROONGREUNG, S.; JOHN, M. A.; ELLIS, D. H. & Sorrel, T. C. Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA - a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. *Electrophoresis* 20: 1790-1799. 1999.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE- Dados e pesquisa em DST e AIDS. Coordenação do Programa Nacional de DST/AIDS. Brasília. 2002
- MINN, K. H. & KWON-CHUNG, K. J. The biochemical basis for the distinction between the two *C. neoformans* varieties with CGB medium. *Zentralbl. Bakteriol. Hyg. A* 261: 471-480. 1986.

- MISHRA, S. K.; STAIB, F.; FOLKENS, U. & FROMTLING, R. A. Serotypes of *Cryptococcus neoformans* strains isolated in Germany. J. Clin. Microbiol. 14: 106-107. 1981.
- MITCHELL, A. P. Cryptococcal virulence: beyond the usual suspects. J Clin Invest. 116(6):1481-3. 2006.
- MITCHELL, T. G. & PERFECT, J. R. Cryptococcosis in the era of AIDS - 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. Clin. Microbiol. Rev. 8:515-548. 1995.
- MONTAGNA, M. T.; TORTORANO, A. M.; FIORE, L.; INGLETTI, A. M. & BARBUTI, S. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* em Itálie. Not I Premier cas autochthone de méningite à sérotype B chez um sujet VIH positif. J. Mycol. Med. 7: 90-92. 1997.
- MURAKAWA, G. J.; KERSHMANN, R. & BERGER T. Cutaneous cryptococcus infection and AIDS. Report of 12 cases and review of the literature. Arch. Dermatol. 132: 545-548. 1996.
- MURPHY, J. W. Cryptococcal immunity and immunostimulation. Adv. Exp. Med. Biol. 319: 225-230. 1992.
- NEGRONI, R.; CENDOYA, C. & ARECHAVALA, A. I. Detection of *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide antigen in asymptomatic HIV-infected patients. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 37: 385-389. 1995.
- NEILSON, J. B.; IVEY, M. H. & BULMER, G. S. *Cryptococcus neoformans*: pseudohyphal forms surviving culture with *Acanthamoeba polyphaga*. Infect. Immun. 20: 262-266. 1978.
- NISHIKAWA, M. M.; LAZERA, M. S.; BRABOSA, 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 enviromental sources in Brazil: Analysis of Host and Regional Patterns. J. Clin. Microbiol. 41: 73-77. 2002.

- NEUVILLE, S.; LORTHOLARY, O. & DROMER, F. Do kinetics of the humoral response to *Cryptococcus neoformans* proteins during murine cryptococcosis reflect outcome? *Infect. Immun.* 68: 3724-3726. 2000.
- NUNEZ, M.; PEACOCK, J. E. & CHIN, R. Pulmonary cryptococcosis in the immunocompetente host: therapy with oral fluconazole: a report of four cases and a review of the literature. *Chest.* 118: 527-534. 2000.
- OSTROWSKI, M.; SALIT, I. E.; GOLD, W. L.; SUTTON, D.; MONTPETIT, M. L.; LEPINE, D. & SALAS, T. Idiopathic CD4<sup>+</sup> T-lymphocytopenia in two patients. *Can. Med. Assoc. J.* 149: 1679-1683. 1993.
- PADHYE, A. A.; CHAKRABARTY, A.; CHANDER, J. & KAUFMAN, L. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in India. *J. Med. Vet. Mycol.* 31: 165-168. 1993.
- PERFECT, J. R.; LANG, S. D. R. & DURACK, D. T. Chronic cryptococcal meningitis. *Am. J. Pathol.* 101: 177-193. 1980.
- PFALLER, M. A. Epidemiology of fungal infections: the promise of molecular typing. *Clin. Infect. Dis.* 20:1535-1539. 1995.
- PFALLER, M. A. & WENZEL, R. Impact of the changing epidemiology of fungal infections in the 1990s. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 11:287-291. 1992.
- PFEIFFER, T. & ELLIS, D. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from California. *J. Infect. Dis.* 163: 929-930. 1991.
- PFEIFFER, T. J. & ELLIS, D. H. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from *Eucalyptus tereticornis*. *J. Med. Vet. Mycol.* 30: 407-408. 1992.
- PIDCOE, V. & KAUFMANN, L. Fluorescent-antibody reagent for the identification of *Cryptococcus neoformans*. *Appl. Microbiol.* 16: 271-275. 1968.
- PIROFSKI, L. & CASADEVALL, A. Antibody immunity to *Cryptococcus neoformans*: paradigm for antibody immunity to the fungi? *Zentralbl. Bakteriol.* 284: 475-495. 1996.



- PITZURRA, L.; PERITO, S.; BALDELLI, F.; BISTONI, F. & VECCHIARELLI, A. Humoral response against *Cryptococcus neoformans* mannoprotein antigens in HIV-infected patients. Clin. Exp. Immunol. 133: 91-96. 2003.
- POLACHEK, I. & KWON-CHUNG, K. J. Creatinine metabolism in *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus bacillisporus*. J. Bacteriol. 142: 15-20. 1980.
- POONWAN, N.; MIKAMI, Y.; POOSUWAN, S.; BOON-LONG, J.; MEKHA, N.; KUSUM, M.; YAZAWA, K. & TANAKA, R. Serotyping of *Cryptococcus neoformans* strains isolated from clinical specimens in Thailand and their susceptibility to various antifungal agents. Eur J Epidemiol. 13(3):335-40. 1997.
- POWELL, K. E.; DAHL, B. A.; WEEKS, R. J. & TOSH, F. E. Airborne *Cryptococcus neoformans* particles from pigeon excreta compatible with alveolar deposition. J. Infect. Dis. 125: 412-415. 1972.
- RAMSAY, S. *Cryptococcus neoformans* common in urban children. The Lancet. 357:1507. 2001.
- RANDHAWA, H. S.; STAIB, F. & BLISSE, A. Observations on the occurrence of *Cryptococcus neoformans* in an aviary, using niger-seed creatinine agar and membrane-filtration technique. Zentralb. Bakteriologie. 128: 795-799. 1973.
- REFAL, M.; TAHA, M.; SELIM, A.; ELSHABOURII, F. & YOUSSEFF, H. H. Isolation of *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, and other yeasts from pigeon droppings in Egypt. Sabouraudia 21: 163-168. 1983.
- RIBEIRO, A. M.; SILVA, L. K. R. ; SCHRANK, I. S; SCHRANK, A.; MEYER, W. & VAINSTEIN, M. H. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* serotype D from *Eucalypts* in South Brazil. Med Mycol, v. prelo, n. TMMY 19163, 2006.
- RICCHI, E.; MANDREDI, R.; SCARINI, P. *et al.* Cutaneous cryptococcosis and AIDS. J. Am. Acad. Dermatol. 25: 335-336. 1991.
- RICHARDSON, M. D. & WARNOCK, D. W. Fungal Infection: diagnosis and management. Blackwell Scientific Publications, 1993.

- RINALDI, M. G.; DRUTZ, D. J.; HOWELL, A.; SANDE, M. A.; WOFSEY, C. B. & HADLEY, W. K. Serotypes of *Cryptococcus neoformans* in patients with AIDS. J. Clin. Infect. Dis. 153: 642. 1986.
- RIPPON, J. W. Medical Mycology. The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. 3 ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company. 1988.
- ROZENBAUM, R. A. & GONÇALVES, A. J. R. Clinical epidemiological study of 171 cases of Cryptococcosis. Clin. Infect. Dis. 18: 369-380. 1994.
- ROZENBAUM, R.; GONÇALVES, A. J. R.; WANKE, B.; CAIUBY, M. J.; CLEMENTE, H.; LAZERA, M. D. S.; MONTEIRO, P. C. F. & LONDERO, A. T.. *Cryptococcus neoformans* varieties as agents of cryptococcosis in Brazil. Mycopathologia 119: 133-136. 1992.
- RUIZ, A.; FROMTLING, R. A. & BULMER, G. S. Distribution of *Cryptococcus neoformans* in a natural site. Infect. Immun. 31: 560-563. 1981.
- RUIZ, A.; NEILSON, J. B. & BULMER, G. S. Control of *Cryptococcus neoformans* in nature by biotic factors. Sabouraudia 20: 21-29. 1982.
- RUIZ, A.; VELEZ, D. & FROMTLING, R. A. Isolation of saprophytic *Cryptococcus neoformans* from Puerto Rico: distribution and variety. Mycopathologia 106: 167-170. 1989.
- SAKAGUCHI, N. Ultrastructural study of hepatic granulomas induced by *Cryptococcus neoformans* by quick-freezing and deep-etching method. Virchows Arch. (Cell. Pathol.). 64: 57-66, 1993.
- SALKIN, I. F. & HURD, N. J. New medium for differentiation of *Cryptococcus neoformans* serotype pairs. J. Clin. Microbiol. 15: 169-171. 1982.
- SANFELICE, E. Contributo alta morfologia e biologia del blastomiceti che si sviluppano nei succhi di alcuni frutti. Ann. Igiene. 4: 463-495. 1894.

- SANTANGELO, R. T.; CHEN, S. C.; SORRELL, T. C. & WRIGHT, L. C. Detection of antibodies to phospholipase B in patients infected with *Cryptococcus neoformans* by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Med Mycol.* 43(4):335-41. 2005.
- SCHOLER, H. J. Diagnosis of cryptococcosis and monitoring of chemotherapy. *Mykosen.* 28: 5-16. 1985.
- SEATON, R. A.; HAMILTON, R. J. & WARRELL, D. A. Exposure to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* – a seroepidemiological study. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 90: 508-512. 1996.
- SHADOMY, H. J. Clamp connections in two strains of *C. neoformans*. *Spectrum monograph series. Arts and Sciences, Georgia State University* 1: 67-72. 1970.
- SHADOMY, H. J.; WOOD-HELIE, S.; SHADOMY, S.; DISMUKES, W. E. & CHAU, R. Y. Biochemical serogrouping of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 6: 131-138. 1987.
- SHIELDS, A. & AJELLO, L. Medium for selective isolation of *Cryptococcus neoformans*. *Science* 151: 208-209. 1966.
- SHIMIZU, R. Y.; HOWARD, D. H. & CLANCY, M. N. The variety of *Cryptococcus neoformans* in patients with AIDS. *J. Infect. Dis.* 154: 1042. 1986.
- SILVEIRA, T. G.; SUZUKI, E.; TAKAHASHI, H. K. & STRAUS, A. H. Inhibition of macrophage invasion by monoclonal antibodies specific to *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes and characterisation of their antigens. *International J. Parasitol.* 31: 1451-1458. 2001.
- SINGH, N. Trends in the Epidemiology of Opportunistic Fungal Infections: Predisposing Factors and the Impact of Antimicrobial Use Practices. *Clinical Infectious Diseases.* 33:1692-1696. 2001.
- SORRELL, T. C. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. *Med. Mycol.* 39: 155-168. 2001.
- SORRELL, T. C.; CHEN, S. C.; RUMA, P.; PFEIFFER, T. J.; ELLIS, D. H. & BROWNLEE, A.G. Concordance of clinical and environmental isolates of

- Cryptococcus neoformans* var. *gattii* by random amplification of polymorphic DNA analysis and PCR fingerprinting. J. Clin. Microbiol. 34:1253-1260. 1996.
- SPEED, B. & DUNT, D. Clinical and host differences between infections with the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. Clin. Infect. Dis. 21: 28-34, 1995.
- SPEED, B. R.; STRAWBRIDGE, L. & ELLIS, D. H. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* meningitis in an Australian patient with AIDS. J. Med. Vet. Mycol. 31: 395-399. 1993.
- SPITZER, E. D. & SPITZER S. G. Use of a dispersed repetitive DNA element to distinguish clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. J. Clin. Microbiol. 30: 1094-1097. 1992.
- STAIB, F. Sampling and isolation of *Cryptococcus neoformans* from indoor air with the aids of the reuter centrifugal sampler (RCS) and guizotia abyssinica creatinine agar. A contribution to the mycological-epidemiological control of *Cr. neoformans* in the fecal matter of caged birds. Zentralbl. Bakteriол. Hyg. Abt. 1 Orig. B 180: 567-575. 1985.
- STAIB, F.; GRAVE, B.; ALTMANN, L.; MISHRA, S. K.; ABEL, T. & BLISSE, A. Epidemiology of *Cryptococcus neoformans*. Micopathologia 65: 73-76. 1976.
- STAIB, F. & HAISENHUBER, M. *Cryptococcus neoformans* in bird droppings: a hygienic-epidemiological challenge. AIDS-Forschung (AIFO) 4: 649-655. 1989.
- STAIB, F.; RANDHAWA, H. S.; SENSKA, M.; BLISSE, A. & WULKOW, R. Peach and peach juice as a nutrient for *Cryptococcus neoformans* with comments on some observations of F. Sanfelice. Zentralbl. Bakteriол. Hyg. Abt. 1 Orig. A 224: 120-127. 1973.
- STAIB, F. & SCHULZ-DIETERICH J. *Cryptococcus neoformans* in fecal matter of birds kept in cages- control of *C. neoformans* habitats. Zentralbl. Bakteriол. Hyg. Abt. 1 Orig. B 179:179-186. 1984.
- STAIB, F.; SEIBOLD, M.; ANTWEILER, E.; FROHLICH, B.; WEBER, S. & BLISSE, A. The brown color effect (BCE) of *Cryptococcus neoformans* in the diagnosis, control and epidemiology of *C. neoformans* infections in AIDS patients. Zentralbl. Bakteriол. Hyg. A 266: 167-177. 1987.

- STEENBERGEN, J. & CASADEVALL, A. Prevalence of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (Serotype D) and *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (Serotype A) isolates in New York City. *J. Clin. Microbiol.* 38: 1974-1976. 2000.
- STEENBERGEN, J. N. & CASADEVALL, A. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Microbes and Infection.* 5: 667-675. 2003.
- St-GERMAIN, G.; NOEL, G. & KWON-CHUNG, K. J. Disseminated cryptococcosis due to *Cryptococcus neoformans* variety *gattii* in a Canadian patient with AIDS. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 7: 587-588. 1988.
- SUBRAMANIAM, K.; FRENCH, N. & PIROFSKI, L. A. *Cryptococcus neoformans*-reactive and total immunoglobulin profiles of human immunodeficiency virus-infected and uninfected Ugandans. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 12 (10):1168-76. 2005.
- SULLIVAN, D.; HAYNES, K.; MORAN, G.; SHANLEY, D. & COLEMAN, D. Persistence, Replacement, and Microevolution of *Cryptococcus neoformans* strains in recurrent meningitis in AIDS patients. *J. Clin. Microbiol.* 34: 1739-1744. 1996.
- SWINNE, D. Study of *Cryptococcus neoformans* varieties. *Mykosen* 27: 137-141. 1983.
- SWINNE, D.; DEPPNER, M.; MANIRATUNGA, S.; LAROCHE, R.; FLOCH, J. J. & KADENDE, P. AIDS-associated cryptococcosis in Bujumbura, Burundi: an epidemiological study. *J. Med. Vet. Mycol.* 29: 25-30. 1991.
- SWINNE, D.; KAYEMBE, K. & NIYIMI, M. Isolation of saprophytic *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in Kinshasa, Zaire. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* 66: 57-61. 1986.
- SWINNE, D.; NKURIKIYINFURA, J. B. & MUYEMBE T. L. Clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* from Zaire. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 5: 50-51. 1986.
- SWINNE-DESGAIN, D. The pigeon as reservoir for *Cryptococcus neoformans*. *Lancet* ii: 842-843. 1974.
- SWINNE-DESGAIN, D. *Cryptococcus neoformans* of saprophytic origin. *Sabouraudia* 3: 303-308. 1975.

- TANNER, D. C.; WEINSTEIN, M. P. & FEDORCIW, B. Comparison of commercial kits for detection of cryptococcal antigen. *J. Clin. Microbiol.* 32: 1680-1684. 1994.
- TEOH-CHAN, C. H. P.; CHAU, P. Y.; NG, M. H. & WONG, P. C. Inhibition of *Cryptococcus neoformans* by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Med. Microbiol.* 8: 433-439. 1975.
- TOWBIN, H.; STAEBLIN, T. & GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *PNAS.* 76: 4350-4354. 1979.
- VECCHIARELLI, A. The cellular responses induced by the capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans* differ depending on the presence or absence of specific protective antibodies. *Curr. Mol. Med.* 5 (4):413-20. 2005.
- VIDOTTO, V.; AOKI, S. & CAMPANINI, G. A vitamin-free minimal synthetic medium for *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia* 133: 139-142. 1996.
- VIVIANI, M. A.; WEN, H.; ROVERSELLI, A. *et al.* Identification by polymerase chain reaction fingerprinting of *Cryptococcus neoformans* serotype AD. *J. Med. Vet. Mycol.* 35: 355-360. 1997.
- WICKES, B. L.; MAYORGA, M. E.; EDMAN, U. & EDMAN, J.C. Dimorphism and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*: association with the alpha-mating type. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 7327-7331. 1996.
- WILLIAMSON, P. R. Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans*: identification as a laccase. *J. Bacteriol.* 176: 656-664. 1994.
- XU, J. & MITCHELL, G. Comparative gene genealogical analyses of strains of serotype AD identify A and D the human pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology.* 149: 2147-2154. 2003.
- YAMAMOTO, Y.; KOHNO, S.; KOGA, H.; KAKEYA, H.; TOMONO, K.; KAKU, M.; YAMAZAKI, T.; ARISAWA, M. & HARA, K. Random amplified polymorphic DNA

analysis of clinically and environmentally isolated *Cryptococcus neoformans* in Nagasaki. J. Clin. Microbiol. 33: 3328-3332. 1995.

ZHANG, H.; ZHONG, Z. & PIROFSKI, L. Peptide epitopes recognized by a human anti-cryptococcal glucuronoxylomannan antibody. Infect. Immun. 65: 1158-1164. 1997.

ZERPA, R.; HUICHO L. & GUILLEN, A. Modified Indian ink preparation for *Cryptococcus neoformans* in cerebrospinal fluid specimens. J. Clin. Microbiol. 34: 2290-2291. 1996.

**ANEXO 1**  
**CURRICULUM VITAE**



## **CURRICULUM VITAE**

Santa Cruz do Sul  
2006

### **1 DADOS PESSOAIS**

Nome: Jorge André Horta

Filiação: Adanúncio Horta e Tharcilla Melania Assmann Horta

Nascimento: 05/03/1961, Santa Cruz do Sul/RS - Brasil

Carteira de identidade: 4012394807 / SSP / RS / 30/04/1974

CPF: 32030061034

Endereço profissional: Universidade de Santa Cruz do Sul, Departamento de Biologia e Farmácia.

Av. Independência, 2293 sala 1203

Universitário

96815-900 Santa Cruz do Sul, RS - Brasil

Telefone: (51) 37177360

E-mail: [jhorta@unisc.br](mailto:jhorta@unisc.br)

Endereço residencial: Borges de Medeiros, 357  
Centro

96810130 Santa Cruz do Sul, RS - Brasil

Telefone: (51) 37177360 Fax: 37151675

E-mail: [jhorta@unisc.br](mailto:jhorta@unisc.br)

### **2 FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO**

1999 - 2000 Mestrado em Biologia Celular e Molecular.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Rio Grande do Sul, Brasil.

Título: Caracterização de isolados clínicos e ambientais de *Cryptococcus neoformans* no estado do Rio Grande do Sul. Ano de obtenção: 2000.

Orientador: Marilene Henning Vainstein.

1988 - 1989 Especialização em Administração Hospitalar. (Carga horária: 360h)

Universidade de Santa Cruz do Sul, UNISC, Rio Grande do Sul, Brasil.

1980 - 1985 Graduação em Farmácia e Bioquímica.

Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Rio Grande do Sul, Brasil.

2002 Doutorado em Biologia Celular e Molecular.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Rio Grande do Sul, Brasil.

Título: Avaliação da resposta imune humoral humana frente a proteínas da levedura *Cryptococcus neoformans*.

Orientador: Marilene Henning Vainstein.

### **3 ATUAÇÃO PROFISSIONAL**

Universidade de Santa Cruz do Sul - UNISC

#### **Vínculo institucional**

1991 - Atual Vínculo: Celetista, Enquadramento funcional: Professor assistente, Carga horária: 20.

#### **Atividades**

01/2001 - 12/2001

#### **Disciplinas ministradas**

1. Métodos Diagnósticos em Microbiologia.

2. Seminários em Microbiologia Clínica.

01/2005 - Atual

**Participação em projeto**

1. Prevalência de anticorpos frente ao vírus da hepatite C.

01/2002 - Atual

**Participação em projeto**

1. Epidemiologia de *Cryptococcus neoformans*.

01/2001 - Atual

**Disciplinas ministradas**

1. Microbiologia.

2. Bioquímica.

01/2001 - Atual

**Disciplinas ministradas**

1. Bioquímica.

2. Microbiologia.

01/2000 - Atual

**Participação em projeto**

1. Prevalência e perfil de suscetibilidade de microrganismos uropatogênicos.

01/1999 - Atual

**Disciplinas ministradas**

1. Bioquímica.

2. Microbiologia.

01/1998 - Atual

**Disciplinas ministradas**

1. Bioquímica.

2. Microbiologia.

01/1991 - Atual

**Disciplinas ministradas**

1. Bioquímica.

2. Microbiologia.

**4 PROJETOS DE PESQUISA**

2005 - Atual Prevalência de anticorpos frente ao vírus da hepatite C.

Descrição: Análise da prevalência de anticorpos frente ao vírus da hepatite C em amostras ambulatoriais no Vale do Rio Pardo.

Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Graduação(1).

Integrantes: Jorge André Horta (Responsável); Alexandre Rieger; Fernando Ferrugem.

2002 - Atual Epidemiologia de *Cryptococcus neoformans*.

Descrição: Epidemiologia molecular e avaliação da sensibilidade aos antifúngicos de isolados clínicos e ambientais de *C. neoformans*.

Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Graduação(1).

Integrantes: Jorge André Horta (Responsável); Alexandre Rieger; Fernando Ferrugem.

2000 - Atual Prevalência e perfil de suscetibilidade de microrganismos uropatogênicos.

Descrição: Análise da prevalência de microrganismos uropatogênicos e determinação da suscetibilidade frente aos antimicrobianos.

Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Graduação(1).

Integrantes: Jorge André Horta (Responsável); Alexandre Rieger; Fernando Ferrugem.

## 5 ÁREAS DE ATUAÇÃO

1 Microbiologia, Microbiologia Médica.

## 6 IDIOMAS

Compreende: Espanhol (Razoavelmente), Inglês (Bem).

Fala: Espanhol (Razoavelmente), Inglês (Razoavelmente).

Lê: Espanhol (Razoavelmente), Inglês (Bem).

Escreve: Espanhol (Razoavelmente), Inglês (Bem).

## 7 PRODUÇÃO CIENTÍFICA, TECNOLÓGICA E ARTÍSTICA/CULTURAL

### 7.1 PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 7.1.1 Resumos simples em anais de eventos

OLIVEIRA, Caio Fernando de; BENDER, Eduardo André; SALLA, A.; RIEGER, Alexandre; HORTA, Jorge André; ALVES, Sydney Hartz. Detecção de microrganismos produtores de beta-lactamases de espectro-estendido em amostras clínicas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 2005, Santos. **XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia**. 2005. p. 161-161.

GOETZE, Marcia; OLIVEIRA, Caio Fernando de; RIEGER, Alexandre; HORTA, Jorge André; ALVES, Sydney Hartz; VAINSTEIN, Marilene Henning. Epidemiologia e caracterização de linhagens ambientais de *Cryptococcus neoformans*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 2005, Santos. **XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia**. 2005. p. 287-287.

BENDER, Eduardo André; FERRUGEM, Fernando; OLIVEIRA, Caio Fernando de; COLOMÉ, Leticia M.; HORTA, Jorge André. Epidemiologia, Diagnóstico e Tratamento da Infecção por *Helicobacter pylori*. In: XXXII CONGRESSO BRASILEIRO DE ANÁLISES CLÍNICAS, 2005, Goiânia. **XXXII Congresso Brasileiro de Análises Clínicas**. 2005. v. 37, p. 41B-41B.

HORTA, Jorge André; RIEGER, Alexandre; FERRUGEM, Fernando; BENDER, Eduardo André; OLIVEIRA, Caio Fernando de; FERREIRA, Carlos Alexandre Sanchez. Prevalência de Anticorpos Anti-HCV em Amostras de Pacientes Ambulatoriais na Região de Santa Cruz do Sul- RS. In: XXXII CONGRESSO BRASILEIRO DE ANÁLISES CLÍNICAS, 2005, Goiânia. **XXXII Congresso Brasileiro de Análises Clínicas**. 2005. v. 37, p. 29B-29B.

HORTA, Jorge André; FERRUGEM, Fernando; SCHUSTER, Ana Paula; OLIVEIRA, Caio Fernando de; BENDER, Eduardo André; RIEGER, Alexandre. Prevalência de microrganismos e perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de uroculturas na região de Santa Cruz do Sul, RS. In: 32 CONGRESSO BRASILEIRO DE ANÁLISES CLÍNICAS, 2005, Goiânia. **XXXII Congresso Brasileiro de Análises Clínicas**. 2005. v. 37, p. 37B-37B.

FANFA, Michele de Souza; GOETZE, Marcia; HORTA, Jorge André; PUTZKE, Jair; RIEGER, Alexandre. Epidemiologia e Caracterização de Linhagens Ambientais de *Cryptococcus neoformans* na Região de Santa Cruz do Sul, RS. In: X SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E IX JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO., 2004, Santa Cruz do Sul. **X Seminário de Iniciação Científica e IX Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão, UNISC - Santa Cruz do Sul, RS.** 2004.

SOUZA, Francisco Vasconcelos; FERRUGEM, Fernando; VALIM, Andréia Rosane de Moura; HORTA, Jorge André. Prevalência de hiperuricemia em pacientes ambulatoriais na região de Santa Cruz do Sul - Rio Grande do Sul. In: XXXI CONGRESSO BRASILEIRO DE ANÁLISES CLÍNICAS, 2004, Salvador. **Temas Livres do XXXI Congresso Brasileiro de Análises Clínicas.** 2004. v. 36, p. 16 B-16 B.

FERRUGEM, Fernando; SOUZA, Francisco Vasconcelos; MENCHEN, Andréia Elisa; OLIVEIRA, Caio Fernando de; BENDER, Eduardo André; SCHUSTER, Ana Paula; RIEGER, Alexandre; HORTA, Jorge André. Prevalência de microrganismos e perfil de sensibilidade em amostras de uroculturas ambulatoriais na região de Santa Cruz do Sul - Rio Grande do Sul. In: XXXI CONGRESSO BRASILEIRO DE ANÁLISES CLÍNICAS, 2004, Salvador. **Temas Livres do XXXI Congresso Brasileiro de Análises Clínicas.** 2004. v. 36, p. 61 B-61 B.5

HORTA, Jorge André; ABEGG, Maxwell A; CELLA, Fabiana C; VAINSTEIN, Marilene Henning. Avaliação da resposta imune humoral frente à proteínas da levedura *Cryptococcus neoformans*. In: XXX CONGRESSO BRASILEIRO DE ANÁLISES CLÍNICAS E III CONGRESSO BRASILEIRO DE CITOLOGIA CLÍNICA, 2003, Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Análises Clínicas.** 2003. v. 35, p. 36B-36B.

HORTA, Jorge André; CELLA, Fabiana C; ABEGG, Maxwell A; VAINSTEIN, Marilene Henning; SCHRANK, Augusto. Isolamento e Caracterização de *Cryptococcus neoformans* a partir de amostras fecais de aves no RS. In: XXX CONGRESSO BRASILEIRO DE ANÁLISES CLÍNICAS E III CONGRESSO BRASILEIRO DE CITOLOGIA CLÍNICA, 2003, Rio de Janeiro. **Temas livres do XXX Congresso Brasileiro de Análises Clínicas.** 2003. v. 35, p. 36B-36B.

MENCHEN, Andréia Elisa; THOMASI, Henrique; RIEGER, Alexandre; HORTA, Jorge André. Perfil sorológico de anticorpos Anti-toxoplasma gondii em pacientes ambulatoriais na região de Santa Cruz do Sul, RS. In: XXX CONGRESSO BRASILEIRO DE ANÁLISES CLÍNICAS E III CONGRESSO BRASILEIRO DE CITOLOGIA CLÍNICA, 2003, Rio de Janeiro. **Temas livres do XXX Congresso Brasileiro de Análises Clínicas.** 2003. v. 35, p. 36B-36B.

MACHADO, Adriana A; HORTA, Jorge André; RIEGER, Alexandre. Prevalência de casos de HPV no município de São Leopoldo, RS. In: XXX CONGRESSO BRASILEIRO DE ANÁLISES CLÍNICAS E III CONGRESSO BRASILEIRO DE CITOLOGIA CLÍNICA, 2003, Rio de Janeiro. **Temas Livres do XXX Congresso Brasileiro de Análises Clínicas.** 2003. v. 35, p. 13B-13B.

RIEGER, Alexandre; HORTA, Jorge André. Prevalência de patógenos bacterianos e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos em uroculturas de amostras comunitárias. In: XXX CONGRESSO BRASILEIRO DE ANÁLISES CLÍNICAS E III CONGRESSO BRASILEIRO DE CITOLOGIA CLÍNICA, 2003, Rio

de Janeiro. **Temas Livres do XXX Congresso Brasileiro de Análises Clínicas.** 2003. v. 35, p. 37B-37B.

SCHUSTER, Ana Paula; RIEGER, Alexandre; HORTA, Jorge André. Prevalência de Patógenos Bacterianos e Perfil de Sensibilidade aos Antimicrobianos em Uroculturas de Amostras Comunitárias. In: XXII CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 2003, Florianópolis. **XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia.** 2003.

HORTA, Jorge André; RIEGER, Alexandre; KÖCHE, Andréia. Prevalência e caracterização de isolados de origem ambulatorial produtores de Beta-Lactamase de Espectro Estendido (ESBL) na região de Santa Cruz do Sul, RS. In: XXX CONGRESSO BRASILEIRO DE ANÁLISES CLÍNICAS E III CONGRESSO BRASILEIRO DE CITOLOGIA CLÍNICA, 2003, Rio de Janeiro. **Temas Livres do XXX Congresso**

**Brasileiro de Análises Clínicas.** 2003. v. 35, p. 36B-36B.

MANS, Delci C; RIEGER, Alexandre; HORTA, Jorge André. Um estudo retrospectivo da meningite no Vale do Rio Pardo, RS no período de 1995 a 2001. In: XXX CONGRESSO BRASILEIRO DE ANÁLISES CLÍNICAS E III CONGRESSO BRASILEIRO DE CITOLOGIA CLÍNICA, 2003, Rio de Janeiro. **Temas Livres do XXX Congresso Brasileiro de Análises Clínicas.** 2003. v. 35, p. 48B-48B.

HORTA, Jorge André; STAATS, Charley C.; CASALI, Agnes K.; RIBEIRO, Angela M.; SCHRANK, Irene S.; SCHRANK, Augusto; VAINSTEIN, Marilene H. *Cryptococcus neoformans*: caracterização epidemiológica no Rio Grande do Sul. In: 46 CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 2000, Águas de Lindóia - São Paulo -. **Genetics and Molecular Biology.** 2000. v. 23, p. 319-319.

HORTA, Jorge André; CASALI, Agnes Kiesling; STAATS, Charley Christian; RIBEIRO, Angela Medeiros; SCHRANK, Irene S.; SCHRANK, Augusto; VAINSTEIN, Marilene Henning. Determinação de sorotipos de *Cryptococcus neoformans*, isolados no estado do Rio Grande do Sul, por técnicas moleculares. In: 46 CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 2000, Águas de Lindóia - São Paulo -. **Genetics and Molecular Biology.** 2000. v. 23, p. 325-325.

6

HORTA, Jorge André; STAATS, Charley C.; CASALI, Agnes K.; SCHRANK, Irene S.; SCHRANK, Augusto; VAINSTEIN, Marilene Henning. Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* in Rio Grande do Sul: Analysis of clinical and environmental isolates. In: 45 CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 1999, Gramado. **Genetics and Molecular Biology.** 1999. v. 22, p. 408-408.

### 7.1.2 Artigos completos publicados em periódicos

ALVES, Sydney Hartz; HORTA, Jorge André; MILÁN, Eveline P.; SCHEID, Liliane A.; VAINSTEIN, Marilene H.; SANTURIO, Janio M.; COLOMBO, Arnaldo L. Carbohydrate Assimilation Profiles of Brazilian *Candida dubliniensis* Isolates Based on ID 32C System. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 47(2), p. 109-111, 2005.

HORTA, Jorge André; FAGANELLO, Josiane; SILVA, Livia K Rosa E; OLIVEIRA, Loiva T.; SANTURIO, Janio M.; VAINSTEIN, Marilene Henning; ALVES, Sydney Hartz. Susceptibility to heat and antifungal agents of *Cryptococcus neoformans* (serotype D) isolated from *Eucalyptus* spp. in Rio Grande do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, n. 01, p. 01-06, 2005.

HORTA, Jorge André; CASALI, Agnes K.; RIBEIRO, Angela M.; SCHRANK, Augusto; STAATS, Charley C.; SCHRANK, Irene S.; VAINSTEIN, Marilene H. Epidemiological aspects of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. **Medical Mycology**, Grã-Bretanha, v. 40, p. 567-571, 2002.

## 7.2 ORIENTAÇÕES CONCLUÍDAS

### 7.2.1 Graduação

OSAIDA, Solange Maria. **Epidemiologia da Hepatite B**. 2005. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade de Santa Cruz do Sul. Orientador: Jorge André Horta.

WILLRICH, Júlia. **HEPATITE C: um estudo soroepidemiológico**. 2005. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade de Santa Cruz do Sul. Orientador: Jorge André Horta.

DOTTO, Ivana da Silva. **Perfil de Suscetibilidade aos antimicrobianos de cepas uropatogênicas de *Escherichia coli***. 2005. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade de Santa Cruz do Sul. Orientador: Jorge André Horta.

CELLA, Fabiana Lucila. ***Cryptococcus neoformans* - um estudo soroepidemiológico**. 2004. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Orientador: Jorge André Horta.

MENCHEN, Andrea Elisa. **Marcadores para diagnóstico de doenças autoimunes: lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatóide**. 2004. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade de Santa Cruz do Sul. Orientador: Jorge André Horta.

ZAMBELLI, Felipe Cardoso. **Prevalência de Anticorpos de Classe IgG Frente a Proteínas da Levedura *Cryptococcus neoformans***. 2004. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Orientador: Jorge André Horta.

THOMASI, Henrique. **Prevalência e caracterização de uropatógenos em amostras ambulatoriais na região de Santa Cruz do Sul - RS**. 2004. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade de Santa Cruz do Sul. Orientador: Jorge André Horta.

## 8 DADOS COMPLEMENTARES

### 8.1 PARTICIPAÇÃO EM BANCAS EXAMINADORAS

#### 8.1.1 Trabalhos de Conclusão de Curso de Graduação

VALIM, Andréia Rosane de Moura; HORTA, Jorge André. Participação em banca de Maico Herath. **Avaliação da função renal e hepática em idosos usuários crônicos de medicamentos.** 2006. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade de Santa Cruz do Sul.

CARNEIRO, Marcelo; HORTA, Jorge André; BENITEZ, Lisianne Brittes. Participação em banca de Deise Neis Bueno. **Perfil de Sensibilidade de Acinetobacter baumannii isolados de pacientes com pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV): uma abordagem sobre antimicrobianos e resistência bacteriana.** 2006. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade de Santa Cruz do Sul.

VALIM, Andréia Rosane de Moura; HORTA, Jorge André. Participação em banca de Jussara Moreira. **A influência da Eritropoetina nos parâmetros bioquímicos e na qualidade de vida de pacientes com insuficiência renal crônica.** 2005. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade de Santa Cruz do Sul.

HORTA, Jorge André; MÜLLER, Maria Viviane Gomes; CORBELLINI, Valeriano Antonio. Participação em banca de Francisco de Vasconcelos Souza. **Aplicação de 2-(2'-Hidroxifenil) Benzoxazolas nitrossubstituídas como pró-farmacos com atividade citotóxica ativados por nitrorredutases de Escherichia coli.** 2005. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade de Santa Cruz do Sul.

MACHADO, Ediberto Oliveira; HORTA, Jorge André. Participação em banca de Fernanda Raquel da Rosa. **Atenção farmacêutica à paciente portador de Lúpus eritematoso sistêmico.** 2005. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade de Santa Cruz do Sul.

RIEGER, Alexandre; HORTA, Jorge André. Participação em banca de Andressa Huwe Reis. **Células Tronco: aspectos potenciais aplicados na terapia celular.** 2005. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade de Santa Cruz do Sul.

BENDER, Eduardo André; RIEGER, Alexandre; HORTA, Jorge André. Participação em banca de Solange Maria Osaida. **Epidemiologia da Hepatite B.** 2005. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade de Santa Cruz do Sul.

RIEGER, Alexandre; BENDER, Eduardo André; HORTA, Jorge André. Participação em banca de Júlia Willrich. **HEPATITE C: um estudo soroepidemiológico.** 2005. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade de Santa Cruz do Sul.

BOESSIO, Daniel; HORTA, Jorge André; RIEGER, Alexandre. Participação em banca de Thais Nunes Coirolo. **Investigação dos Aspectos Epidemiológicos e Terapêuticos do Transtorno de Pânico.** 2005. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade de Santa Cruz do Sul.

BENDER, Eduardo André; RIEGER, Alexandre; HORTA, Jorge André. Participação em banca de Ivana da Silva Dotto. **Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de cepas uropatogênicas de Escherichia coli.** 2005. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade de Santa Cruz do Sul.

MACHADO, Ediberto Oliveira; HORTA, Jorge André; CLASSEN, João. Participação em banca de Ricardo Bersch. **Atenção Farmacêutica na Diabete Mellitus tipo 2 no Distrito de Monte Alverne, Município de Santa Cruz do Sul.** 2004. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade de Santa Cruz do Sul.

HORTA, Jorge André; MACHADO, Ediberto Oliveira; OLIVEIRA, Mari Silvia de. Participação em banca de Eduardo Reginaldo Saueressig. **Atenção farmacêutica na prevenção da hipertensão arterial na farmácia Agafarma de Santa Cruz do Sul.** 2004. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade de Santa Cruz do Sul.

HORTA, Jorge André; VALIM, Andréia Rosane de Moura; MACHADO, Ediberto Oliveira. Participação em banca de Rafael Granada Limberger. **Atenção Farmacêutica no método contraceptivo de emergência.** 2004. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade de Santa Cruz do Sul.

HORTA, Jorge André; VALIM, Andréia Rosane de Moura; BENDER, Eduardo André. Participação em banca de Andrea Elisa Menchen. **Marcadores para diagnóstico de doenças autoimunes: lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatóide.** 2004. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade de Santa Cruz do Sul.

HORTA, Jorge André; MACHADO, Ediberto Oliveira; BENITEZ, Lisianne Brittes. Participação em banca de Mauro Noé Krug. **O Farmacêutico na farmácia pública do município de Santa Cruz do Sul - RS, Brasil.** 2004. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade de Santa Cruz do Sul.

HORTA, Jorge André; RIEGER, Alexandre; BENDER, Eduardo André. Participação em banca de Henrique Tomasi. **Prevalência e caracterização de uropatógenos em amostras ambulatoriais na região de Santa Cruz do Sul - RS.** 2004. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade de Santa Cruz do Sul.

## 8.2 PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS

1 **XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia.** 2003. (Participação em eventos/Congresso).

2 **XXX Congresso Brasileiro de Análises Clínicas e III Congresso Brasileiro de Citologia Clínica.**

2003. (Participação em eventos/Congresso).

## 9 INDICADORES DE PRODUÇÃO

Produção bibliográfica

Artigos publicados em periódicos - 3

Completos - 3

Trabalhos em eventos - 19

Resumos - 19

Orientações concluídas

Graduação - 7

Dados complementares

Participação em bancas examinadoras - 16



Participação em eventos - 2

**ANEXO 2**  
**Produção Intelectual complementar**

**SUSCEPTIBILITY TO HEAT AND ANTIFUNGAL AGENTS OF *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* VAR. *NEOFORMANS* (SEROTYPE D) ISOLATED FROM *EUCALYPTUS* SPP IN RIO GRANDE DO SUL, BRAZIL**

Jorge A. Horta<sup>1</sup>; Josiane Faganello<sup>1</sup>; Livia K. Rosa e Silva<sup>1</sup>; Loiva T. Oliveira<sup>2</sup>; Jânio M. Santurio<sup>2</sup>; Marilene H. Vainstein<sup>1</sup>; Sydney Hartz Alves<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Centro de Biotecnologia, Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil; <sup>2</sup>Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Laboratório de Pesquisas Micológicas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil

Submitted: August 25, 2003; Returned to authors for corrections: July 07, 2004; Approved: March 28, 2005

**ABSTRACT**

In this work we studied the susceptibility to heat and antifungal agents of the first strains of environmental *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotype D) isolated in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. In order to achieve a rigorous analysis, we employed the methodology recommended by NCCLS, Yeast Nitrogen Base (YNB) proposed by Ghannoum *et al* (YNB-1), Antibiotic medium 3 (AM3) indicated by others, YNB adjusted to the NCCLS methodology (YNB-2) and Etest. Our results indicate that all strains were susceptible to amphotericin B (0.0625–0.5 µg/mL), fluconazole (0.125–8.0 µg/mL), itraconazole (0.031–0.25 µg/mL) and flucytosine (0.125–4.0 µg/mL). The *C. neoformans* serotype D strains were more susceptible to heat (47°C / 30 min) than *C. neoformans* serotype A.

**Key words:** *Cryptococcus neoformans*, heat susceptibility, antifungal agents

**INTRODUCTION**

*Cryptococcus neoformans*, an encapsulated yeast, is the etiological agent of human cryptococcosis. In Brazil, 4.5% of all opportunistic infections in AIDS patients have been reported as being caused by *C. neoformans* (23). Based on physiological and serological differences, *C. neoformans* had been divided in two varieties: *C. neoformans* var. *neoformans* (serotypes A, D, AD) and *C. neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C). On the basis of genetic differences it was proposed that *C. neoformans* var. *neoformans* be further subdivided in two varieties: *C. neoformans* var. *grubii* (serotype A) and *C. neoformans* var. *neoformans* (serotype D) (12).

The prevalence of the varieties and serotypes from either clinical or environmental sites differs in accordance with geographical localization. Environmental isolates of *C. neoformans* var. *grubii* from pigeons droppings indicate that

serotype A is more common than serotype D in all nations, except Italy, Denmark and Switzerland (8) and have been recovered from approximately 99% of all patients in most countries (6,8,12). The serotype C is rarer than the other serotypes and has never been isolated from the environment. The majority of the few clinical isolates of serotype C have been found in southern California (8). The serotype B was initially isolated from *Eucalyptus camaldulensis* and *E. tereticornis* in Australia and more recently it has been isolated from other trees and immunocompromised (non-AIDS) patients in tropical and subtropical areas (8). In Rio Grande do Sul, *C. neoformans* var. *grubii* (serotype A) has been recovered from AIDS patients and pigeons excreta (1,6,14). The prevalence of *C. neoformans* var. *neoformans* (serotype D) among clinical isolates has ranged from 0 to 100% depending on the region of the world. In Brazil, the prevalence of serotype D is very low (29), and in the state of Rio Grande do Sul there were no

\*Corresponding Author. Mailing address: Departamento de Microbiologia e Parasitologia, CCS, Universidade Federal de Santa Maria. 97119-000. Santa Maria, RS, Brasil. Telefax: (+5555)220-8906. E-mail: hartzsa@ccs.ufsm.br

records of clinical *C. neoformans* var. *neoformans* (serotype D) isolates.

Recently Ribeiro (28) isolated nine *C. neoformans* var. *neoformans* (serotype D) strains from 99 samples of *Eucalyptus* spp. As pointed out by Martinez *et al.* (21), the thermal sensibility of *C. neoformans* var. *neoformans* (serotype D) is a consistent explanation for the geographic differences between serotype A and D, and for the dermatotropism and rhinotropism observed. The purpose of this investigation was to assess the susceptibility of the first environmental *C. neoformans* var. *neoformans* (serotype D) isolates in Rio Grande do Sul, to heat and to a panel of antifungal agents commonly used in the treatment of infections. Because results of susceptibility tests based on M27-A2 methodology have been questioned due to factors such as suboptimal growth in RPMI 1640 medium and narrow amphotericin B MIC ranges (15,20), we decided to compare amphotericin B MICs obtained with RPMI 1640 medium to assays performed using Yeast Nitrogen Base proposed by Ghannoum *et al.* (YNB-1)(13), Antibiotic medium 3 (AM3) and Yeast Nitrogen Base supplemented medium adjusted to the M27-A2 methodology, which we named YNB-2 and the Etest method.

## MATERIALS AND METHODS

### Isolates

Porto Alegre, the capital city of the South Brazilian state Rio Grande do Sul is situated at 30° S latitude and 51° W longitude. The city is 10 m above the sea level with an average temperature of 22°C and an annual rainfall of 1118 mm. Ninety-nine samples were collected from different *Eucalyptus* species (Table 1). Twenty other environmental strains of *C. neoformans* serotype A, isolated from pigeon excreta from Porto Alegre, Santa Cruz

**Table 1.** Origin of the environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* (serotype D) isolated from *Eucalyptus* spp in Rio Grande do Sul, Brazil.

Location	Number of samples collected	Number of samples identified as <i>C. neoformans</i>
Barra do Ribeiro	53	0
Camaquã	8	0
Ijuí	3	0
Novo Hamburgo	2	2
Porto Alegre	7	5
São Leopoldo	2	2
São Lourenço do Sul	4	0
Sertão Santana	7	0
Soledade	3	0
Total	99	9

do Sul and Santa Maria (14), were also included in the analysis of heat susceptibility. All isolates were identified as *C. neoformans* by positive Niger seed agar response, as well as urease test, ability to grow at 35°C and a negative nitrogen test. The profiles of carbon compound assimilation were also determined (4). Canavanine-glycine-bromothymol blue agar medium, assimilation of D-proline and D-tryptophan were used for differentiation of the two varieties (9) and serotyping was performed by a slide agglutination test (Crypto Check; Iatron Co; Japan).

### Susceptibility to heat (21)

A 1-ml aliquot of cells suspended at a density of 10<sup>4</sup> cells per ml in distilled water was incubated at 47°C in water bath during 30 min. After incubation 20 µL of the cells suspension was plated onto Sabouraud dextrose agar and incubated for 48h at 30°C. The survival percentage was determined by comparison to non-heat-treated control samples plated onto Sabouraud dextrose agar.

### Antifungal susceptibility tests

The antifungal agents used were amphotericin B (Sigma), fluconazole (Pfizer), itraconazole (Jansen) and flucytosine (Sigma).

Test media were: RPMI 1640 (American Biorganics Inc.), indicated by the National Committee for Laboratory Standards (NCCLS) as reference, and Yeast Nitrogen base (Difco) were prepared according to manufacturer instructions. After reconstitution, both media were supplemented with glucose to obtain a final concentration of 0.5% in YNB (13) and 2% in RPMI 1640 (24). Both RPMI 1640 medium and YNB were buffered to pH 7.0 with 3-(N-morpholino) propanesulphonic acid (MOPS; Sigma, St. Louis, Mo, USA) to a final concentration of 165mM (NCCLS). Antibiotic medium 3 (AM3) (BBL) was supplemented with glucose to a final concentration of 2%; the buffering capacity was increased by adding 1g of dipotassium monophosphate per liter and 1g of monopotassium monophosphate per liter and pH was adjusted to 7.0 with NaOH (20). All three media were filter sterilized by using 0.22-µm membrane (Millipore).

The MICs of the tested agents were determined for each isolate in accordance with National Committee Laboratory Standards (NCCLS) macrodilution guidelines (24). The tubes were incubated at 35°C and were read after 48h of incubation. The MIC of amphotericin B in RPMI 1640, YNB and AM3 was defined as the lowest concentration of drug that resulted in complete inhibition of visible growth. The tests were performed using two techniques with YNB: YNB-1 as indicated by Ghannoum *et al.* (13) and YNB-2 which use the same broth, but using the M27-A2 method (NCCLS). The MIC of azoles and flucytosine in RPMI 1640 were determined according to M27-A method (24). The data were reported as MIC ranges and MICs at which 50% and 90% of these isolates were inhibited. Quality

Susceptibility of *C. neoformans* to heat and antifungal agents

control testing was performed in accordance with NCCLS document M27-A2. *Candida krusei* ATCC 6258 and *Candida parapsilosis* ATCC 22019 (24) were used as quality control for the susceptibility tests.

**Etest**

To prepare the agar plates, the double-strength, filter-sterilized RPMI 1640 with 2% glucose was buffered with potassium phosphate at pH 7.0 and combined with an equal volume of heat-sterilized double-strength agar to yield the correct final concentration of medium in a 1.5% agar gel. The inoculum suspensions of *C. neoformans* strains matching the turbidity of McFarland #1 standard were swabbed onto the surface of the agar plate and allowed to dry for 15 min before the addition of the Etest strip (22). One Etest antimicrobial gradient strip was placed in each Petri dish. The plates were incubated for 48 and 72h, and the MIC was the point at which the zone of complete inhibition intersected the strip. Etest antimicrobial gradient (AB Biodisk, Solna, Sweden) strips containing amphotericin B, fluconazole, itraconazole and flucytosine were employed (32).

**RESULTS**

All isolates of *C. neoformans* var. *neoformans* (serotype D) grew well in RPMI 1640 broth, YNB-1, YNB-2, Antibiotic medium 3 and RPMI-1640 agar, allowing MICs to be determined after 72h incubation.

Table 2 summarizes the *in vitro* susceptibilities of the nine cultures tested by NCCLS method. The results are reported as MIC ranges, MIC<sub>50s</sub> (50% of strains were inhibited) and MIC<sub>90s</sub> (90% of strains were inhibited). A broad range of MICs was observed with fluconazole and flucytosine; more narrow MIC ranges were showed with amphotericin B and itraconazole. Table 3 summarizes the *in vitro* susceptibilities of the isolates to amphotericin B, as determined by NCCLS recommended medium, and other media suggested in the literature. All media

**Table 2.** Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* serotype D to antifungal agents using the M27-A2 method.

Antifungal Agents	MIC <sup>a</sup> (µg/ml)			
	Range	50 %	90 %	GeoM <sup>b</sup>
Amphotericin B	0.0625-0.5	0.125	0.255	0.145
Fluconazole	0.125-8.0	1.0	4.0	1.46
Itraconazole	0.031-0.25	0.125	0.125	0.099
Flucytosine	0.125-4.0	0.5	2.0	0.793

<sup>a</sup>MICs for 50% and 90% of isolates tested; <sup>b</sup>geometric mean.

*C. krusei* ATCC 6258 and *C. parapsilosis* ATCC 22019 were used as quality control.

employed showed similar MIC ranges, but YNB-1 showed slightly higher results. The MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> were the same for RPMI-1640, AM3 and YNB-2, but again higher for YNB-1. Based on the M27-A2 technique breakpoints, all the isolates were considered to be sensitive to the antifungal agents tested.

The MICs obtained by Etest are shown on Table 4. Itraconazole MICs are narrower in range, but amphotericin B, fluconazole and flucytosine had broad range of MICs. Based on MIC<sub>50%</sub> or MIC<sub>90%</sub>, all the isolates were considered to be sensitive to the antifungal agents tested.

Among the 9 serotype D strains tested, 5 (55.5%) did not survive heat treatment and 4 (44.5%) showed percent survival varying between 22 and 76% when compared to the number of colonies in an equivalent suspension of cells not exposed to heat. When the 20 serotype A strains were assayed, only 3 (15%) did not grow on Sabouraud Dextrose agar after the thermal treatment; the range of percent survival was from 16 to 86%. The average percent survival of serotype D was 23.2%, while for serotype A it was 48%.

**Table 3.** Comparison of *in vitro* susceptibility of *Cryptococcus neoformans* serotype D strains to amphotericin B using in different media and assay types.

Assay types <sup>a</sup>	MIC <sup>a</sup> (µg/ml)			
	Range	50 % <sup>b</sup>	90 % <sup>c</sup>	GeoM <sup>b</sup>
RPMI	0.0625-0.5	0.125	0.25	0.134
AM3	0.0625-0.5	0.125	0.25	0.156
YNB-1	0.125-1.0	0.25	0.5	0.269
YNB-2	0.0625-0.5	0.125	0.25	0.170
E-test	0.0625-0.5	0.125	0.5	0.157

<sup>a</sup>See text for details; <sup>b</sup>50% and <sup>c</sup>90%, MICs for 50% and 90% of isolates tested, respectively; <sup>d</sup>GeoM; geometric mean.

**Table 4.** Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* serotype D isolates to antifungal agents determined by using the Etest method.

Antifungal Agents	MIC <sup>a</sup> (µg/ml)			
	Range	50 %	90 %	GeoM <sup>b</sup>
Amphotericin B	0.0625-0.5	0.125	0.5	0.157
Fluconazole	0.25-8.0	2.0	4.0	1.851
Itraconazole	0.031-0.25	0.125	0.25	0.157
Flucytosine	0.125-4.0	1.0	2.0	0.857

<sup>a</sup>See text for details; <sup>b</sup>50% and <sup>c</sup>90%, MICs for 50% and 90% of isolates tested, respectively; <sup>d</sup>GeoM; geometric mean.



## DISCUSSION

An understanding of the epidemiology of cryptococcosis may provide a rational framework for the design of prevention guidelines and more effective therapies. We believe that attempts to correlate specific environmental exposures to cryptococcal strains of known susceptibility profile may help to address some questions (14).

Based on these epidemiological statements, it is important to emphasize that cryptococcosis therapy may become even more difficult due the emergence of antifungal resistance. Amphotericin B (17,19), fluconazole (3,25,26,27), and flucytosine resistance have been well documented (30). Cross-resistance to both azole-types and amphotericin B has also been described (16).

In addition, recent articles reporting primary (intrinsic) resistance of *C. neoformans* var. *neoformans* (serotype D) to flucytosine (18) and, the isolation of fluconazole-resistant *C. neoformans* from an immunocompetent patient, without prior exposure to azoles (25), emphasizes the importance of carrying out susceptibility tests before beginning of therapy. This study reports the susceptibility testing of the first *C. neoformans* serotype D isolated from *Eucalyptus* spp. trees in Rio Grande do Sul state, employing additional methods for more accurate delineation of susceptibility profiles to antifungal agents.

The results of susceptibility tests to antifungal agents reported here are similar to those reported by others authors (7,15). However, some aspects deserve attention. In 2001, we have compared the susceptibility of clinical and environmental *C. neoformans* isolated in southern Brazil and observed that clinical isolates were less susceptible to fluconazole than environmental isolates, all of them of serotype A (1). Here, environmental strains showed a very similar pattern for amphotericin B and azoles, being all strains sensitive. One of the reasons to the absence of azole resistance might be the source of strains, which may have not had previous contact with azoles. The contrary has been reported in Italy, where clinical serotype D is prevalent. Tortorano *et al.* (31) showed that serotype A clinical strains were less susceptible to fluconazole than serotype D clinical isolates. This issue may deserve more attention.

The reference M27-A2 method based on RPMI 1640 medium has been used to test *C. neoformans* isolates (1,2,10,20). In spite of this indication, some previous reports suggested that RPMI 1640 medium did not support suitable growth of *C. neoformans*. In the present study, we have found that this medium, supplemented with 2% glucose, provided adequate growth of all strains tested; glucose supplementation is an alternative mentioned in the M27-A2 method (24). Due to reported concerns regarding amphotericin B resistance, in this study we have tested Antibiotic medium 3 (AM3), as indicated by Lozano-Chiu *et al.* (20), Yeast Nitrogen Base, as recommended by Ghannoum *et al.* (13), and also the same medium with changes in inoculum size and endpoint determination (YNB-2). The results presented have

shown that the pattern of susceptibility to amphotericin B obtained with YNB-2, RPMI-1640 medium and AM3 was closely similar, with overlap of MIC ranges. YNB-1 resulted in a broader MIC range, though amphotericin B resistant strains were not detected. These results are similar to those already obtained from clinical strains of *C. neoformans* serotype A using the same media (2).

The MICs to flucytosine were low and so, based on established breakpoints, all strains were considered to be sensitive to this drug. This finding must be interpreted with caution, because approximately 2% of *C. neoformans* isolates are resistant to flucytosine prior to treatment (30). So, we must consider that the number of isolates studied was scarce, and DNA studies have shown that Brazilian *C. neoformans* isolates appeared to be less heterogenous than those isolated from other regions (11).

The Etest method performed on glucose-supplemented RPMI 1640 agar is an excellent method of discrimination between susceptible and resistant strains of *C. neoformans* (20,22,32). The susceptibility pattern obtained by Etest demonstrated a narrow range MICs to amphotericin B, and MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> one log dilution higher than the NCCLS method. For all antifungal agents studied, we have observed no significant changes on MICs by this method. This is in accordance with previous studies, that found complete or a high level of agreement between Etest and NCCLS method (5,22,32). The Etest has been considered an excellent method to distinguish amphotericin-B-resistant yeasts; it is reproducible, much simpler to set up than broth dilution methods and less labour-intensive. Thus, it has been recommended for routine use with amphotericin B and flucytosine (32).

Recently, Martinez *et al.* (21) analysed the heat susceptibility of 19 strains from each serotype group and observed a wide variation; *C. neoformans* serotype D strains being more susceptible. Our finds are in accordance with this study and corroborate what Dromer *et al.* (8) pointed out in that the differences in the prevalence of serotype A and D of *C. neoformans* may reflect climatic tolerances. The isolation of *C. neoformans* var. *neoformans* (serotype D) in Rio Grande do Sul (28), the southernmost and coolest state of Brazil, reflects the characteristics referred above, and might explain the rarity of this serotype in other areas of Brazil with sub-tropical and tropical climates. However, few studies were conducted and data are still scarce in this area (29).

## RESUMO

**Susceptibilidade de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D) isolados de *Eucalyptus* spp., no Rio Grande do Sul (Brasil), frente ao calor e a agentes antifúngicos**

Este estudo foi realizado com os primeiros isolados ambientais de *C. neoformans* sorotipo D, obtidos no Rio Grande

Susceptibility of *C. neoformans* to heat and antifungal agents

do Sul. Objetivando-se avaliar a susceptibilidade a agentes antifúngicos de forma mais rigorosa, utilizou-se a técnica de referência proposta pelo NCCLS, Caldo Yeast Nitrogen Base (YNB) proposto por Ghannoum *et al.*, Antibiotic medium 3, caldo YNB adequado à metodologia do NCCLS e o E-test. Os resultados indicaram que todos os isolados foram sensíveis à anfotericina B (0,0625–0,5 µg/mL), fluconazol (0,125–4,0 µg/mL), itraconazol (0,031–0,25 µg/mL) e fluorocitosina (0,125–4,0 µg/mL) através das técnicas empregadas. Nos testes de termotolerância (47°C/30 min), observou-se que as culturas de *C. neoformans* sorotipo D são mais sensíveis do que as de *C. neoformans* sorotipo A.

**Palavras-chave:** *Cryptococcus neoformans*, susceptibilidade, antifúngicos

## REFERENCES

- 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. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.*, 43(5), 267-270, 2001.
- Alves, S.H.; Oliveira, L.T.; Goulart, L.S.; Linares, C.E.B.; Griebeler, J.; Santurio, J.M. Different culture media applied to the study of *Cryptococcus neoformans* susceptibility to amphotericin B and fluconazole. *Braz. J. Microbiol.*, 33, 27-30, 2002.
- Armengou, A.; Pocar, C.; Mascaró, J.; Garcia-Bragado, F. Possible development of resistant to fluconazole during suppressive therapy for AIDS-associated cryptococcal meningitis. *Clin. Infect. Dis.*, 23(6), 1337-1338, 1996.
- Barnett, J.A.; Payne, R.W.; Yarrow, D. *Yeasts: Characteristics and Identification*, 2<sup>nd</sup> Ed. Cambridge University Press, Cambridge, 1990. p.282-320.
- Brandt, M.E.; Pfaller, M.A.; Hajjeh, R.A.; Hamill, R.J.; Pappas, P.G.; Reingold, A.L.; Rimland, D.; Warnock, D.W. Trends in antifungal drug susceptibility of *Cryptococcus neoformans* isolated in the United States: 1992 to 1994 and 1996 to 1998. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45(11), 3065-3069, 2001.
- Casali, A.K.; Goulart, L.; Rosa e Silva, L.K.; Ribeiro, A.M.; Amaral, A.A.; Alves, S.H.; Schrank, A.; Meyer, W.; Vainstein, M.H. Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. *FEMS Yeast Research.*, 3, 405-415, 2003.
- Davey, K.G.; Holmes, A.D.; Johnson, E.M.; Szekely, A.; Warnock, D.W. Comparative evaluation of Fungitest and broth microdilution methods for antifungal susceptibility testing of *Candida* species and *Cryptococcus neoformans*. *J. Clin. Microbiol.*, 36(4): 926-930, 1998.
- Dromer, F.; Mathatlin, S.; Dupont, B.; Letenneur, L.; Ronin, O.; The French Cryptococcosis Study Group. Individual and environmental factors associated with infection due to *Cryptococcus neoformans* serotype D. *Clin. Infect. Dis.*, 23, 91-96, 1996.
- Dufait, R.; Velho, R.; DeVroey, C. Rapid identification of the two varieties of *Cryptococcus neoformans* by D-proline assimilation. *Mykosen.*, 30, 483, 1987.
- Franzot, S.P.; Hamdan, J.S. In vitro susceptibilities of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* to five antifungal agents. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 40, 822-824, 1996.
- Franzot, S.P.; Hamdan, J.A.; Currie, B.P.; Casadevall, A. Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* in Brazil and the United States: evidence for both local genetic differences and a global population structure. *J. Clin. Microbiol.*, 35(9), 2243-2251, 1997.
- Franzot, S.P.; Salkin, I.F.; Casadevall, A. *Cryptococcus neoformans* var *grubii*: separate varietal status of *C. neoformans* serotypes A Isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 37, 838-840, 1999.
- Ghannoum, M.A.; Ibrahim, A.S.; Fu, Y.; Schafiq, M.; Edwards, J.E.; Criddle, R.S. Susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans*: a microdilution technique. *J. Clin. Microbiol.*, 30, 2881-2886, 1992.
- Horta, J.A.; Staats, C.C.; Casali, A.K.; Ribeiro, A.M.; Schrank, I.S.; Schrank, A.; Vainstein, M.H. Epidemiological aspects of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state of Rio Grande do Sul. *Med. Mycol.*, 40, 565-571, 2002.
- Jessup, C.J.; Pfaller, M.A.; Messer, S.A.; Zhang, J.; Tumberland, M.; Mbidde, E.K.; Ghannoum, M.A. Fluconazole susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans*: comparison of two broth microdilution methods and clinical correlates among isolates from Ugandan AIDS patients. *J. Clin. Microbiol.*, 36(10), 2874-2876, 1998.
- Joseph-Horne, T.; Hollomon, D.; Loeffler, R.S.T.; Kelly, S.L. Cross-resistance to polyene and azole drug in *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother.*, 39, 1526-1529, 1995.
- Joseph-Horne, T.; Loeffler, R.S.T.; Hollomon, D.W.; Kelly, S.L. Amphotericin B resistant isolates of *Cryptococcus neoformans* without alteration in sterol biosynthesis. *J. Med. Vet. Mycol.*, 34, 223-225, 1996.
- Kantarcioğlu, A.S.; Yucel, A. A flucytosine-resistant *Cryptococcus neoformans* (serotype D) strains isolated in Turkey from cutaneous lesions. *Med. Mycol.*, 40, 519-523, 2002.
- Kelly, S.L.; Lamb, D.C.; Taylor, M.; Corran, A.J.; Baldwin, B.C.; Powderly, W.G. Resistance to amphotericin B associated with defective sterol Δ 8.7 isomerase in a *Cryptococcus neoformans* strains from AIDS patients. *FEMS Microbiol. Lett.*, 122, 39-42, 1994.
- Lozano-Chiu, M.; Paetznick, V.L.; Ghannoum, M.A.; Rex, J.H. Detection of resistance to amphotericin B among *Cryptococcus neoformans* clinical isolates: performances of three different media assessed by using E-test and National Committee for Clinical Laboratory Standards M27-A methodologies. *J. Clin. Microbiol.*, 36 (10), 2817-2822, 1998.
- 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. *J. Clin. Microbiol.*, 39(9), 3365-3367, 2001.
- Maxwell, M.J.; Messer, S.A.; Hollis, R.J.; Diekema, D.J.; Pfaller, M.A. Evaluation of Etest method for determining voriconazole and amphotericin B MICs for 162 clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. *J. Clin. Microbiol.*, 41(1), 97-99, 2003.
- Ministério da Saúde. Programa nacional de doenças sexualmente transmissíveis, Brasília. *Brasil Bol. Epidemiol. AIDS.*, 1(1), 44, 1999.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard M27-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa. 2002.
- Orni-Wasserlauf, R.; Izhakov, E.; Siegmán-Igray, Y.; Bash, E.; Polacheck, I.; Giladi, M. Fluconazole-resistant *Cryptococcus neoformans* isolated from an immunocompromised patient without prior exposure to fluconazole. *Clin. Infect. Dis.*, 29, 11592-1593, 1999.
- Paugham, A.; Dupoy-Camet, J.; Blanche, P.; Gangneux, J.P.; Tourte-Schaefer, C.; Sicard, D. Increased fluconazole resistance of *Cryptococcus neoformans* isolated from a patient with AIDS and recurrent meningitis. *Clin. Infect. Dis.*, 19, 976-977, 1994.
- Peetermans, W.; Bobbaers, H.; Verhaegen, J.; Vandepitte, J. Fluconazole-resistant *Cryptococcus neoformans* var *gattii* in an AIDS patient. *Acta Clin. Belg.*, 48, 405-409, 1993.

J.A. Horta *et al.*

28. Ribeiro, A.M. *Isolamento e Caracterização de Cryptococcus neoformans* a partir de *Eucalyptus spp.* no Rio Grande do Sul. [Dissertação de Mestrado]. Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular; Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2002. p.67.
29. Rozembaum, R.A.; Gonçalves, A.J.R.; Wanke, B.; Caiuby, M.J.; Clemente, H.; Lazera, M.S.; Monteiro, P.C.F.; Londero, A.T. *Cryptococcus neoformans* varieties as agents of cryptococcosis in Brazil. *Mycopathologia*, 199, 133-136, 1992.
30. Scholer, H.J.; Polak, A. Resistance to systemic antifungal agents. In: Bryan, L.E.; ed. *Antimicrobial Drug Resistance*. Orlando, Academic Press, 1984, p.393-460.
31. Tortorano, A.M.; Viviani, M.A.; Rigoni, A.L.; Cogliati, M.; Roverseli A.; Pagano, A. Prevalence of serotype D in *Cryptococcus neoformans*: isolates from HIV positive and HIV negative patients in Italy *Mycoses.*, 40, 297-302, 1997.
32. Warnock, D.W.; Johnson, E.M.; Rogers, T.R.F.; and behalf of the BSAC Working Party on Antifungal Chemotherapy. *J. Antimicrob Chemother.*, 42, 321-331, 1998.



**ANEXO 2**  
**Produção Intelectual complementar**

## BRIEF COMMUNICATION

### CARBOHYDRATE ASSIMILATION PROFILES OF BRAZILIAN *Candida dubliniensis* ISOLATES BASED ON ID 32C SYSTEM

Sydney Hartz ALVES(1), Jorge A. HORTA(2), Eveline P. MILÁN(3), Liliame A. SCHEID(1), Marilene H. VAINSTEIN(2), Janio M. SANTURIO(1) & Arnaldo L. COLOMBO(4)

#### SUMMARY

The purpose of the present study was to evaluate the identification of 19 Brazilian *C. dubliniensis* based on the biochemical profile exhibited when tested by the commercial identification kit ID 32C (bioMérieux). Thirteen of the isolates were rigorously identified as *C. dubliniensis* and the remaining isolates (six) were considered as having a doubtful profile but the software also suggested that there was 83.6% of chances for them to be *C. dubliniensis*. As well as pointed by the literature the identification obtained by phenotypic tests should be considered presumptive for *C. dubliniensis* due to variability of this new species.

**KEYWORDS:** *Candida dubliniensis*; ID 32C; Phenotypic identification.

#### INTRODUCTION

*Candida dubliniensis* is a newly described species of *Candida*, which was first reported by SULLIVAN *et al.* in 1995<sup>21</sup>. Despite *C. dubliniensis* has been recovered from several body sites in many human populations, it is most often isolated from the oral cavities of patients infected with the Human Immunodeficiency Virus. This new yeast is found all over the world<sup>2,4,10,15,16,18,22</sup> and is similar to *C. albicans* in a number of ways including morphology and metabolism, being considered as an opportunistic yeast pathogen but also recognized as a minor constituent of the normal human oral microbial flora<sup>11,15</sup>.

A multicenter surveillance study conducted in Brazil by MILÁN *et al.*<sup>10</sup> showed a 2.8% prevalence rate of HIV-infected/AIDS adult patients harboring *C. dubliniensis* in their oral cavities. In contrast with patients from the north-hemisphere countries where this particular species may be recovered from 27% of asymptomatic HIV-positive patients and 32% of AIDS patients with oral candidiasis<sup>21</sup>, different studies from South America suggest that *C. dubliniensis* is more rarely found<sup>2,10,16,18</sup>.

*C. dubliniensis* is phylogenetically related to *C. albicans* and the distinction between *C. dubliniensis* and *C. albicans* remains a challenge for clinical microbiology laboratories. The importance of the correct identification seems to be meaningful for epidemiological proposals and therapeutic interventions. The majority of *C. dubliniensis* isolates show susceptibility to currently used antifungal drugs<sup>12</sup>, but it has been

demonstrated that they may rapidly develop a stable resistance to fluconazole upon *in vitro* exposure<sup>11</sup>.

Various phenotype screening tests have been used to discriminate those organisms, including the colony color on CHROMagar *Candida*, growth temperature test at 42/45 °C<sup>14</sup>, sugar assimilation tests and,  $\beta$ -glucosidase activity<sup>17,23</sup>. In addition, *C. dubliniensis* strains may be recognized by their ability to produce abundant chlamydoconidia often observed in triplets or in contiguous pairs<sup>21</sup>, to coaggregate *in vitro* with *Fusobacterium nucleatum*<sup>8</sup>, to produce rough colonies and chlamydoconidia on Staib agar<sup>20</sup> and also by its intolerance to 6.5% sodium chloride broth<sup>3</sup> and inability to produce an opacity halo at Tween 80 agar<sup>19</sup>. It is important to highlight that no single phenotype test has proven to be highly effective and the use of genotypic tests may be necessary for definitive identification purposes<sup>7,9,22</sup>. Considering that molecular methods are relatively time consuming and expensive there is a need for clinical laboratories to have phenotype tests as reliable as the carbohydrate assimilation profiles.

The present study was undertaken to evaluate the biochemical profile exhibited by nineteen Brazilian *C. dubliniensis* isolates formerly identified by genotyping methods, when tested by the commercial identification kit ID 32C (bioMérieux). This kit provides an evaluation for the assimilation of 30 carbon sources and for the growth of yeasts in the presence of cycloheximide. The assays were performed according to the manufacturer's instructions. It consists of 32 cupules, each containing a dehydrated carbohydrate substrate. A semi-solid,

(1) Departamento de Microbiologia e Parasitologia; Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil, phone/fax (55) 220-8906, hartzsa@ccs.ufsm.br

(2) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

(3) Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brasil.

(4) Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

Correspondence to: Sydney Hartz Alves, Rua Venâncio Aires 2766/403, 97010-004 Santa Maria, RS, Brazil.

ALVES, S.H.; HORTA, J.A.; MILÁN, E.P.; SCHEID, L.A.; VAINSTEIN, M.H.; SANTURIO, J.M. & COLOMBO, A.L. - Carbohydrate assimilation profiles of Brazilian *Candida dubliniensis* isolates based on ID 32C system. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 47(2):109-111, 2005.

**Table 1**  
Differences of carbohydrate assimilation profiles reported by using ID 32C system when testing 19 Brazilian *C. dubliniensis* strains

Substrates which showed discrepant assimilation	Number of isolates	Brazilian <i>C. dubliniensis</i> isolates (Cd)
Palatinose	7	Cd1 ; Cd2 ; Cd8 ; Cd9 ; Cd10 ; Cd14 ; Cd15
Trehalose	1	Cd5
2-keto-gluconate	2	Cd15 ; Cd19
DL-Lactate	1	Cd5
Galactose	1	Cd9
Sorbitol	1	Cd16
N-acetylglucosamine	1	Cd4

chemically defined, minimal medium was inoculated with a suspension of the yeast organism to be tested. After 24-48 hours of incubation, growth in each cupule was detected by visual reading. Identification was obtained using the identification software (bioMerieux).

After 48 h of incubation, the ID 32 C system was able to rigorously identify and classify great part of the isolates as positive (13) for *C. dubliniensis* at three different levels: excellent (seven), very good (five) and as good (one). Almost all the remaining isolates (six) were considered as having a doubtful profile but the software also suggest that there is 83.6% of chances for them to be *C. dubliniensis*. It should be pointed here that in laboratory routine the percentage of 83.6% would be an important indication of the species and should be taken into account.

Some assimilation profiles were not consistent among the strains of *C. dubliniensis* tested once they exhibited variation of results among different isolates tested. The lower agreement rate was found with results generated by palatinose, 2-keto-gluconate, N-acetylglucosamine, lactate, trehalose, galactose and sorbitol (Table 1). Best discrimination and consistence of results were obtained with  $\alpha$ -methyl-D-glucoside (MDG) and xylose (XYL) that were not assimilated by 100% of the isolates tested. Lactate (LAT) and trehalose (TRE) were assimilated by one isolate. Our results were slightly different from those reported by PINCUS *et al.*<sup>13</sup> in which 30% of the isolates assimilated trehalose (TRE) and no one of the isolates assimilated lactate (LAT). When SULLIVAN *et al.*<sup>21</sup> described *C. dubliniensis* as a new species, they reported that this organism was not able to assimilate xylose (XYL) and  $\alpha$ -methyl-D-glucoside (MDG). However, some positive reactions with this substrate were described previously by testing some strains of *C. dubliniensis* with commercial kits as the Vitek system<sup>5,13</sup>.

The results obtained in the present study are in accordance with the results reported by other authors<sup>6,13</sup>. The major identification problem related to the ID32 system was the discrepancy of results generated by some reactions causing misidentification of *C. dubliniensis*. It has been reported that variations in the density of the inoculum may produce false-positive or false-negative results requiring the adjustment of the inoculum to the proper density<sup>5</sup>. Otherwise, one could speculate that different strains of *C. dubliniensis* may exhibit some differences in their metabolic pathways like that involving trehalose and N-acetylglucosamine<sup>24</sup>. The variant phenotypes could also arise from the process of high-frequency switching to adapt to the host environment, like almost observed with *C. albicans*<sup>4</sup>.

In conclusion, despite the promising results obtained with the ID 32C system, this method exhibited some limitations in the identification of *C. dubliniensis*. Since variability has been reported in the literature, the results obtained by phenotypic tests should be considered presumptive for *C. dubliniensis* and one or more confirmatory tests should be employed. Therefore, we do not recommend the use of ID 32C system as the only screening test for the identification of *C. dubliniensis*.

## RESUMO

### Identificação de *Candida dubliniensis* isoladas no Brasil, através do método comercial ID 32C

Dezenove culturas de *C. dubliniensis* isoladas no Brasil, previamente identificadas através de métodos genotípicos, foram avaliadas pelo kit comercial ID 32C (bioMerieux). Treze culturas foram identificadas como *C. dubliniensis*, mas as demais (seis) evidenciaram perfil duvidoso, embora o software do sistema sugerisse 83,6% de chances das mesmas pertencerem à espécie *C. dubliniensis*. A literatura tem registrado grande variabilidade fenotípica com esta espécie e, por isto, as identificações obtidas com este sistema deverão ser consideradas como presuntivas.

## REFERENCES

- AL-HEDAITHY, S.S.A. & FOTEDAR, R. - Recovery and studies on chlamyospore-negative *Candida albicans* isolated from clinical specimens. *Med. Mycol.*, 40 : 301-306, 2002.
- ALVES, S.H.; MILAN, E.P.; MORETTI-BRANCHINI, M.L. *et al.* - First isolation of *Candida dubliniensis* in Rio Grande do Sul, Brazil. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 39: 165-168, 2001.
- ALVES, S.H.; MILAN, E.P.; SANT'ANA, P.L. *et al.* - Hypertonic Sabouraud broth as a simple and powerful test for *Candida dubliniensis* screening. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 43: 85-86, 2002.
- BLIGNAUT, E.; PUJOL, C.; JOLY, S. & SOLL, D.R. - Racial distribution of *Candida dubliniensis* colonization among South Africans. *J. clin. Microbiol.*, 41: 1838-1842, 2003.
- GALES, A.C.; PFALLER, M.A.; HOUSTON, A.K. *et al.* - Identification of *Candida dubliniensis* based on temperature and utilization of xylose and  $\alpha$ -methyl-D-glucoside as determined with API 20C AUX and Vitek YBC systems. *J. clin. Microbiol.*, 37: 3804-3808, 1999.
- GIAMMANCO, G.M.; PIGNATO, S.; SALVO, S. & GIAMMANCO, G. - Carbohydrate assimilation profiles of the first Italian *Candida dubliniensis* clinical isolates recovered from an HIV-infected individual. *Res. Microbiol.*, 151: 889-891, 2000.

---

ALVES, S.H.; HORTA, J.A.; MILÁN, E.P.; SCHEID, L.A.; VAINSTEIN, M.H.; SANTURIO, J.M. & COLOMBO, A.L. - Carbohydrate assimilation profiles of Brazilian *Candida dubliniensis* isolates based on ID 32C system. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 47(2):109-111, 2005.

---

7. GRAF, B.; TROST, A.; EUCKER, J.; GOBEL, U.B. & ADAM, T. - Rapid and simple differentiation of *C. dubliniensis* from *C. albicans*. *Diagn. Microbiol. infect. Dis.*, 48: 149-151, 2004.
8. JABRA-RIZK, M.A.; FALKLER Jr., W.A.; MERZ, W.G. *et al.* - Coaggregation of *Candida dubliniensis* with *Fusobacterium nucleatum*. *J. clin. Microbiol.*, 37: 1464-1468, 1999.
9. KOEHLER, A.P.; CHU, K.C.; HOUANG, E.T.S. & CHENG, A.F.B. - Simple, reliable, and cost-effective yeast identification scheme for the clinical laboratory. *J. clin. Microbiol.*, 37: 422-426, 1999.
10. MILAN, E.P.; SANT'ANA, P.L.; MELO, A.S.A. *et al.* - Multicenter prospective surveillance of oral *Candida dubliniensis* among adult Brazilian human immunodeficiency virus-positive and AIDS patients. *Diagn. Microbiol. infect. Dis.*, 41: 29-35, 2001.
11. MORAN, G.P.; SULLIVAN, D.J.; HENMAN, M.C. *et al.* - Antifungal drug susceptibilities of oral *Candida dubliniensis* isolates from Human Immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected subjects and generation of stable fluconazole-resistant derivatives *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 41: 617-623, 1997.
12. PFALLER, M.A.; MESSER, S.A.; GEE, S. *et al.* - *In vitro* susceptibilities of *Candida dubliniensis* isolates tested against the new triazole and echinocandin antifungal agents. *J. clin. Microbiol.*, 37: 870-872, 1999.
13. PINCUS, D.H.; COLEMAN, D.C.; PRUITT, W.R. *et al.* - Rapid identification of *Candida dubliniensis* with commercial yeast identification system. *J. clin. Microbiol.*, 37: 3533-3539, 1999.
14. PINJON, E.; SULLIVAN, D.; SALKIN, J.; SHANLEY, D. & COLEMAN, D. - Simple, inexpensive, reliable method for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *J. clin. Microbiol.*, 36: 2093-2095, 1998.
15. POLACHEK, I.; STRAHILEVITZ, J.; SULLIVAN, D. *et al.* - Recovery of *Candida dubliniensis* from non-human immunodeficiency virus-infected patients in Israel. *J. clin. Microbiol.*, 38: 170-174, 2000.
16. RODERO, L.M.; LOSSO, C.; CANTEROS, F.; HOCHENFELLNER, C. & DAVEL, G. - *Candida dubliniensis*: primer aislamiento en Argentina. *Rev. argent. Microbiol.*, 30: 39-41, 1998.
17. SALKIN, I.F.; PRUITT, W.R.; PADHYE, A.A. *et al.* - Distinctive carbohydrate assimilation profiles used to identify the first clinical isolate of *Candida dubliniensis* recovered in the United States. *J. clin. Microbiol.*, 36: 1467, 1998.
18. SANO, A.; VILELA, M.M.S.; TAKAHASHI, I. *et al.* - Isolation of *Candida dubliniensis* from the oral cavity of a positive child in Brazil. *Jap. J. med. Mycol.*, 41: 177-181, 2000.
19. SLIFKIN, M. - Tween 80 opacity responses of various *Candida* species. *J. clin. Microbiol.*, 38: 4626-4628, 2000.
20. STAIB, P. & MORSCHHAUSER, J. - Chlamyospore formation on Staib agar as a species-specific characteristic of *Candida dubliniensis*. *Mycoses*, 42: 521-524, 1999.
21. SULLIVAN, D.J.; WESTERNENG, T.J.; HAYNES, K.A.; BENNETT, D.E. & COLEMAN, D.C. - *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology*, 141: 1507-1521, 1995.
22. SULLIVAN, D.; HAYNES, K.; BILLE, J. *et al.* - Widespread geographic distribution of oral *Candida dubliniensis* strains in human immunodeficiency virus-infected individuals. *J. clin. Microbiol.*, 35: 960-964, 1997.
23. SULLIVAN, D. & COLEMAN, D. - *Candida dubliniensis*: characteristics and identification. *J. clin. Microbiol.*, 36: 329-334, 1998.
24. TIETZ, H.J.; KUSSNER, A.; THANOS, M. *et al.* - Phenotypic and genotypic characterization of unusual vaginal isolates of *Candida albicans* from Africa. *J. clin. Microbiol.*, 33: 2462-2465, 1995.

Received: 10 September 2004

Accepted: 25 November 2004