



FRANQUELINE REICHERT LIMA

**Espécies de *Cryptococcus* obtidas de isolados clínicos e ambientais
da cidade de Campinas-SP: genotipagem e avaliação da suscetibilidade
in vitro frente a agentes antifúngicos isolados e em diferentes combinações**

CAMPINAS

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

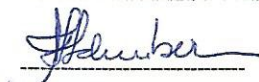
FRANQUELINE REICHERT LIMA

**Espécies de *Cryptococcus* obtidas de isolados clínicos e ambientais
da cidade de Campinas-SP: genotipagem e avaliação da suscetibilidade
in vitro frente a agentes antifúngicos isolados e em diferentes combinações**

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Angélica Zaninelli Schreiber

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção de título de Mestra em Ciências Médicas, área de concentração em Ciências Biomédicas.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA
DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA FRANQUELINE
REICHERT LIMA E ORIENTADA PELA PROF(a). DR(a).
ANGÉLICA ZANINELLI SCHREIBER.


Assinatura do Orientador

CAMPINAS
2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

R271e Reichert Lima, Franqueline, 1985-
Espécies de *Cryptococcus* obtidas de isolados clínicos e ambientais da cidade de Campinas, SP: genotipagem e avaliação da suscetibilidade *in vitro* frente a agentes antifúngicos isolados e em diferentes combinações / Franqueline Reichert Lima. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Angélica Zaninelli Schreiber.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. *Cryptococcus*. 2. Criptococose. 3. Genotipagem. 4. Agentes antifúngicos. I. Schreiber, Angélica Zaninelli, 1965-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: *Cryptococcus* species obtained from clinical and environmental isolates from the city of Campinas, SP: genotyping and assessment of *in vitro* susceptibility of antifungal agents alone and in different combinations

Palavras-chave em inglês:

Cryptococcus

Cryptococcosis

Genotyping

Antifungal agents

Área de concentração: Ciências Biomédicas

Titulação: Mestra em Ciências Médicas

Banca examinadora:

Angélica Zaninelli Schreiber [Orientador]

Emerson José Venancio

Plinio Trabasso

Data de defesa: 18-07-2014

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

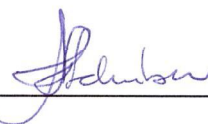
BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

FRANQUELINE REICHERT LIMA

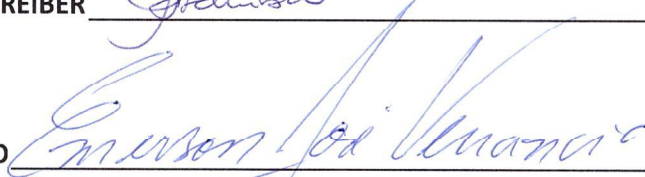
Orientador (a) PROF(A). DR(A). ANGÉLICA ZANINELLI SCHREIBER

MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). ANGELICA ZANINELLI SCHREIBER



2. PROF(A). DR(A). EMERSON JOSÉ VENANCIO



3. PROF(A). DR(A). PLINIO TRABASSO



Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas

Data: 18 de julho de 2014

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais, que com amor, apoio e confiança sempre estiveram presentes em todos os momentos da minha vida.

Ao meu marido, que com amor, sempre apoiou essa trajetória.

À minha orientadora, que acreditou nas decisões dessa caminhada.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Dr^a Angélica Angélica Zaninelli Schreiber, que além da amizade, dos ensinamentos e ótima orientação, foi a pessoa que acreditou e confiou na minha capacidade e me deu a oportunidade de iniciar a carreira acadêmica.

À Prof^a Dr^a Maria Luiza Moretti pelo apoio, pelos ensinamentos e pela oportunidade de trabalhar em um ótimo grupo de pesquisa.

Aos colegas do Laboratório de Investigação em Fungos, em especial à Luzia Lyra, pela amizade, paciência e disposição ao compartilhar seu conhecimento, e ao Edson Luz, por todo apoio, amizade e ensinamentos.

Aos colegas do Laboratório de Epidemiologia Molecular e Doenças Infecciosas, Éri van O. Ribeiro, Ariane F.B. Lopes, Eliene Pinheiro, Adenilza C.S. Fonseca, Cibeli Tararam, Marcela de Souza, Michela Ferrari, Lais L. Sturaro, Pâmella Stivanelli e Isabela Haddad Peron, pela agradável convivência e compartilhamento de experiências e aprendizado.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia Clínica pela amizade e apoio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

À Japan Internacional Corporation Agency (JICA), pelo apoio financeiro e pela oportunidade de conhecer e aprender com os profissionais e professores da Universidade de Chiba, no Japão.

A todos meus amigos pelo apoio e amizade.

Aos meus familiares, em especial meus pais, Celso e Inês Reichert e irmãos, Cassius e Vinícius Reichert, que sempre me guiaram e mostraram a importância dos estudos no meu crescimento pessoal.

A meu marido Thiago F. Lima, pelo apoio e companheirismo.

O meu mais sincero agradecimento!

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original”

Albert Einstein

RESUMO

O gênero *Cryptococcus* engloba duas espécies consideradas patogênicas: *C.neoformans* e *C.gattii*. Apesar dos avanços na área médica, a criptococose permanece uma das infecções fúngicas sistêmicas mais importantes no Brasil. Anfotericina B (AMB) associada a flucitosina (5FC) é a terapia de indução indicada porém, no Brasil, 5FC não está disponível e o tratamento segue somente com AMB ou em associação com fluconazol (FCL). Este trabalho avaliou a ocorrência de espécies e os genótipos de isolados clínicos de pacientes atendidos no Hospital de Clínicas da UNICAMP em um período de 5 anos; isolados ambientais coletados na cidade de Campinas-SP e o perfil de suscetibilidade aos antifúngicos sozinhos contra isolados clínicos e ambientais e o efeito de combinações de antifúngicos frente a isolados clínicos de *Cryptococcus* spp.. A identificação de espécies e genótipos foi realizada por testes bioquímicos, *Restriction Fragment Length Polymorphism* do gene *URA5* (*URA5-RFLP*) e sequenciamento da região *Internal Transcribed Spacer* (ITS) do DNA ribossomal. Testes de suscetibilidade para AMB, 5FC, FCL, voriconazol (VRC), itraconazol (ITC) e terbinafina (TRB) isolados foram realizados conforme CLSI M27-A3 (2008). Os testes com antifúngicos combinados (AMB+5FC; AMB+FCL; AMB+TRB; FCL+TRB), foram realizados pelo método do “tabuleiro de xadrez” para determinação do Coeficiente de Inibição Fracional (CIF) para avaliar o tipo de interação entre as substâncias (sinergismo, indiferença ou antagonismo). Dentre 75 isolados clínicos reativados, foram identificados 66 *C.neoformans* e 9 *C.gattii*. Todos *C.gattii* pertenceram ao genótipo VGII enquanto que 62 isolados de *C.neoformans* ao genótipo VNI e apenas 4 ao genótipo VNII. Foram obtidos 92 isolados ambientais de *Cryptococcus*, pertencentes às espécies *C.neoformans* (genótipo VNI), *C.laurentii*, *C.albidus*, *C.flavescens* e *Cryptococcus* spp.. Os valores dos intervalos de CIM para *C.neoformans* clínicos foram AMB: $\leq 0,125$ -1 $\mu\text{g/mL}$; 5FC: $\leq 0,125$ -2 $\mu\text{g/mL}$; FCL: 0,25-8 $\mu\text{g/mL}$; VRC: $\leq 0,015$ -0,125 $\mu\text{g/mL}$; ITC: 0,03-0,25 $\mu\text{g/mL}$ e TRB: 0,125-2 $\mu\text{g/mL}$. Intervalos de CIM para *C.gattii* variaram de 0,25-1 $\mu\text{g/mL}$ para AMB; 0,5-4 $\mu\text{g/mL}$ para 5FC; 2-16 $\mu\text{g/mL}$ para FCL; 0,06-0,25 $\mu\text{g/mL}$ para VRC; 0,06-0,5 $\mu\text{g/mL}$ para ITC e 0,5-4 $\mu\text{g/mL}$ para TRB. Foram observados elevados valores de CIM para os antifúngicos 5FC e FCL frente aos isolados ambientais de *C.albidus* e *C.laurentii*. O genótipo VNI de *C.neoformans* clínico mostrou 75,80% de interação sinérgica para AMB+5FC; 79,03% para AMB+FCL; 77,42% para AMB+TRB e 95,16% para FCL+TRB. O genótipo VNII apresentou 100% de sinergismo em todas as combinações. *C.gattii* (VGII) apresentou 88,9% de sinergismo nas combinações AMB+5FC e AMB+FCL; 100% para AMB+TRB e FCL+TRB. Não foi observado efeito antagônico nas combinações de antifúngicos. Foi observado bom desempenho nas combinações realizadas, especialmente naquelas envolvendo a TRB para ambas as espécies *C.neoformans* e *C.gattii*. O genótipo VNI foi o predominante entre os genótipos que afetam os pacientes com criptococose na região de Campinas. Em infecções de difícil tratamento ou que não respondem aos antifúngicos convencionais, a combinação de diferentes antifúngicos como AMB+TRB ou FCL+TRB podem vir a ser uma alternativa em países onde 5FC não está disponível, como no Brasil. Mais estudos são necessários para avaliar o papel dos genótipos na sensibilidade aos antifúngicos, assim como estudos de combinações de antifúngicos *in vitro* e *in vivo* para que novas estratégias possam ser empregadas no tratamento da criptococose.

ABSTRACT

Cryptococcus genus comprises two species considered pathogenic: *C.neoformans* and *C.gattii*. Despite advances in the medical field, cryptococcosis remains one of the most important systemic fungal infections in Brazil. Amphotericin B (AMB) associated with flucytosine (5FC) induction therapy is indicated but, in Brazil, 5FC is not available and treatment follows only with AMB or in combination with fluconazole (FCL). This study evaluated the prevalence of species and molecular subtypes of clinical isolates from patients treated at the Hospital of UNICAMP in a period of 5 years; environmental isolates collected in Campinas – SP and *in vitro* antifungal susceptibility profile of antifungal agents alone against clinical and environmental isolates of *Cryptococcus* spp. and the effect of combinations of antifungal agents against clinical isolates of *Cryptococcus* spp.. The species identification and subtyping was performed by biochemical tests, Restriction Fragment Length Polymorphism of *URA5* gene (RFLP - *URA5*) and sequencing of the Internal Transcribed Spacer region (ITS) of ribosomal DNA. Susceptibility tests for AMB, 5FC, FCL, voriconazole (VRC), itraconazole (ITC) and terbinafine (TRB) isolated were performed according to CLSI M27-A3 (2008). Combined antifungals tests (AMB +5FC; AMB+FCL; AMB +TRB, FCL+TRB), were performed by the "Checkerboard" method to determine the Fractional Inhibitory Coefficient index (FIC) to assess the type of interaction between substances (synergism, indifference or antagonism). Among the 75 viable clinical isolates, 66 were identified as *C.neoformans* and 9 as *C.gattii*. All *C.gattii* belonged to subtype VGII while 62 isolates belonged *C.neoformans* VNI genotype and only 4 VNII. 92 environmental isolates of *Cryptococcus* were obtained. The species *C.neoformans* (subtype VNI) *C.laurentii*, *C.albidus*, *C.flavescens* and *Cryptococcus* spp.were identified. The MIC range values of clinical *C.neoformans* for AMB were: ≤ 0.125 -1 $\mu\text{g/mL}$; 5FC: ≤ 0.125 to 2 $\mu\text{g/mL}$; FCL: 0.25-8 $\mu\text{g/mL}$; VRC: ≤ 0.015 to 0.125 $\mu\text{g/mL}$; ITC: 0.03 to 0.25 $\mu\text{g/mL}$ and TRB: 0.125 to 2 $\mu\text{g/mL}$. MIC for *C.gattii* ranged from 0.25-1 $\mu\text{g/mL}$ for AMB; 0.5-4 $\mu\text{g/mL}$ for 5FC; 2-16 $\mu\text{g/mL}$ for FCL; 0.06 to 0.25 $\mu\text{g/mL}$ for VRC; 0.06 to 0.5 $\mu\text{g/mL}$ for ITC and 0.5-4 $\mu\text{g/mL}$ for TRB. High MIC values were observed for FCL and 5FC against environmental isolates of *C.albidus* and *C.laurentii*. The VNI *C.neoformans* genotype showed 75.80 % of synergistic interaction for AMB+5FC; 79.03 % for AMB + FCL; 77.42 % for AMB + TRB and 95.16 % for FCL+TRB. The VNII genotype showed 100% synergism in all combinations. *C.gattii* (VGII) showed 88.9 % of synergism in combinations AMB+5 FC and AMB+FCL; 100 % for AMB+TRB and TRB+FCL. No antagonistic effect was observed in all evaluated antifungal combinations. Good performance was observed in all combinations performed, especially those involving TRB for both *C.neoformans* and *C.gattii* species. The VNI was the predominant genotype among genotypes affecting patients with cryptococcosis in Campinas region. In difficult to treat infections or unresponsive to conventional antifungal agents, the combination of different antifungals so as AMB+FCL or TRB+TRB may become an alternative in countries where 5FC is not available, as in Brazil. More studies are needed to evaluate the role of genotypes in sensitivity to antifungal agents, as well as antifungal agents combination studies *in vitro* and *in vivo* so that new strategies can be employed in the treatment of cryptococcosis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Esquema ilustrativo do DNA ribossomal fúngico 45
- Figura 2:** Esquema ilustrativo da estrutura do gene orotidina monofosfato pirofosforilase (URA5)..... 46
- Figura 3:** Exemplos de localidades públicas da cidade de Campinas onde foram realizadas coletas de excretas de pombos: (1) Largo do Rosário; (2) HC-UNICAMP; (3) Biblioteca Central - UNICAMP; (4) Mercado Municipal de Campinas 63
- Figura 4:** Placa de microtitulação sobre suporte com espelho reverso para leitura dos testes de suscetibilidade in vitro..... 73
- Figura 5:** Esquema representativo da montagem e leitura da placa de microdiluição no teste de combinação de antifúngicos pelo método do “Tabuleiro de xadrez” 76
- Figura 6:** Gel de agarose a 3% com perfis de URA5-RFLP dos 8 genótipos de *C.neoformans* (VNI-VNIV) e *C.gattii* (VGI-VGIV) utilizados para a determinação dos perfis de RFLP dos isolados clínicos e ambientais de *C.neoformans* e *C.gattii* 87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Micro-organismos reativados para o estudo, agrupados por grupos de espécimes clínicos de cada paciente	82
Tabela 2: Localidades públicas da cidade de Campinas onde foram realizadas coletas de excretas de pombos e espécies de <i>Cryptococcus</i> spp. obtidas.....	85
Tabela 3: Localidades públicas da cidade de Campinas-SP onde foram realizadas coletas de material de ocos de árvores, com a utilização de swab úmido e as espécies de <i>Cryptococcus</i> spp. obtidas	86
Tabela 4: Identificação molecular de isolados clínicos e ambientais de <i>Cryptococcus</i> spp. pela técnica de sequenciamento da região ITS do DNA ribossomal com os primers ITS1 e ITS4.....	89
Tabela 5: Dados de Concentração inibitória mínima (CIM) obtidos para os isolados clínicos agrupados por paciente.....	90
Tabela 6: Intervalos de Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL dos agentes antifúngicos anfotericina B, 5-flucitosina, fluconazol, voriconazol, itraconazol e terbinafina frente a clínicos de <i>Cryptococcus</i> spp.....	92
Tabela 7: Distribuição do número de isolados em cada Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL dos antifúngicos anfotericina B, 5-flucitosina, fluconazol, voriconazol, itraconazol e terbinafina frente a isolados clínicos de <i>Cryptococcus</i> spp.....	92
Tabela 8: Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL dos agentes antifúngicos anfotericina B, 5-flucitosina, fluconazol, voriconazol e itraconazol frente a isolados ambientais de <i>Cryptococcus</i> spp.....	94
Tabela 9: Intervalos de concentração inibitória mínima (CIM) em µg/mL dos agentes antifúngicos anfotericina B, 5-flucitosina, fluconazol e terbinafina sozinhos e em quatro combinações frente a isolados clínicos de <i>Cryptococcus</i> spp.	95
Tabela 10: Porcentagem dos tipos de efeito de interação para cada genótipo em cada uma das 4 combinações de agentes antifúngicos frente a isolados clínicos de <i>Cryptococcus</i> spp.	96

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC: Albaconazol

AFLP: *Amplified Fragment Length Polymorphism*

AMB: Anfotericina B

ASD: Ágar Sabouraud Dextrose

ATCC: *American Type Culture collection*

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*

CGB: Canavanina-glicina-azul de bromotimol

CIF: Coeficiente de Inibição Fracional

CIM: Concentração Inibitória Mínima

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EDTA: Ácido etilenoaminotetracético

5FC: 5-Flucitosina

FCL: Fluconazol

FCM-UNICAMP: Faculdade de Ciências Médicas - Universidade Estadual de Campinas

GalXM: Galactoxilomanana

GXM: Glucuronoxilomanana

HC-UNICAMP: Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas

HCl: Ácido Clorídrico

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana

IC: Inibição de crescimento

IDSA: *Infectious Diseases Society of America*

IFI: Infecção Fúngica Invasiva

IGS: *Intergenic Spacer*

ITC: Itraconazol

ITS: *Internal Transcribed Spacer*

KTC: Cetoconazol

LCR: Líquor

LEMEDI: Laboratório de Epidemiologia Molecular e Doenças Infecciosas-FCM-UNICAMP

LIF: Laboratório de Investigação em Fungos-FCM-UNICAMP

MATa: *Mating-type a*

MAT α : *Mating-type α*

MLST: *Multilocus Sequence Typing*

MOPS: Ácido Morfolinopropanosulfônico

OMS: Organização Mundial de Saúde

PCE: Ponto de Corte Epidemiológico

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

PSC: Posaconazol

RENAME: Relação Nacional de Medicamentos Essenciais

RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism*

RVC: Ravuconazol

SNC: Sistema Nervoso Central

TARV: Terapia Antirretroviral Altamente Ativa

TRB: Terbinafina

UFC: Unidades Formadoras de Colônia

URA5 gene: gene orotidina monofosfato pirofosforilase

VRC: Voriconazol

YEPD: *Yeast Extract Peptone Dextrose*

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice 1: Isolados clínicos selecionados para o estudo provenientes de pacientes com criptococose atendidos no Hospital de Clínicas da UNICAMP no período de janeiro de 2007 a dezembro de 2011, com identificação molecular para os que foram reativados.....	147
Apêndice 2: Identificação dos isolados ambientais coletados na cidade de Campinas.....	149
Apêndice 3: Dados de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Coeficiente de Interação Fracional (CIF) da combinação dos antifúngicos anfotericina B + 5-flucitosina contra 75 isolados clínicos de <i>Cryptococcus</i> spp.....	151
Apêndice 4: Dados de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Coeficiente de Interação Fracional (CIF) da combinação dos antifúngicos Anfotericina B + fluconazol contra 75 isolados clínicos de <i>Cryptococcus</i> spp.....	153
Apêndice 5: Dados de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Coeficiente de Interação Fracional (CIF) da combinação dos antifúngicos anfotericina B + terbinafina contra 75 isolados clínicos de <i>Cryptococcus</i> spp.....	155
Apêndice 6: Dados de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Coeficiente de Interação Fracional (CIF) da combinação dos antifúngicos fluconazol + terbinafina contra 75 isolados clínicos de <i>Cryptococcus</i> spp.....	157

SUMÁRIO

1. Introdução.....	31
1.1. O agente etiológico.....	33
1.1.1. Histórico.....	33
1.1.2. Características	34
1.1.3. Ecologia	36
1.1.4. Outras espécies de <i>Cryptococcus</i>	37
1.2. A criptococose.....	38
1.2.1. Epidemiologia	40
1.2.2. Diagnóstico clínico da criptococose	42
1.2.3. Diagnóstico laboratorial de espécies de <i>Cryptococcus</i>	43
1.2.4. Tratamento da criptococose	46
1.3. Suscetibilidade aos antifúngicos	48
1.4 Justificativa do estudo	53
2. Objetivos.....	55
2.1. Objetivo geral.....	57
2.2. Objetivos específicos.....	57
3. Material e Métodos	59
3.1. Local de trabalho	61
3.2. Isolados Clínicos	61
3.2.1. Seleção dos micro-organismos para estudo	61
3.2.2. Reativação dos isolados	62
3.2.3. Identificação	62
3.3. Isolados ambientais	62
3.3.1. Procedimento de coleta ambiental.....	63
3.3.2. Preparação das amostras ambientais.....	64
3.3.3. Identificação dos isolados ambientais	65
3.4. Genotipagem de isolados clínicos e ambientais de <i>Cryptococcus neoformans</i> e <i>Cryptococcus gattii</i>	65
3.4.1. Extração de DNA	65
3.4.2. Amplificação do DNA alvo pela reação em cadeia da polimerase (PCR) ...	66
3.4.3. Incubação com as endonucleases <i>Cfr13I</i> e <i>HhaI</i>	66
3.4.4. Controle de qualidade	67

3.5. Identificação molecular pela técnica de sequenciamento da região <i>internal transcribed spacer</i> (ITS) do DNA ribossomal	67
3.5.1. Amplificação do DNA	67
3.5.2. Purificação dos produtos de PCR	68
3.5.3. Reação de Sequenciamento	68
3.6. Testes de suscetibilidade <i>in vitro</i>	70
3.6.1. Meio de cultura	70
3.6.2. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	70
3.6.3. Teste de suscetibilidade <i>in vitro</i> aos antifúngicos em combinação para determinação do Coeficiente de Interação Fracional (CIF)	74
3.6.4. Controle de Qualidade	77
3.6.5. Análise estatística	77
4. Resultados	79
4.1. Isolados clínicos	81
4.1.1. Reativação dos micro-organismos selecionados para o estudo	81
4.1.2. Identificação dos isolados clínicos	81
4.2. Isolados ambientais	84
4.3. Genotipagem de isolados clínicos e ambientais de <i>Cryptococcus neoformans</i> e <i>Cryptococcus gattii</i>	86
4.4. Sequenciamento	88
4.5. Testes de suscetibilidade <i>in vitro</i>	89
4.5.1. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	89
4.5.2. Teste de suscetibilidade <i>in vitro</i> aos antifúngicos em combinação e determinação do Coeficiente de Interação Fracional (CIF)	94
4.5.3. Relação entre genótipos e CIMs	96
5. Discussão	97
6. Conclusões	123
7. Referências	127
8. Apêndices	145

1. Introdução

1.1. O agente etiológico

1.1.1. Histórico

A primeira descrição de *Cryptococcus* spp. foi feita por Otto Busse, entre 1894 e 1895. O micro-organismo então denominado *Saccharomyces hominis*, por ser semelhante à levedura *Saccharomyces*, foi isolado partir de uma lesão da tíbia de um paciente com infecção disseminada. No mesmo período (1894 e 1895) Francesco Sanfelice identificou uma levedura encapsulada proveniente de um suco de pêssago fermentado, que denominou *Saccharomyces neoformans* (1,2).

Em 1901, Jean Paul Vuillemin classificou os fungos isolados por Busse e Sanfelice como pertencentes ao gênero *Cryptococcus*, denominando-os de *C.hominis* e *C.neoformans*, respectivamente. A classificação foi alterada devido ao fato de que os micro-organismos isolados por Busse e Sanfelice não produziam ascósporos, estruturas que seriam esperadas em espécies do gênero *Saccharomyces* (1,2).

Mais tarde, entre 1934 e 1935, por meio de estudos morfológicos e sorológicos realizados a partir de isolados clínicos de *Cryptococcus*, Rhoda Benham determinou que ambos pertenciam a uma única espécie, *Cryptococcus hominis*. Benham utilizou o material retirado das cápsulas das leveduras para realizar estudos sorológicos em animais, iniciando assim as pesquisas sobre a caracterização antigênica das espécies (1,2).

Edward Evans e colaboradores, em 1950, estendendo os estudos realizados por Benham, publicaram importantes trabalhos mostrando diferenças sorológicas entre isolados obtidos a partir de amostras clínicas de pacientes. Os sorotipos A, B e C foram então determinados, mostrando o quanto as leveduras do gênero *Cryptococcus* poderiam ser

heterogêneas. Nesse ano, Benham recomendou que a nomenclatura de *Cryptococcus neoformans* fosse adotada (1,2).

C.gattii foi clinicamente isolado pela primeira vez a partir do líquido (LCR) de uma criança do Congo em 1970 (3). O micro-organismo isolado naquela ocasião parecia possuir estruturas mais alongadas do que aquelas encontradas anteriormente. Essa levedura foi denominada *Cryptococcus neoformans* variedade *gattii* (1,2). Acreditou-se por muitos anos que *C.neoformans* e *C.gattii* pudessem ser uma única espécie, que possuía duas variedades. Hoje, pelas diferenças filogenéticas, no ciclo sexuado e morfologia dos basidiósporos, bem como diferenças fenotípicas e metabólicas, sustenta-se a ideia de duas espécies distintas (4).

Três sorotipos têm sido descritos para *C.neoformans*, sendo eles A (var. *grubii*), D (var. *neoformans*) e o híbrido AD, enquanto que para *C.gattii* dois, os sorotipos B e C (5,6).

Técnicas moleculares subdividiram as espécies descritas em oito principais grupos moleculares. *C.neoformans*: VNI e VNII (sorotipo A; var. *grubii*), VNIII (híbrido sorotipo AD; var. *neoformans*) e VNIV (sorotipo D; var. *neoformans*) e *C.gattii*: VGI, VGII, VGIII e VGIV (sorotipos B e C; var. *gattii*) (7-11). Estudo Litvintseva et al. (9), descreveu um outro genótipo para a espécie *C.neoformans*, o VNB, que foi identificado na África Subsariana. Cogliati et al. (12) relataram que 13% dos isolados de *C.neoformans* da África pertencem ao genótipo VNB, que foi inicialmente considerado endêmico em Botswana. Outros poderão ser progressivamente descritos a medida em que se ampliam os estudos mundiais.

1.1.2. Características

As espécies de *Cryptococcus*, taxonomicamente, estão incluídas no Reino Fungi; Filo Basidiomycota; Classe Tremellomycetes; Ordem Tremellales; Família Tremellaceae; Gênero *Cryptococcus* (13).

Espécies do gênero *Cryptococcus* apresentam-se como leveduras não fermentadoras, ovaladas ou globosas, com 5-6 μm de diâmetro, uni ou bi-brotantes, envoltas em uma cápsula de natureza mucopolissacarídica, cujo tamanho varia com a espécie, com o local de isolamento (ambiental ou clínico) e também conforme a resposta imunológica do hospedeiro (2,14).

A cápsula é complexa e composta por dois principais mucopolissacarídeos (MPS), glucuronoxilomanana (GXM) e galactoxilomanana (GalXM). A maior parte é composta por GXM, representando cerca de 90% da cápsula, enquanto que GalXM, representa de 5 a 8% da composição da cápsula. Além dos MPS, a cápsula possui uma pequena quantidade de manoproteínas (aproximadamente 1%) (1,15-18). Diferenças antigênicas nas estruturas dos componentes de GXM determinam o tipo sorológico das espécies de *C.gattii* e *C.neoformans* (4,16,19,20).

As formas de reprodução de espécies de *Cryptococcus* são complexas e permanecem como importante alvo de estudos para o melhor entendimento destas leveduras. No ciclo anamórfico de reprodução, as espécies de *Cryptococcus* são tipicamente haplóides que se reproduzem assexuadamente por brotamento quando em vida parasitária ou ambiental. Na forma teleomórfica (forma filamentosa), podem se reproduzir sexuadamente, o que corresponde ao estado perfeito do fungo, denominado de *Filobasidiella neoformans* e *Filobasidiella bacillispora* para *C.neoformans* e *C.gattii*, respectivamente (1,21-24).

Existem dois tipos sexuais ou *mating-types* MAT α e MATa, definidos por um locus com 2 alelos alternativos. Células com *mating-type* opostos, ao se encontrarem, fazem com que ocorra a reprodução sexuada, produzindo filamentos dicarióticos, ou seja, estruturas que contêm dois núcleos de origens diferentes. Durante a recombinação sexual, filamentos

e basidiósporos são formados (25). Pode existir também para *C.neoformans*/*C.gattii*, naturalmente, a reprodução entre indivíduos do mesmo MAT, especialmente entre isolados MAT α , gerando filamentos monocarióticos (26-28).

1.1.3. Ecologia

A ecologia de espécies do gênero *Cryptococcus* revela que não há um nicho específico para o isolamento dessas leveduras. A exposição humana a espécies desse gênero é bem comum, pois esses fungos têm sido isolados de vários locais como construções abandonadas, jardins, igrejas, praças e domicílios (29-32).

Solo, poeira, material orgânico em decomposição, cascas de árvores e outros materiais vegetais, excretas de pombos (e outras aves) secas e envelhecidas são fontes saprofíticas de espécies do gênero *Cryptococcus* em ambientes urbanos e rurais (25,33-36).

C.neoformans é cosmopolita enquanto que *C.gattii* é mais frequentemente isolado em áreas tropicais e subtropicais. No entanto, após o surto acontecido na Ilha Vancouver, no Canadá e no sudeste dos Estados Unidos, *C.gattii* tem sido isolado em diferentes regiões do mundo, indicando que essa levedura se adaptou também ao clima temperado (37,38).

C.neoformans é mais comumente isolado a partir de excretas de pombos. Estes animais têm sido alvo de muitos estudos por representarem importante papel na epidemiologia de espécies do gênero *Cryptococcus* e muitos estudos confirmam a presença de *C.neoformans* em ambientes urbanos e rurais habitados por pombos em todo o mundo (29-31,39-41).

C.gattii, por sua vez, tem seu isolamento muitas vezes associado a árvores do gênero *Eucalyptus*, além de outras árvores. A presença dessa espécie é associada à decomposição de madeira em ocos de árvores tropicais, cascas de árvores e também solo com material vegetal em decomposição (2,33,34,42,43).

Montagna e colaboradores, em 1997, reportaram o primeiro isolamento ambiental de *C.gattii* na Europa, na região do Mediterrâneo da Itália. Mais recentemente, na Espanha e na Holanda *C.gattii* foi isolado a partir de árvores e seus detritos (44,45). No Brasil, estudos demonstraram a presença desse micro-organismo em ocos de árvores e outros materiais vegetais (33,34,43).

1.1.4. Outras espécies de *Cryptococcus*

Espécies não pertencentes ao complexo *C.neoformans/C.gattii* são geralmente saprofíticas e raramente relatadas como patógenos humanos. No entanto, nos últimos anos, algumas espécies vêm emergindo como potenciais patógenos oportunistas, tais como *C.uniguttulatus*, *C.laurentii* e *C.albidus* (46-49).

Os fatores de risco associados às infecções causadas por espécies não pertencentes ao complexo *C.neoformans/C.gattii* são similares às infecções causadas pelas espécies *C.neoformans/C.gattii*. Neutropenia, doenças hematológicas malignas, transplantes, infecção por HIV, tratamentos com imunossuppressores e utilização de instrumentos invasivos, como cateteres, são os principais fatores relacionados com a infecção por espécies não pertencentes ao complexo *C.neoformans/C.gattii* (46).

Apesar de raras, essas espécies já foram relatadas causando diversos tipos de infecções como queratite, peritonite, meningite, infecções pulmonares e fungemia em seres humanos e animais (46-50).

Estudo de Liu et al. (51) relatou um caso de encefalite causada por *C.albidus* em paciente com sida. Cleveland et al. (48) relataram um caso de fungemia causada por *C.albidus* em paciente receptor de fígado. Da mesma forma, em receptor de rim, Lee et al. (52) relataram um caso de criptococose disseminada causada por *C.albidus*.

Também em receptor de órgão sólido, foi relatada infecção por *C.laurentii*. O agente foi responsável por infecção cutânea primária em receptor de rim (47). Molina-Leyva et al. (49) relataram um caso de *C.laurentii* isolado em amostra clínica proveniente de infecção cutânea de criança imunocompetente.

Muitos estudos já foram realizados demonstrando a relação do isolamento de *C.neoformans* com a presença pombos, seja o isolamento feito a partir de excretas ou a partir da cloaca desses animais. Mattson et al. (53) reportaram o primeiro isolamento de espécies não pertencentes ao complexo *C.neoformans/C.gattii* em excretas de pombos. As espécies isoladas foram *C.laurentii* e *C.uniguttulatus*. Outros estudos demonstraram a presença de espécies não pertencentes ao complexo *C.neoformans/C.gattii* em excretas de pombos (31,54), inclusive estudos realizados no Brasil (55). Assim como as espécies *C.neoformans* e *C.gattii*, as outras espécies do gênero são saprofíticas podendo ser isoladas nos mais variados materiais de origem ambiental como a partir de solo, ar, material vegetal, poeira, entre outros (31,36,54).

Como os casos de criptococose causados por espécies não pertencentes ao complexo *C.neoformans/C.gattii* são raros, há falta de padronização para a identificação, testes de sensibilidade e o tratamento dessas infecções (49).

1.2. A criptococose

Infecções fúngicas invasivas (IFIs) podem afetar hospedeiros hígidos e hospedeiros com algum comprometimento no sistema imunológico. Estes últimos sendo frequentemente afetados por infecções causadas por agentes oportunistas (56,57).

IFIs são infecções de difícil tratamento, exigem altas doses de antifúngicos e tratamentos de longa duração. Em hospedeiros imunossuprimidos, as IFIs são

frequentemente fatais. Os principais agentes etiológicos envolvidos nessas infecções englobam leveduras, fungos filamentosos e fungos dimórficos. As principais leveduras causadoras de IFIs são as dos gêneros *Candida* spp. (58). *Cryptococcus* spp. (59) e *Trichosporon* spp. (60).

A criptococose é uma infecção que pode se manifestar como doença oportunista em indivíduos imunossuprimidos, e como doença primária em indivíduos imunocompetentes, variando desde infecções cutâneas localizadas até manifestações disseminadas fatais (61). Duas principais espécies são consideradas patogênicas para seres humanos e animais, *C.neoformans* e *C.gattii*, que afetam, com maior frequência, indivíduos imunossuprimidos e imunocompetentes, respectivamente (62,63). O gênero *Cryptococcus* spp. é responsável pela maioria dos casos de meningite fúngica (59).

Geralmente, a criptococose é adquirida por meio da inalação do agente. Acredita-se que leveduras, basidiósporos ou outras estruturas dos fungos do gênero *Cryptococcus* ao serem inaladas, configurem-se como as partículas infectantes da criptococose (25,64). Dependendo do estado imunológico do indivíduo e da espécie envolvida, a infecção pode ser assintomática e evoluir espontaneamente para a cura ou as leveduras podem se estabelecer e, por disseminação hematogênica, atingir outros órgãos, principalmente o sistema nervoso central (SNC), causando meningite e meningoencefalite. A infecção também pode afetar ossos, medula óssea, linfonodos, pele, sistema urinário, entre outros (2,65).

As lesões cutâneas ocorrem geralmente por disseminação hematogênica (criptococose cutânea secundária). Pode ainda haver a forma rara e localizada, por inoculação do fungo de modo traumático, sendo chamada de criptococose cutânea primária (66,67).

A população mais atingida por essa IFI é representada por indivíduos com algum tipo de comprometimento imunológico como doenças linfoproliferativas, transplantados, pacientes submetidos a tratamentos com medicamentos imunossupressores e, principalmente, portadores de HIV em estágio avançado, com sida (10,59,68).

Algumas características importantes diferenciam as infecções causadas por *C.neoformans* das causadas por *C.gattii*. Apesar de *C.gattii* acometer principalmente indivíduos imunocompetentes, nos quadros de criptococose causados por esta espécie, é mais comum ocorrerem lesões mais extensas e sequelas neurológicas mais graves. Além disso, *C.gattii* apresenta uma resposta mais lenta à ação dos antifúngicos do que *C.neoformans*. As infecções causadas por *C.gattii* apresentam pior prognóstico em relação às causadas por *C.neoformans* (68).

É mais comum na infecção por *C.gattii* o envolvimento pulmonar do que na causada por *C.neoformans*, bem como a infecção ter acometimento cerebral e pulmonar ao mesmo tempo (68). Grandes lesões maciças, que podem ser confundidas com neoplasias, são também mais frequentes em infecções causadas por *C.gattii* (69).

1.2.1. Epidemiologia

A incidência da criptococose cresceu na década de 80 com o aparecimento da sida, e a seguir, entrou em declínio após o surgimento da terapia antirretroviral altamente ativa (TARV) (70). Contudo, são estimados cerca de um milhão de casos de criptococose associados ao HIV em todo o mundo anualmente, com cerca de 600.000 mortes (59).

Os fatores de risco associados ao desenvolvimento da criptococose empregados em diversos estudos claramente demonstram que indivíduos portadores de HIV são os mais suscetíveis ao desenvolvimento desta infecção, mostrando o profundo impacto da epidemia HIV/sida na epidemiologia da criptococose (59,61,71,72).

A criptococose representa, assim como a candidíase esofágica, pneumonia por *Pneumocystis jirovecii*, coccidioidomicose extrapulmonar, e histoplasmose extrapulmonar – uma doença fúngica definidora de sida (73). Dos mais de 215.000 casos de pacientes registrados com HIV no Brasil nos anos 1980-2002, 6% foram diagnosticados com criptococose no momento do diagnóstico da sida (74).

No Brasil, é difícil avaliar a real situação do número de cada micose sistêmica, pois a notificação dessas infecções não é obrigatória no sistema de saúde brasileiro. Assim como as outras IFIs, a criptococose é subnotificada em todo o país (75).

Estudo de Prado et al (75) avaliou a taxa de mortalidade causada por IFIs como causa primária de morte e também os casos em associação com o vírus HIV no Brasil. O estudo foi realizado a partir de dados do Sistema de Informação de Mortalidade (SIM) do Ministério da Saúde. De 1996 a 2006, as micoses sistêmicas foram a causa de 3,583 mortes, sendo a criptococose responsável por cerca de 25% dessas mortes.

Ao analisar os casos de HIV, o estudo demonstrou que no período de 1998-2006, 125,633 pacientes morreram de sida no Brasil e 5,898 (4,7%) mortes foram associadas com alguma micose sistêmica, sendo a criptococose a principal delas (50%), seguida de candidíase (30,2%) e histoplasmose (10,1%). A criptococose é considerada a maior causa de morte entre as IFIs em portadores de sida.

No mundo todo a principal espécie causadora de criptococose é *C.neoformans* e o genótipo mais frequentemente encontrado é o VNI, exceto em países como Austrália e Papua Nova Guiné, onde o genótipo predominante é o VGI (*C.gattii*) (12,68,76).

No Brasil, como no resto do mundo, a espécie predominantemente causadora de criptococose é *C.neoformans* e o genótipo mais comumente encontrado é o VNI (76-81).

C.gattii é mais comum no Norte e Nordeste do país, onde é considerado endêmico. O genótipo mais frequentemente encontrado para essa espécie no Brasil é o VGII (12,76).

1.2.2. Diagnóstico clínico da criptococose

O manejo efetivo de IFIs depende de vários fatores como dados epidemiológicos, fatores de risco envolvidos em cada caso e, principalmente, o diagnóstico precoce para que o tratamento ideal seja empregado (82).

A história prévia do paciente e o quadro clínico são parâmetros iniciais para o diagnóstico da criptococose. As apresentações clínicas relacionam-se diretamente ao estado imunológico do hospedeiro, variando desde manifestações localizadas autolimitadas até doença disseminada.

Além de ser a principal porta de entrada desses fungos, o pulmão é um dos principais focos da criptococose, apresentando diversas manifestações clínicas, que variam de infecção assintomática, nódulos solitários, até pneumonia grave. Pacientes com criptococose pulmonar aguda podem apresentar febre, tosse produtiva, dor torácica e perda de peso (83).

O diagnóstico da forma pulmonar é feito, em geral, por biópsia e exame histopatológico, exame micológico direto e cultura do escarro, pesquisa de antígeno criptocócico e exames de imagem. O paciente com criptococose pulmonar deve ser sempre avaliado quanto à presença de meningite e doença disseminada (84).

C.neoformans e *C.gattii* têm uma predileção a invadir o SNC e podem causar meningite aguda, subaguda ou crônica, assim como meningoencefalite grave. Os sinais e sintomas estão geralmente presentes por diversas semanas e incluem cefaleia, febre, neuropatia craniana, alteração da consciência, letargia, perda de memória, sinais de

irritação meníngea e coma (83). O diagnóstico da meningite é realizado através da coleta de LCR para pesquisa e cultura do agente etiológico e pesquisa de antígeno criptocócico (70).

1.2.3. Diagnóstico laboratorial de espécies de *Cryptococcus*

O diagnóstico laboratorial é feito por microscopia direta, com ou sem tinta da China, e cultura do micro-organismo a partir de materiais biológicos, exames histopatológicos, detecção de antígenos circulantes em fluidos corporais com testes de aglutinação com Látex e testes imunoenzimáticos e por meio de técnicas moleculares (70,84).

O isolamento do agente causal pode ser realizado em meio de cultura como o ágar Sabouraud dextrose (ASD). Uma vez isolado, características bioquímicas auxiliam na identificação e diferenciação das espécies de *Cryptococcus* spp.. A produção de urease é uma prova bioquímica utilizada para identificação do gênero, pois as espécies de *Cryptococcus* spp. são capazes de realizar a hidrólise da ureia (85). As espécies podem ser determinadas de acordo com as características das reações obtidas no meio de L-canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB), no qual *C.gattii* é resistente à canavanina e utiliza a glicina como fonte de carbono, obtendo-se assim cor azul, enquanto que para *C.neoformans* isso não é observado (86).

Além disso, alguns laboratórios de micologia podem contar com metodologias automatizadas para identificação, porém os equipamentos e reagentes necessários são de alto custo, o que restringe sua utilização aos grandes centros. Algumas dessas metodologias possuem ainda a desvantagem de não diferenciarem as espécies *C.neoformans* e *C.gattii*, exigindo testes complementares para a correta diferenciação (87).

Devido à grande importância de *C.neoformans* e *C.gattii* como patógenos humanos, muitos grupos de pesquisa desenvolveram e estão desenvolvendo diversas técnicas

moleculares. As ferramentas moleculares apresentam elevadas sensibilidade e especificidade na detecção, permitindo resolver as limitações do diagnóstico convencional e, desta forma, podendo ser empregadas tanto na identificação como na tipagem para epidemiologia molecular desses micro-organismos (88).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido uma ferramenta essencial para o desenvolvimento de técnicas moleculares para identificação e genotipagem de espécies de *Cryptococcus*. As técnicas de *singleplex* PCR (89); *multiplex* PCR (77) e o sequenciamento das regiões *Internal Transcribed Spacer* (ITS) e *Intergenic Spacer* (IGS) (90), constituintes do DNA ribossomal (figura 1), são alguns exemplos do que vem sendo estudado e utilizado em relação à identificação molecular das espécies.

O sequenciamento de ácidos nucleicos tornou-se uma importante ferramenta na identificação molecular de micro-organismos, sendo útil para identificação de bactérias, micobactérias, protozoários, vírus, fungos, entre outros. Técnicas de sequenciamento, derivadas da metodologia de Sanger se baseiam em 5 passos: 1) preparação do DNA alvo; 2) geração de fragmentos complementares à fita molde do DNA (com a utilização de terminadores); 3) separação dos fragmentos em um polímero; 4) detecção dos fragmentos e 5) análise dos dados (91).

O sequenciamento da região ITS (figura 1), é muito utilizada para identificação de espécies de fungos, inclusive do gênero *Cryptococcus*. Essa região foi considerada o “código de barras” para fungos (88, 92-94).

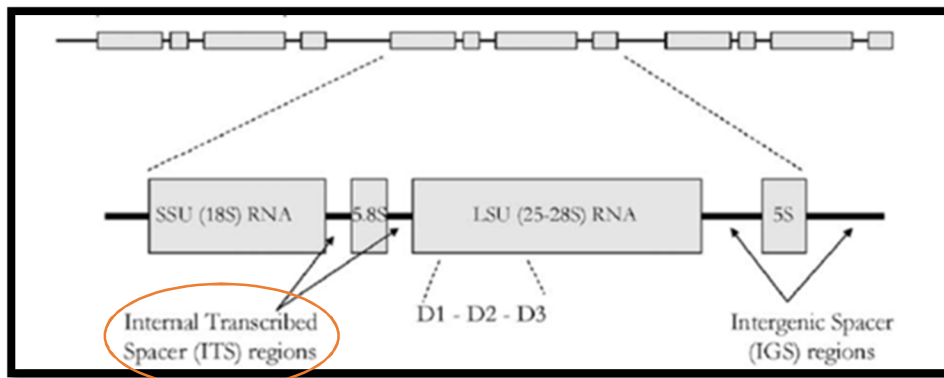


Figura 1: Esquema ilustrativo do DNA ribossomal fúngico

Para a genotipagem das espécies, as técnicas de PCR *fingerprinting* dos *primers* M13 (seqüências minissatélites) e GACA4 (microsatélites) (7,95) *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) com as enzimas *EcoR*I e *Mse*I (96,97); *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) do gene *URA5* (7) e *Multilocus Sequence Typing* (MLST) dos genes *CAP59*, *GPD1*, *LAC1*, *SOD1*, *URA5*, *IGS1* (98,99) são exemplos das técnicas que estão sendo utilizadas para esses micro-organismos.

A técnica de RFLP é comumente empregada para a diferenciação entre isolados de uma mesma espécie, determinando o tipo molecular dos mesmos. A técnica tem como princípio a amplificação do DNA por reação de PCR seguida de digestão dupla com as endonucleases para o corte das regiões alvo do DNA. Os cortes realizados durante a incubação com as enzimas de restrição dão origem a fragmentos de DNA de tamanhos diferentes para cada genótipo. Os fragmentos, por possuírem pesos moleculares diferentes, migram com velocidades distintas em gel, onde cada genótipo apresenta um perfil de fragmentos específico. O perfil obtido é comparado visualmente ao perfil de cepas padrão para determinação do genótipo de cada isolado estudado. O gene orotidina monofosfato pirofosforilase (*URA5*), gene alvo da técnica de RFLP para genotipagem de *C.neoformans/C.gattii* (7), está localizado no cromossomo G e faz parte da via de

metabolismo de pirimidina. Esse gene possui aproximadamente 780 pares de base e sintetiza uma proteína com 225 aminoácidos (100). O esquema da estrutura do gene *URA5* pode ser visualizado na figura 2.



Figura 2: Esquema ilustrativo da estrutura do gene orotidina monofosfato pirofosforilase (*URA5*)

1.2.4. Tratamento da criptococose

Pacientes com criptococose geralmente apresentam quadros severos da doença. O objetivo do tratamento é erradicar o micro-organismo para assim evitar as sequelas neurológicas e também os casos fatais. O tratamento evolui por três fases. A fase de indução do tratamento tem por objetivo a negativação ou a redução efetiva da carga fúngica. A fase de consolidação compreende a manutenção de negatividade da carga fúngica e normalização dos parâmetros clínicos e laboratoriais por pelo menos 8 semanas. Segue, por fim, a fase de manutenção em que o período varia com o estado geral e imune do hospedeiro (61).

A *Infectious Diseases Society of America* (61) e a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2011) (101) recomendam a utilização de anfotericina B (AMB) e 5-flucitosina (5FC) como a primeira linha de antifúngicos na fase de indução do tratamento em pacientes com meningite criptocócica por pelo menos 2 semanas. Para locais onde 5FC não está disponível, é recomendada uma segunda linha de tratamento, que consiste na administração de AMB, associada a doses de fluconazol (FCL). Quando a AMB não estiver disponível ou a administração não puder ser monitorada, é recomendado o uso de altas doses de FCL juntamente com 5FC. A fase de indução é seguida pelas fases de consolidação e

manutenção com FCL. Para profilaxia da infecção e para pacientes com criptococose assintomática ou sintomática leve a moderada, FCL ou itraconazol (ITC) são as opções preferenciais de tratamento (61).

Novas opções de antifúngicos, como as equinocandinas, não têm atividade contra patógenos do gênero *Cryptococcus*. Estudos realizados com esses antifúngicos demonstraram que as espécies de *Cryptococcus* são intrinsecamente resistentes a essa classe de medicamentos (42,102).

Combinações de antifúngicos podem agir sinergicamente para aumentar a taxa de morte microbiana, encurtar o tempo de terapia, evitar o aparecimento de isolados resistentes, expandir o espectro de ação e diminuir efeitos tóxicos relacionados com o medicamento, podendo permitir a utilização de doses mais baixas de antifúngicos tóxicos. A criptococose é um exemplo de infecção fúngica invasiva contra a qual uma combinação terapêutica de antifúngicos é muito útil (61). Existem poucas opções terapêuticas para o tratamento da criptococose e o principal esquema recomendado por órgãos internacionais para o manejo dessa infecção não pode ser utilizado no Brasil devido à falta de disponibilidade de 5FC no país. (103,104).

Segundo documento emitido pelo Ministério da Saúde que estabelece quais os medicamentos essenciais devem estar disponíveis na rede pública de saúde, a Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME), a 5FC foi retirada da lista em 2006. No documento consta que devido ao fato de os micro-organismos apresentarem rápida resistência ao composto quando em monoterapia, a sua utilização seria justificada quando em associação com AMB, porém segundo o documento, o derivado azólico ITC poderia ser utilizado em substituição dessa associação sinérgica entre 5FC e AMB. Além disso, consta que 5FC pode causar diversos efeitos colaterais, além de ter sido retirada do mercado

brasileiro pelo fabricante. Por essas razões a 5FC foi excluída da RENAME (105) e atualmente não está disponível no mercado brasileiro.

1.3. Suscetibilidade aos antifúngicos

Infecções fúngicas requerem, geralmente, longos períodos de terapia com antifúngicos. Esses esquemas terapêuticos muitas vezes causam muitos efeitos colaterais e podem promover a resistência de alguns fungos aos diferentes antifúngicos. Essas razões enfatizam a necessidade de realização de testes de suscetibilidade *in vitro* para avaliar o comportamento desses micro-organismos frente aos quimioterápicos disponíveis (106).

Testes de suscetibilidade aos antifúngicos têm grande importância por guiarem as decisões clínicas com o objetivo de promover uma terapia apropriada contra os agentes fúngicos e melhores resultados para o paciente. O *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) publicou documentos padronizando os testes de suscetibilidade *in vitro* para fungos, levando em consideração alguns parâmetros como: pH do meio, inóculo, período e temperatura de incubação, concentração dos antifúngicos e o critério de leitura do teste. No ano de 2002, o CLSI lançou o documento M27-A2, que foi substituído pelo M27-A3 (CLSI, 2008). O princípio do método se baseia em expor um inóculo com concentração conhecida do micro-organismo a várias concentrações definidas do antifúngico. O teste é realizado com um meio de cultura que não interfere na atuação do antifúngico com o objetivo de definir a menor concentração *in vitro* do mesmo capaz de inibir o crescimento visível do micro-organismo a ser estudado (107). O documento padroniza os testes de suscetibilidade aos antifúngicos para leveduras, incluindo espécies de *Cryptococcus*.

As principais classes de antifúngicos a serem avaliadas são: poliênicos, derivados azólicos, análogo da pirimidina, alilaminas, e equinocandinas. O mecanismo de ação de cada classe define se o antifúngico exerce efeito fungicida ou fungistático (108).

Poliênicos como anfotericina B (AMB) e nistatina: interagem com ergosterol presente na membrana celular fúngica, produzindo poros ou canais que aumentam a permeabilidade da membrana, gerando uma grande perda de eletrólitos, como potássio e magnésio, determinando assim a lise e morte da célula, agindo como fungicidas (109). A AMB foi introduzida no tratamento de micoses em 1950 e apesar de sua elevada efetividade, possui alta toxicidade, principalmente nefrotoxicidade, mielotoxicidade e hepatotoxicidade. Sua administração é endovenosa e requer hospitalização para acompanhamento e monitoramento das funções fisiológicas. AMB sob a forma lipossomal está disponível no mercado, sendo de baixa toxicidade, fácil utilização, permitindo alcançar doses bem mais elevadas em curto espaço de tempo, independentemente da função renal, o que a coloca como excelente opção terapêutica. No entanto, o preço é extremamente elevado e poucos pacientes podem usufruir deste tratamento (104,110).

Azólicos como fluconazol (FCL), itraconazol (ITC), cetoconazol (KTC), voriconazol (VRC), ravuconazol (RVC), entre outros: inibem especificamente a biossíntese do ergosterol, principal constituinte da membrana citoplasmática. A inibição da síntese de ergosterol é feita por meio do bloqueio da enzima 14- α -demetilase, presente no citocromo P-450 da célula fúngica (111). O fluconazol é o principal representante da classe no tratamento da criptococose. Esse composto possui boa biodisponibilidade e menores efeitos adversos quando comparado à AMB. Normalmente, é administrado por via oral e é indicado nas fases de consolidação e manutenção do tratamento da criptococose. Além

disso, a administração de altas doses desse medicamento é indicada como opção terapêutica quando AMB e 5FC não estão disponíveis (61).

Análogo de pirimidina, a 5-fluocitosina (5FC) foi criada em 1957 como um potencial agente antitumoral, e usado pela primeira vez para tratar a candidíase e criptococose humana em 1968. A 5FC exerce a sua atividade antifúngica por meio da conversão rápida para 5-fluorouracil (pela enzima citosina desaminase, presente na célula fúngica), análogo da pirimidina, interferindo na síntese de DNA e na síntese de proteínas. A 5FC é sempre utilizada em combinação com outros antifúngicos porque podem surgir, rapidamente, isolados resistentes na monoterapia (104,112).

Alilaminas como a terbinafina (TRB): interferem na biossíntese do ergosterol pela inibição da enzima esqualeno epoxidase. Ocorre também o acúmulo de esqualeno, que se torna tóxico à célula fúngica e contribui para a morte celular (113). A TRB é utilizada no tratamento de onicomicoses e apesar de vários estudos demonstrarem a eficácia da TRB contra infecções por não-dermatófitos, incluindo candidíase resistente aos azólicos, aspergilose invasiva, cromoblastomicose crônica e fusariose disseminada, o papel do TRB no manejo destas infecções continua pouco explorado (114-116).

As equinocandinas (caspofungina, anidulafungina, micafungina) são antifúngicos inibidores específicos da síntese de 1,3- β -D-glucana, constituinte da parede celular fúngica. Estes antifúngicos inibem a ação da enzima β -1,3 glucano-sintase o que resulta em depleção de polímeros de glucano, destruindo a parede celular fúngica (102,117).

A resistência antifúngica para isolados de *Cryptococcus* é difícil de ser definida em laboratório devido à ausência de pontos de corte estabelecidos para interpretação dos resultados. Os valores estabelecidos para as espécies de *Candida* são extrapolados para interpretação dos resultados dos testes com *Cryptococcus*. Com o objetivo de detectar

resistência emergente aos antifúngicos, podem ser calculados pontos de cortes epidemiológicos (PCE) (118-121).

Os PCEs são calculados com base na distribuição dos valores de CIM para cada antifúngico e cada espécie de micro-organismo. Uma população de micro-organismos que se afasta dos valores normais da população selvagem (*wild type*) é classificada como uma população não selvagem (*non-wild type*). Um micro-organismo é definido como selvagem quando há ausência de mutações que levem a mecanismos de resistência a um composto utilizado contra ele. Um micro-organismo não selvagem é definido pela presença de mutação adquirida que leva a um mecanismo de resistência. Tanto micro-organismos designados como selvagens como os não selvagens podem ou não responder clinicamente ao composto em questão. O PCE é o mais alto valor de CIM que pertence a população selvagem do micro-organismo. Enquanto os pontos de cortes clínicos predizem os resultados da terapia, o papel do PCE é de detectar resistência emergente em isolados não selvagens com reduzida suscetibilidade ao agente avaliado. A determinação do PCE é uma tentativa de criar um panorama local do perfil de suscetibilidade de micro-organismos de uma determinada espécie frente a um determinado antifúngico em uma amostra. O PCE é determinado a partir do cálculo da moda e os micro-organismos com valores de CIM que ultrapassam o valor de PCE encontrado para um determinado antifúngico em uma determinada amostra podem vir a ser isolados resistentes (120).

Espinel-Ingroff et al. (120) encontraram valores de PCEs de 8 a 32 µg/mL para FCL, 0,25 a 1 µg/mL para ITC, 0,25 a 0,5 µg/mL para PSC 0,12 a 0,25 µg/mL para VRC para isolados do complexo *C.neoformans/C.gattii*.

Lockhart et al. (121) apresentaram valores de PCEs para a espécie *C.gattii*. Para FCL, VRC, ITC e PSC, os valores de PCEs foram 32, 0,5, 1 e 1 µg/mL, respectivamente.

No entanto, esses valores variaram quando cada genótipo foi avaliado separadamente, indicando que os valores de PCEs podem mudar quando se levar em conta o genótipo envolvido.

Pfaller et al. (118) encontraram valores de PCEs de 16 µg/mL para FCL, 0,25µg/mL para VRC e 0,5 µg/mL para PSC para isolados de *C.neoformans*.

A maioria dos fungos exige tratamentos antifúngicos longos e agressivos. A realização de combinações entre agentes antifúngicos com mecanismos de ação diferentes é uma abordagem terapêutica muito utilizada e que ainda merece ser investigada.

É possível classificar as interações entre os antifúngicos em três diferentes efeitos: sinérgico, indiferente e antagônico. O sinergismo ocorre quando o efeito do antifúngico em combinação for maior sobre os micro-organismos do que quando utilizado isoladamente. Se o efeito for menor, a interação é classificada como antagônica. Se o efeito resultante não apresentar diferença ao utilizar o antifúngico em combinação, comparado com a utilização isolada, tem-se o efeito indiferente. O antagonismo pode ocorrer entre dois compostos quando o mecanismo de ação de cada um deles for baseado em um mesmo alvo na célula fúngica (122). As combinações são utilizadas com o objetivo de se obter efeito sinérgico entre os agentes combinados, fazendo com que a concentração de cada composto se torne menor e menos tóxica.

Testes de suscetibilidade *in vitro* frente aos antifúngicos em combinação, podem ser realizados através do método de “tabuleiro de xadrez”. O método possibilita a combinação de dois antifúngicos em concentrações diferentes de forma que tanto a maior quanto a menor concentração de um agente antifúngico combinam com as respectivas concentrações de outro antifúngico a ser avaliado. A partir dessas concentrações é possível a determinação do Coeficiente de Inibição Fracional (CIF), que permite avaliar o tipo de interação entre as

substâncias a partir das concentrações inibitórias mínimas do antifúngico sozinho e em combinação (123,124).

1.4. Justificativa do estudo

A criptococose representa importante problema de saúde pública no Brasil, em razão das altas taxas de infecção em indivíduos imunossuprimidos e é a principal causa de morte entre as IFIs em pacientes com sida no Brasil. A infecção de sistema nervoso central é de difícil tratamento e apresenta recidivas frequentes, mesmo com tratamento antifúngico adequado. Os sobreviventes muitas vezes apresentam graves sequelas.

No mundo todo, o tratamento de escolha para a criptococose é a associação de AMB com 5FC. Porém, o tratamento desta micose no Brasil está baseado na utilização de AMB isoladamente ou associada ao FCL, devido à falta de disponibilidade da 5FC no mercado brasileiro, acarretando inúmeros efeitos colaterais aos pacientes, assim como a emergência de isolados resistentes.

Estudos que busquem otimizar a utilização dos agentes antifúngicos são de suma importância, dado o grave prognóstico das infecções causadas por patógenos como os pertencentes ao gênero *Cryptococcus* spp..

Associações de antifúngicos já utilizados podem vir a ser uma estratégia importante para o tratamento da criptococose em especial nos locais onde 5FC não está disponível para o tratamento, como no Brasil. Por essas razões, as associações envolvendo a TRB foram escolhidas para serem avaliadas. Além disso, estas associações foram comparadas com a associação AMB + FCL (utilizada na rotina do HC-UNICAMP) e com AMB + 5FC, associação recomendada pelos órgãos internacionais.

No Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (HC-UNICAMP), a criptococose representa importante micose oportunista. No período de 2007 a 2011 foram diagnosticados 77 casos de criptococose entre pacientes imunossuprimidos e imunocompetentes.

Em vista disso, o presente estudo foi proposto com a finalidade de estudar a ocorrência de espécies, genótipos e o perfil de suscetibilidade de isolados clínicos de *Cryptococcus* spp.. Ao mesmo tempo, houve o interesse na realização de busca ambiental de espécies de *Cryptococcus* em diversos locais usualmente habitados por pombos na cidade de Campinas. Estudos dessa natureza são necessários para um maior entendimento desses micro-organismos e das infecções causadas pelos mesmos. O conhecimento e diferenciação das espécies é de grande importância por serem espécies emergentes, principalmente em indivíduos imunossuprimidos.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Estudar a ocorrência de espécies e os genótipos de *Cryptococcus* spp. isolados de pacientes do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (HC-UNICAMP) assim como de isolados ambientais obtidos a partir de coletas realizadas em diferentes locais da cidade de Campinas-São Paulo.

2.2. Objetivos específicos

- Reativar isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. provenientes de pacientes com criptococose atendidos no HC-UNICAMP armazenados por um período de 5 anos (2007-2011);
- Avaliar a existência e a ocorrência de espécies *Cryptococcus* em amostras de excretas de pombos e a partir de ocos de árvores de diferentes localidades públicas de Campinas;
- Identificar as espécies e os genótipos dos isolados clínicos e ambientais de *Cryptococcus* spp.;
- Avaliar a suscetibilidade *in vitro* de isolados clínicos e ambientais de *Cryptococcus* spp. frente aos antifúngicos anfotericina B (AMB), 5-flucitosina (5FC), fluconazol (FCL); voriconazol (VRC); itraconazol (ITC) e terbinafina (TRB);
- Avaliar a suscetibilidade *in vitro* de isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. frente aos antifúngicos em quatro diferentes combinações: AMB + 5FC, AMB + FCL, AMB + TRB e FCL + TRB.

3. Material e Métodos

3.1. Local de trabalho

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Investigação em Fungos (LIF) do Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas (FCM-UNICAMP) e no Laboratório de Epidemiologia Molecular e Doenças Infecciosas (LEMDI) da Disciplina de Moléstias Infecciosas da Faculdade de Ciências Médicas (FCM-UNICAMP).

Esse trabalho foi Submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa – FCM e, por recomendação deste, foi retirado da Plataforma Brasil, uma vez que não utiliza material clínico de pacientes, e não houve consulta a informações de prontuários, apenas a avaliação de micro-organismos previamente isolados a partir de cultura do material clínico enviado para rotina diagnóstica do Setor de Micologia da Divisão de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas da UNICAMP.

3.2. Isolados Clínicos

3.2.1. Seleção dos micro-organismos para estudo

Para a realização desse trabalho, 110 isolados clínicos de *Cryptococcus* mantidos na Micoteca do LIF, previamente isolados de 77 pacientes a partir dos exames de rotina foram selecionados para serem reativados. Os isolados clínicos são provenientes de pacientes atendidos no HC-UNICAMP no período de janeiro de 2007 a dezembro de 2011 e estavam armazenadas pelo método de Castellani (125), sendo conservados à temperatura ambiente em frascos de vidro contendo água destilada estéril. Foi selecionado o primeiro isolado a partir de cada espécime clínico de cada um dos pacientes. Assim, para um paciente com meningite e fungemia, foram utilizados os primeiros isolados provenientes de ambos locais

de infecção que, nesse caso, foram de sangue e LCR. No apêndice 1, é possível a visualização de todos os isolados clínicos selecionados para esse estudo.

3.2.2. Reativação dos isolados

Os 110 isolados clínicos foram primeiramente colocados em tubos contendo meio YEPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose*; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), e deixados por 48 horas em agitador. Em seguida, foram repicados em ágar Sabouraud dextrose (ASD; Difco, Sparks, Maryland, EUA, Sparks, Maryland, EUA) e incubados a 30°C durante 48 a 72 horas para avaliação de viabilidade e pureza.

3.2.3. Identificação

Foi realizada no setor de Micologia da Divisão de Patologia Clínica-HC-UNICAMP a partir de metodologia clássica, desenvolvida no LIF, utilizando a combinação de características macroscópicas e micromorfológicas com realização de exame direto com tinta da China da amostra clínica e testes bioquímicos. A confirmação do gênero dos isolados de *Cryptococcus* spp. foi realizada pelo teste de hidrólise de ureia e a identificação das espécies se deu pelo teste de CGB (6,85). Nos casos inconclusivos foi realizado o sequenciamento da região ITS1 como descrito no item 3.5.

3.3. Isolados ambientais

Os isolados ambientais de *Cryptococcus* spp. foram obtidos a partir de amostras de excretas secas de pombos coletadas de diferentes locais públicos da Cidade de Campinas, a saber: Hospital de Clínicas da UNICAMP (HC-UNICAMP), Mercado Central, Largo do Rosário, Biblioteca Central da UNICAMP; Centro de Convivência e Teatro Castro Mendes (figura 3). Em cada localidade foram realizadas 2 coletas em diferentes ocasiões. Além das coletas de excretas de pombos, foram realizadas coletas de material de ocos de árvores,

realizadas com swab úmido (126). As coletas de ocos de árvores foram realizadas na Pontifícia Universidade Católica de Campinas Campus II (PUCC II), Parque Taquaral e Igreja Nossa Senhora do Carmo. Os locais de coleta selecionados foram os mesmos locais avaliados em estudo realizado em 2005, por nosso grupo de estudo em 2005 (127). Inicialmente, seriam realizadas apenas coletas de excretas de pombos. Porém, pelo baixo número de isolamentos de *C.neoformans* e *C.gattii* a partir das coletas, as pesquisadoras Márcia Lázera e Luciana Trilles (comunicação pessoal durante curso oferecido pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)), sugeriram que fossem realizadas algumas coletas em ocos de árvores. Por esta razão, as coletas em ocos de árvores foram realizadas em 3 localidades como experiência.



Figura 3: Exemplos de localidades públicas da cidade de Campinas onde foram realizadas coletas de excretas de pombos (1) Largo do Rosário; (2) HC-UNICAMP; (3) Biblioteca Central - UNICAMP; (4) Mercado Municipal de Campinas

3.3.1. Procedimento de coleta ambiental

Para ambos os tipos de coleta, foi necessária a utilização de equipamentos de proteção individual como luvas e máscara.

Excretas de pombos: as excretas secas e envelhecidas foram colhidas com o auxílio de espátulas e foram armazenadas em potes plásticos estéreis e levadas ao laboratório para processamento (item 3.3.2).

Ocos de árvores: as amostras foram coletadas com o auxílio de swab úmido, que foi utilizado para a realização de raspagem no oco de árvores. Antes da raspagem dos swabs nos locais desejados, os mesmos foram mergulhados em salina 0,85% estéril. Com os swabs úmidos foram realizadas sementeiras em placas de Petri contendo os meios de cultura: ágar *cornmeal* (ágar fubá) (Difco, Sparks, Maryland, EUA, Sparks, Maryland, EUA) com ácido cafeico (0,3 g/L) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e em placas de Petri com ASD (Difco, Sparks, Maryland, EUA, Sparks, Maryland, EUA), ambos suplementados com cloranfenicol em uma concentração final de 0,05 g/L. As sementeiras foram realizadas no próprio local da coleta e as placas foram levadas ao laboratório e incubadas de 3 a 15 dias a 30°C com acompanhamento diário do crescimento de colônias. Após crescimento satisfatório, cada colônia de levedura foi transferida para placas de ASD e incubada a 30°C por 72 horas para identificação posterior.

3.3.2. Preparação das amostras ambientais

As amostras fecais secas de pombos de cada localidade foram pesadas e para cada 1g de excreta foram adicionados 9 mL de salina (0,85%) estéril suplementada com cloranfenicol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em uma concentração final de 0,05 g/L (Ribeiro et al., 2008). Após vigorosa agitação mecânica em agitador mecânico (Taitec, Saitama-ken, Japan) a amostra ficou por cerca de 20 minutos a temperatura ambiente. Após esse período, 100 µL do sobrenadante foram semeados em placas de Petri com ágar *cornmeal* (ágar fubá) (Difco, Sparks, Maryland, EUA, Sparks, Maryland, EUA) com ácido cafeico (0,3 g/L) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e em placas de Petri com ASD

(Difco, Sparks, Maryland, EUA, Sparks, Maryland, EUA), ambos suplementados com cloranfenicol em uma concentração final de 0,05 g/L.

As placas foram incubadas de 3 a 15 dias a 30°C com acompanhamento diário do crescimento de colônias. Após, cada colônia de levedura foi transferida para placas de ASD e foram incubadas a 30°C por 72 horas para identificação.

3.3.3. Identificação dos isolados ambientais

A confirmação do gênero dos isolados de *Cryptococcus* foi realizada pelo teste de hidrólise de ureia. As culturas com teste de ureia positivo foram identificadas. Aquelas com teste negativo foram descartadas. A identificação das espécies se deu pelo teste de CGB e da técnica automatizada com a utilização de cartões de identificação de leveduras (cartões YST; VITEK® bioMérieux, Hazelwood, France). Os micro-organismos que não puderam ser identificados por essas técnicas foram submetidos à reação de sequenciamento de DNA da região ITS, com utilização os *primers* ITS1 e ITS4 (item 3.5).

3.4. Genotipagem de isolados clínicos e ambientais de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*

Para a genotipagem dos isolados clínicos e ambientais de *C.neoformans* e *C.gattii* foi utilizada a técnica de RFLP do gene *URA5* (*URA5*-RFLP), conforme Meyer et al. (7).

3.4.1. Extração de DNA

Para a extração do DNA foi utilizado o método de lise alcalina modificado. Em um tubo de polipropileno de 1,5 mL foram adicionados 50 µL de água destilada estéril e uma alça com o micro-organismo. A essa suspensão foram adicionados 50 µL de NaOH (100 mM). A amostra foi submetida à agitação vigorosa por 10 segundos e a seguir submetida a temperatura de 95°C por 15 minutos em banho seco. Em seguida, foram adicionados 11 µL

de Tris HCl (1M, pH 7,0) à amostra, que foi então submetida a centrifugação a 1397,5 g (5000 rpm) durante 2 minutos. A seguir o sobrenadante foi transferido para outro tubo para ser utilizado nas técnicas moleculares (128,129).

3.4.2. Amplificação do DNA alvo pela reação em cadeia da polimerase (PCR)

A amplificação do DNA fúngico foi realizada com a utilização dos oligonucleotídeos iniciadores URA5 (5' ATGTCCTCCCAAGCCCTCGACTCCG 3') e SJ01 (5' TTAAGACCTCTGAACACCGTACTC 3') (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). A PCR das amostras foi realizada em um tubo de polipropileno com capacidade para 200µL contendo 12,5 µL de PCR *Master Mix* (Promega, Fitchburg, WI, EUA), 10 mM de cada *primer*, 50 ng de DNA e água milli-Q para um volume final de 25µL. A reação de amplificação consistiu em desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 61°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos, além de uma extensão final a 72°C por 10 minutos. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os produtos da reação de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% a 100V por 30 minutos. O gel foi corado com brometo de etídio e os fragmentos foram visualizados em iluminação ultravioleta.

3.4.3. Incubação com as endonucleases *Cfr13I* e *HhaI*

Após amplificação, o DNA de cada amostra foi duplamente digerido com as endonucleases *Cfr13I*, isômero da *Sau96I* (10 U/µl), e *HhaI* (20 U/µl) (Thermo Fisher Scientific). A incubação das amostras foi realizada em um tubo de polipropileno de 200 µL contendo 0,5 µL de cada enzima, 3 µL do tampão Tango (fornecido pelo fabricante das enzimas - Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), 15 µL do produto de PCR e 11 µL de água milli-Q para um volume final de 30 µL. As amostras foram incubadas a 37°C

por 4 horas, em banho seco. Após a incubação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 3%, a 50V por 5 horas. O gel foi corado com brometo de etídio e os fragmentos foram visualizados em iluminação ultravioleta.

3.4.4. Controle de qualidade

Os perfis de *URA5*-RFLP dos isolados de *C.neoformans* e *C.gattii* foram atribuídos por comparação visual com os perfis obtidos de cepas de referência de cada um dos genótipos, sendo eles: CFP 55(WM 148, VNI), CFP 56 (WM 626, VNII), CFP 57 (WM 628, VNIII), CFP 58 (WM 629, VNIV) para *C.neoformans*, CFP 59 (WM 179, VGI), CFP 60 (WM 178, VGII), CFP 61 (WM 161, VGIII) e CFP 62 (WM 779, VGIV) para *C.gattii*. As cepas de referência de *C.neoformans* e *C.gattii* foram gentilmente cedidas pela pesquisadora Luciana Trilles da Fundação Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro (FIOCRUZ).

3.5. Identificação molecular pela técnica de sequenciamento da região *internal transcribed spacer* (ITS) do DNA ribossomal

O sequenciamento da região ITS (88,92), constituinte do DNA ribossomal foi realizado para os isolados ambientais que não puderam ser identificados pelas metodologias clássica e automatizada VITEK[®] (BioMérieux, Hazelwood-France). Além disso, o sequenciamento foi aplicado para confirmação de espécie de isolados clínicos que tiveram resultados de CGB e de RFLP discrepantes.

3.5.1. Amplificação do DNA

A amplificação do DNA extraído (conforme item 3.4.1) foi realizada por PCR, na qual foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores ITS1 (5'-GTCGTAACAAGGTTAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')

(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). A PCR foi realizada em um tubo contendo 12,5 µL de PCR Master Mix (Promega, Fitchburg, WI EUA), 10 mM de cada *primer*, 100 ng de DNA e água milli-Q para um volume final de 25 µL. Cada reação de amplificação realizada consistiu na desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, 40 ciclos compostos por: desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, além de uma extensão final a 72°C por 5 minutos. As reações de PCR foram realizadas em termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os produtos da reação de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, a 100V por 30 minutos. O gel foi corado com brometo de etídio e os fragmentos foram visualizados em iluminação ultravioleta.

3.5.2. Purificação dos produtos de PCR

Foi realizada a purificação dos produtos de PCR pela adição de 2 µL da enzima *Exosap*-IT (USB® Corporation, Cleveland, OH, EUA) a cada 5 µL de produto de PCR. A mistura foi mantida a 37°C por 30 minutos e a 80°C por 15 minutos para inativar a enzima *Exosap*-IT. A reação de purificação foi realizada em termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 2%, a 100V por 30 minutos. O gel foi corado com brometo de etídio e os fragmentos foram visualizados em iluminação ultravioleta.

3.5.3. Reação de Sequenciamento

Os produtos de PCR foram sequenciados com a utilização dos *primers forward* ITS1 e *reverse* ITS4 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), utilizando o *Big Dye*TM *Terminator* v.3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Para o sequenciamento, foram preparadas reações contendo 1 µL de *Big Dye Terminator*, 1 µL de tampão, 1 µL do *primer* ITS1 ou ITS4 (cada *primer* em tubo diferente)

a 1,6 mM, 2 µL do produto de PCR purificado e água milli-Q para um volume final de 10 µL. O ciclo consistiu de desnaturação inicial a 96°C por 1 minuto e 30 ciclos de 96°C por 10 segundos, 55°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos. A reação de sequenciamento foi realizada em termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

Após a reação de sequenciamento, as amostras passaram por precipitação e lavagem com etanol. Na primeira etapa, em cada amostra, foram adicionados 5 µL de EDTA (125mM) e 60 µL de etanol 100%. As amostras foram centrifugadas a 9447.1 g (13.000 rpm), a temperatura de 4°C por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e, em seguida, foram adicionados 60 µL de etanol 70% às amostras que foram centrifugadas a 9447.1 g (13.000 rpm), a temperatura de 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as amostras passaram por secagem a vácuo.

Após a precipitação e lavagem com etanol, foram acrescentados 10 µL de formamida HI-DI™ (Applied Biosystems, Warrington, UK) às amostras, que foram incubadas em banho seco a 95°C por 2 minutos. Em seguida, as amostras foram colocadas em gelo durante 2 minutos. As amostras foram aplicadas na placa de sequenciamento e levadas ao sequenciador. O sequenciamento foi realizado no sequenciador automático ABI Prism® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

As sequências de DNA *forward* e *reverse* obtidas para cada amostra foram alinhadas no programa ATSQ (Japan Software Inc., Japão) e a identidade foi avaliada por comparação com sequências disponíveis no banco de dados *GenBank* do *National Center for Biotechnology Information website* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), com a utilização do *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST).

3.6. Testes de suscetibilidade *in vitro*

Os testes de suscetibilidade *in vitro* frente aos antifúngicos sozinhos foram realizados para todos os isolados clínicos e para um representante de cada espécie, proveniente de cada coleta ambiental pelo fato de maioria dos isolados ambientais pertencerem a espécies que, até o momento, não são encontradas em amostras clínicas de pacientes atendidos no HC-UNICAMP. Nos testes com antifúngicos combinados, apenas os isolados clínicos foram avaliados.

3.6.1. Meio de cultura

Para todos os testes de suscetibilidade aos antifúngicos foi utilizado o meio de cultura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) com L-glutamina e glicose a 20%, sem bicarbonato de sódio, tamponado com 0,165 M de ácido morfolinopropanossulfônico (MOPS; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

3.6.2. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A avaliação da suscetibilidade *in vitro* frente aos antifúngicos isolados foi realizada de acordo com o documento M27-A3 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), 2008 (107) pelo método de microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Os antifúngicos avaliados foram anfotericina B (AMB), 5-flucitosina (5-FC), fluconazol (FCL), voriconazol (VRC), itraconazol (ITC) e terbinafina (TRB). Foram calculados os Pontos de Corte Epidemiológicos (PCE) para cada antifúngico avaliado frente aos isolados clínicos a partir do cálculo da moda, conforme estudos realizados recentemente (118-121).

3.6.2.1. Inóculo

Após o crescimento fúngico de 48 horas a 35°C, em placas de Petri contendo o meio ASD, o inóculo foi preparado adicionando-se 5 ml de solução de salina 0,85% a um tubo de ensaio ao qual foram adicionadas 2 a 3 unidades formadoras de colônia (UFC) do micro-organismo. A partir desta suspensão, foi realizada a contagem de células no retículo central de uma câmara de Neubauer com o objetivo de obter uma suspensão com $1,0 \times 10^4$ UFC/mL, sendo denominada de suspensão de trabalho do inóculo. Esta suspensão foi utilizada para testes com antifúngicos combinados (item 3.6.3.1) e para os testes para determinação da CIM da TRB (item 3.6.2.2.1).

3.6.2.2. Preparação das placas de microdiluição para antifúngicos isolados

Os testes de suscetibilidade frente aos antifúngicos isolados foram realizados com a utilização de placas de microdiluição pré-preparadas (*dry plates*) (Eiken Chemical Co., Tokyo, Japan) onde estão previamente dispostos os antifúngicos em diluições seriadas. Para os testes com *dry plates*, o inóculo final foi obtido a partir de uma suspensão de trabalho do inóculo preparada na concentração de 0,5 da escala de Mc Farland em um tubo de ensaio contendo 5 mL de solução de salina 0,85%. Para o inóculo final, foram adicionados 10 µL desta suspensão de trabalho a um volume de RPMI de 10 mL, resultado na concentração final de $0,5 - 2,5 \times 10^3$ UFC/mL.

Para os testes, foram adicionados 100 µL do meio de cultura RPMI contendo o inóculo na concentração final de $0,5 - 2,5 \times 10^3$ UFC/mL em todos os poços contendo os antifúngicos. Duas colunas de poços não contêm antifúngicos e nessas colunas são dispostos os controles de qualidade positivo (11ª coluna, contendo apenas o inóculo no meio de cultura RPMI) e controle negativo (12ª coluna, contendo apenas o meio de cultura RPMI). Foram avaliados AMB (faixa de concentração 0,03-16 µg/mL), 5FC (0,125-64

$\mu\text{g/mL}$), FLC (0,125-64 $\mu\text{g/mL}$), VRC (0,015-8 $\mu\text{g/mL}$) e ITC (0,015-8 $\mu\text{g/mL}$). O antifúngico TRB não faz parte da grade de antifúngicos da *dry plate*. Desta forma, os testes para esse composto foram preparados conforme item 3.6.2.2.1.

3.6.2.2.1. Concentração inibitória mínima de terbinafina (CIM-TRB)

O antifúngico TRB (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi preparado de acordo com a ficha de especificação do fabricante (ver preparação dos antifúngicos no item 3.6.3.3) ajustando-se à concentração desejada. A CIM de TRB foi determinada apenas para os isolados clínicos.

O teste foi realizado em placas de microtitulação, com fundo em U (estéril), para onde foram transferidos todos os componentes preparados anteriormente da seguinte forma: 20 μL do antifúngico diluído (item 3.6.3.3) nas diferentes concentrações até a 10^a coluna; 160 μL do meio de RPMI 1640 em todas as colunas e mais 20 μL de inóculo, na concentração de $1,0 \times 10^4$ UFC/mL (3.6.2.1) em todos os poços, exceto na 11^a coluna, que corresponde ao controle negativo. Na 12^a coluna, por se tratar do controle positivo de crescimento, não foi adicionado o antifúngico. Totalizou-se um volume final de 200 μL , resultando em uma concentração final do inóculo de $1,0 \times 10^3$ UFC/mL. A faixa de concentração utilizada para TRB foi 0,06 - 8 $\mu\text{g/mL}$.

3.6.2.3. Leitura de CIM

As placas foram incubadas na temperatura de 35°C, sendo a leitura realizada após 48 e 72 horas de incubação, comparando-se o crescimento fúngico de cada poço com o do controle positivo de acordo com o CLSI-M27-A3 (107), com o auxílio de um espelho reverso de leitura, que amplifica a imagem (figura 4).

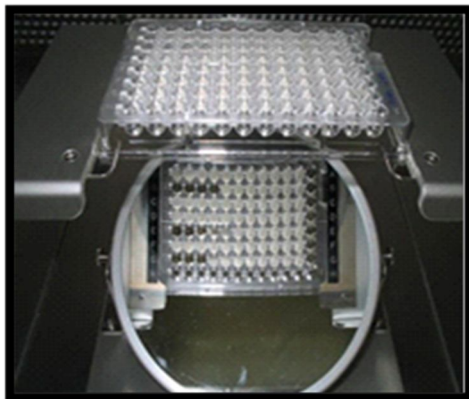


Figura 4: Placa de microtitulação sobre suporte com espelho reverso para leitura dos testes de suscetibilidade in vitro

O crescimento dos micro-organismos estudados foi numericamente determinado, de acordo com os seguintes critérios:

- escore 4: quando não houve nenhuma redução no crescimento, ou seja 100% de crescimento e 0 % de inibição do crescimento;
- escore 3: quando ocorreu leve redução no crescimento, 80% de crescimento e apenas 20% de inibição de crescimento em comparação ao do obtido no controle positivo;
- escore 2: quando houve significativa redução no crescimento, isto é 50% de crescimento em comparação com o controle positivo do teste e 50% de inibição de crescimento;
- escore 1: quando ocorreu 20% de crescimento e 80% de inibição de crescimento em comparação ao crescimento obtido no controle positivo;
- escore 0 (zero): para ausência de crescimento visível. Resultado esperado para antifúngicos com mecanismo de ação fungicida.

A leitura do crescimento fúngico de todas as placas também foi realizada com auxílio de espectrofotômetro V Max Kinetic Reader® ($\lambda = 450 \text{ nm}$), com a utilização do programa computacional SoftMax® Pro Data Acquisition & Analysis Software.

Segundo o CLSI, a CIM para a AMB foi definida como sendo a menor concentração deste antifúngico capaz de inibir 100% do crescimento (escore 0). As CIMs dos demais agentes antifúngicos (5FC, FCL, VRC e ITC) foram determinadas como sendo a mais baixa concentração desses agentes que causou resultado em 50% (escore 2) de inibição do crescimento, com exceção de TRB para qual a CIM foi definida como taxa de inibição de crescimento de 80% (escore 1) quando comparados ao controle positivo. A CIM para o antifúngico TRB não está padronizada no documento do CLSI M27-A3 (107).

3.6.3. Teste de suscetibilidade *in vitro* aos antifúngicos em combinação para determinação do Coeficiente de Interação Fracional (CIF)

Para os testes de suscetibilidade *in vitro* frente aos antifúngicos em combinação, foi realizado o método de “tabuleiro de xadrez” (123,124) em 4 combinações distintas de antifúngicos, a saber: AMB + 5FC, AMB + FCL, AMB + TRB e FCL + TRB.

3.6.3.1. Preparação do inóculo

A suspensão de trabalho do inóculo foi preparada conforme descrito no item 3.6.2.1.

3.6.3.2. Antifúngicos

Foram preparadas, para os testes com antifúngicos em combinação, diluições seriadas de cada fármaco. Os antifúngicos empregados nos testes foram AMB, 5FC, FCL e TRB (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), sendo esse último também utilizado nos testes para determinação da CIM (item 3.6.2.2.1). O intervalo de concentração para AMB foi de 0,06 a 8 µg/mL, de 0,06 a 8 µg/mL para 5FC, de 0,25 a 16 µg/mL para FCL e 0,06 a 8 µg/mL para TRB.

3.6.3.3. Preparação dos antifúngicos

Para preparação da solução estoque foi pesado 12,8 mg de cada um dos antifúngicos, que foram dissolvidos em dimetilsulfoxido (DMSO; Sigma-Aldrich, St.

Louis, MO, EUA) (solução-mãe de 12.800 µg/mL). A solução foi armazenada em microtubos de polipropileno com tampa, mantidos a -20°C por até 6 meses. As concentrações desejadas foram obtidas a partir da solução mãe e água destilada estéril foi utilizada com diluente.

3.6.3.4. Preparação das placas para testes com antifúngicos em combinação

O teste foi realizado em placas de microtitulação, com fundo em U (estéril). Para a execução do teste colocou-se, no sentido vertical da placa, 20 µL do antifúngico A em suas diferentes concentrações em todos os poços da placa de microtitulação até a fileira 8; colocou-se, no sentido horizontal da placa, 20 µL do antifúngico B em todos os poços até a coluna 8 (figura 4); 140 µL do meio de cultura foi adicionado em todos os poços da placa e em seguida adicionou-se 20 µL do inóculo ($1,0 \times 10^4$ UFC) em todos os poços até a coluna 8. A coluna 11 corresponde ao controle negativo do teste que contém apenas o meio de cultura. A coluna 12 corresponde ao controle positivo, que contém o inóculo e o meio de cultura. O volume final de cada poço foi de 200 µL. Neste trabalho, a avaliação dos antifúngicos isolados foi realizada em placas individuais (item 3.6.2), não sendo, portanto, os antifúngicos adicionados na placa de teste de antifúngicos em combinação. A concentração final do inóculo foi de $1,0 \times 10^3$ UFC.

3.6.3.5. Leitura do teste de suscetibilidade *in vitro* aos antifúngicos em combinação e determinação do Coeficiente de Interação Fracional (CIF)

A leitura tanto visual, com auxílio de espelho de leitura quanto realizada por espectrofotômetro foi realizada após 48 e 72 horas de incubação para determinação do tipo de interação existente (123,124). A CIM de cada antifúngico em combinação é correspondente a menor concentração onde não é observado crescimento fúngico, ou seja, score 0, como pode ser visualizado na figura 5, onde os poços sombreados de cinza

representam crescimento do micro-organismo e as CIMs dos antifúngicos em combinação estão destacadas com setas pretas.

As placas foram incubadas na temperatura de 35°C. A leitura das placas foi realizada com auxílio de um espelho de leitura e em espectrofotômetro ($\lambda = 450$ nm) V Max Kinetic Reader® após 48 e 72 horas de incubação.

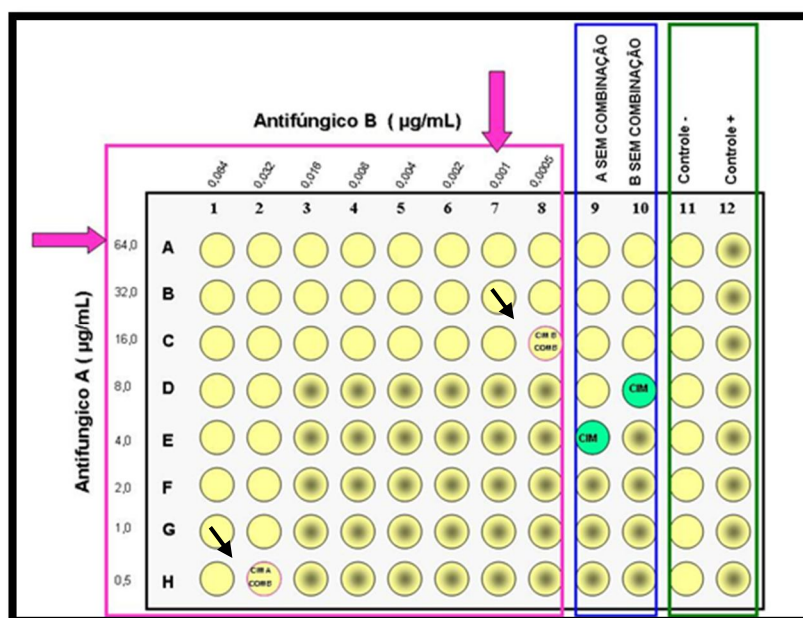


Figura 5: Esquema representativo da montagem e leitura da placa de microdiluição no teste de combinação de antifúngicos pelo método do “Tabuleiro de xadrez”

Após a leitura das placas o tipo de interação entre os antifúngicos avaliados foi avaliado por meio do cálculo do Coeficiente de Interação Fracional (CIF), obtido pela fórmula: $CIF = [CIMA \text{ em combinação} / CIMA \text{ sozinha}] + [CIMB \text{ em combinação} / CIMB \text{ sozinha}]$. As interações entre os antifúngicos foram definidas da seguinte forma: sinergismo se $CIF \leq 0,5$; indiferença se $CIF > 0,5 - \leq 4$ e antagonismo $CIF > 4$ (123,124,130).

3.6.4. Controle de Qualidade

Para validação dos testes com antifúngicos, foram utilizadas as cepas padrão de *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida krusei* ATCC 6258. Para cada diluição de antifúngicos realizou-se o teste de suscetibilidade com as cepas padrão, tendo seus resultados de CIM comparados com os valores estabelecidos pelo CLSI M27-A3 (107). Não havendo concordância com os valores estabelecidos, a diluição de antifúngicos foi desprezada preparando-se uma nova diluição até que esta estivesse de acordo com os parâmetros estabelecidos.

3.6.5. Análise estatística

Foi realizada análise exploratória de dados através de medidas resumo (frequência) dos dados categóricos e estatísticas descritivas dos dados quantitativos. Para análise comparativa das CIMs dos antifúngicos em relação aos genótipos, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. Para comparação da variação da sensibilidade dos antifúngicos associados em relação aos antifúngicos isolados foi utilizado o teste de Wilcoxon e o nível de significância adotado para as análises foi de $P < 0,05$ (131,132). Para análise estatística foi utilizado o programa computacional: *The SAS System for Windows (Statistical Analysis System)*, versão 9.3. (SAS Institute INC, 2002-2008, Cary, NC, USA).

Devido ao pequeno número de isolados clínicos de *C.gattii*, foram acrescentados 5 isolados, provenientes de pacientes atendidos em anos anteriores ao período determinado do estudo (5 anos), para a realização do tratamento estatístico. Os resultados desses isolados não estão expostos nas tabelas do presente trabalho, pois foram apenas utilizados para discussão estatística e serão publicados em conjunto no manuscrito submetido.

4. Resultados

4.1. Isolados clínicos

4.1.1. Reativação dos micro-organismos selecionados para o estudo

Dos 110 isolados armazenados, foi possível reativar 75 isolados clínicos de *Cryptococcus* spp., mesmo após sucessivas tentativas de reativação em meio YEPD, representando amostras de 52 pacientes. Deste modo, a taxa de recuperação foi de 68,18%. No apêndice 1, todos os isolados clínicos selecionados para o presente estudo podem ser visualizados.

4.1.2. Identificação dos isolados clínicos

Todos os isolados clínicos apresentaram resultado positivo para o teste de hidrólise de ureia. No teste de CGB, 65 isolados tiveram resultado negativo e 7, resultado positivo, sendo os primeiros classificados como *C.neoformans* e os últimos como *C.gattii*. Dois isolados (LIF: 418 e LIF: 526) foram inicialmente identificados e liberados como *C.neoformans* por apresentarem resultado de CGB inconclusivo, porém por técnicas moleculares ambos os isolados foram identificados como *C.gattii*. O isolado LIF 435 foi identificado como *Cryptococcus* spp., e por se tratar de um único isolado deste paciente em material não nobre, escarro, foi liberado com a identificação somente até gênero, pois não foi realizado o teste de CGB para este isolado. Porém, por técnicas moleculares (RFLP-*URA5* e sequenciamento, itens 4.3 e 4.4) a espécie foi determinada como *C.neoformans*. Na tabela 1 é possível a visualização dos isolados clínicos reativados agrupados por paciente.

Tabela 1: Micro-organismos reativados para o estudo, agrupados por grupos de espécimes clínicos de cada paciente

Nº LIF	HC	Data	Material	Dados clínicos	Identificação		Genótipo
					Clássica	Molecular	
390	3951705	08/12/08	LCR	meningite	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>	VNI
394	3951705	09/12/08	Sangue	sepsse	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>	VNI
376	4349284	28/11/07	LCR	baixo nível SNC	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>	VNI
383	4349284	26/11/07	Sangue	sepsse	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>	VNI
349	5154252	25/05/07	LCR	SIDA	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>	VNI
319	5357256	11/01/07	Sangue	febre	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>	VNI
324	5357256	08/01/07	Urina	febre a esclarecer	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>	VNI
325	5357256	08/01/07	LCR	febre	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>	VNI
536	5409883	01/12/11	LCR	SIDA	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>	VNI
538	5409883	02/12/11	Escarro	SIDA	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>	VNI
556	5409883	23/11/11	Sangue	SIDA	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>	VNI
442	5494163	10/09/09	LCR	neurocriptococose	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>	VNII
321	5833062	01/01/07	LCR	meningite	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>	VNI
352	7092844	02/06/07	LCR	neurocriptococose	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>	VNI
439	7295452	01/07/09	LCR	SIDA	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>	VNI
495	7663479	13/03/10	LCR	SIDA	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>	VNI
521	7663479	13/04/10	Sangue	SIDA	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>	VNI
535	8291934	28/11/11	LCR	meningite	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>	VNI
560	8291934	29/11/11	Sangue	tx renal	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>	VNI
451	8313988	23/11/09	LPL	CAPD	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>	VNII
499	8387745	03/05/10	LCR	meningite	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>	VNI
517	8449842	31/08/10	Sangue	SIDA	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>	VNI
527	8551085	21/01/11	LCR	meningite	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>	VNI
435	8656506	14/05/09	BAL	pneumonia de repetição	<i>Cryptococcus sp</i>	<i>C.neoformans**</i>	VNI
529	8700012	19/09/11	LCR	meningite	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>	VNI
518	8736487	05/10/10	Sangue	SIDA	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>	VNI
452	9137743	27/11/09	LCR	cefaléia	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>	VNI
476	9137743	28/11/10	Sangue	febre a/e	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>	VNI
360	9147481	19/07/07	LPL	não informado	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>	VNI
454	9157701	16/01/09	Sangue	transplante renal	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>	VNI
328	9464477	05/02/07	LCR	confusão mental	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>	VNI
362	9797802	13/08/07	BAL	tuberculose	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>	VNII
506	9870980	17/06/10	BAL	nódulo	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>	VNI
402	9945588	14/03/08	SANGUE	não informado	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>	VNI
418	9987647	22/10/08	LCR	não informado	<i>C.neoformans</i>	<i>C.gattii*</i>	VGII
502	10024666	21/05/10	LCR	meningite	<i>C.gatti</i>	<i>C.gattii</i>	VGII
504	10024666	06/06/10	massa mediastinal	massa mediastinal	<i>C.gatti</i>	<i>C.gattii</i>	VGII

BAL: lavado brônquico; LAS: líquido ascítico; LCR: líquido; LPL: líquido peritoneal; febre a/e: febre a esclarecer; SIDA: síndrome da imunodeficiência adquirida; SNC: sistema nervoso central; TX transplante; CAPD: diálise peritoneal; (*) isolados identificados como *C.neoformans* pelas metodologias clássicas e como *C.gattii* pelas metodologias moleculares; (**) isolado inicialmente identificado como *Cryptococcus* spp. e identificado como *C.neoformans* pelas metodologias moleculares

Nº LIF	HC	Data	Material	Dados clínicos	Identificação		Genótipo
					Clássica	Molecular	
408	10049080	19/05/08	LCR	cripto pulmonar	<i>C.gatti</i>	<i>C.gattii</i>	VGII
417	10231683	11/10/08	LCR	Alteração SNC	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>	VNI
421	10231683	11/10/08	SANGUE	febre	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>	VNI
426	10260713	30/12/08	LCR	febre/cefaléia	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>	VNI
432	10371732	13/04/09	BAL	massa torácica	<i>C.gatti</i>	<i>C.gattii</i>	VGII
467	10494297	29/08/10	Sangue	Controle	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>	VNI
445	10510053	16/10/09	LAS	não informado	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>	VNI
450	10510053	06/11/09	LPL	dissúria	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>	VNI
468	10510053	16/10/10	Sangue	não informado	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>	VNI
448	10542575	22/10/09	LCR	neurocriptococose	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>	VNI
474	10554475	23/11/10	Sangue	febre/SIDA	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>	VNI
470	10563892	14/11/10	Sangue	SIDA	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>	VNII
487	10600731	27/10/10	Sangue	febre	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>	VNI
505	10682038	09/07/10	Sangue	SIDA	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>	VNI
507	10682038	05/07/10	LCR	SIDA	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>	VNI
514	10797766	21/08/10	LCR	neurocriptococose	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>	VNI
526	10799855	07/01/11	BAL	tuberculose	<i>C.neoformans</i>	<i>C.gattii</i> *	VGII
522	10890972	03/01/11	pele	Cisticercose	<i>C.gatti</i>	<i>C.gattii</i>	VGII
524	10890972	10/01/11	LCR	Cisticercose	<i>C.gatti</i>	<i>C.gattii</i>	VGII
534	11094927	25/11/11	LCR	meningite	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>	VNI
550	11094927	21/12/11	SET	SIDA	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>	VNI
557	11094927	27/11/11	Sangue	meningite	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>	VNI
548	11157705	12/11/11	LCR	SIDA	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>	VNI
552	11157705	08/11/11	Sangue	SIDA	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>	VNI
525	11166794	30/11/11	pele	Úlcera de mão	<i>C.gatti</i>	<i>C.gattii</i>	VGII
544	11178759	08/12/11	LCR	SIDA	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>	VNI
551	11178759	19/12/11	BAL	SIDA	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>	VNI
564	11178759	06/12/11	Sangue	SIDA	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>	VNI
357	70715924	12/06/07	LCR	Meningite	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>	VNI
393	71444601	06/12/08	Sangue	SIDA	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>	VNI
398	80185854	19/02/08	LCR	neurocriptococose	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>	VNI
440	91139850	02/09/09	LCR	neurocriptococose	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>	VNI
463	91139850	22/08/10	Sangue	febre a esclarecer	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>	VNI
478	91749576	28/12/10	Sangue	pneumonia	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>	VNI
480	91749576	29/12/10	LCR	meningite	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>	VNI
488	91749576	01/01/10	Escarro	SIDA	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>	VNI
492	100335870	12/03/10	LCR	SIDA	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>	VNI
411	100477769	05/06/08	LCR	não informado	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>	VNI

BAL: lavado brônquico; LAS: líquido ascítico; LCR: líquido; LPL: líquido peritoneal; febre a/e: febre a esclarecer; SIDA: síndrome da imunodeficiência adquirida; SNC: sistema nervoso central; TX transplante; CAPD: diálise peritoneal; (*) isolados identificados como *C.neoformans* pelas metodologias clássicas e como *C.gattii* pelas metodologias moleculares; (**) isolado inicialmente identificado como *Cryptococcus* spp. e identificado como *C.neoformans* pelas metodologias moleculares

4.2. Isolados ambientais

No presente trabalho, foram realizadas 15 coletas ambientais na cidade de Campinas, sendo 12 delas a partir de excretas de pombos e 3 realizadas a partir de material de ocos de árvores. A partir das coletas realizadas, foram obtidos 92 isolados de *Cryptococcus* spp.. Desse total, 11 pertencem à espécie *C.neoformans*, 38 foram identificados como *C.laurentii*, 29 como *C.albidus*, 2 como *C.flavescens*, e 12 isolados foram identificados até gênero, sendo classificados como *Cryptococcus* spp.. Do total de coletas de excretas de pombos realizadas, 9 foram positivas para a presença de espécies de *Cryptococcus* spp., o que pode ser visualizado na tabela 2.

A quantidade de excretas encontradas durante a colheita foi muito variável e foi observado que em muitos locais eram realizadas limpezas diárias dos ambientes, não ocorrendo acúmulo de excretas, apesar da presença dos pombos.

Os isolados de *Cryptococcus* encontrados mostraram, em meio ASD, colônias com aspecto superficial brilhante, liso, com consistência cremosa a mucoide, coloração branca a bege, que com o passar dos dias fluíam na superfície dos meios. No meio de ágar *Cornmeal* com ácido cafeico, as colônias apresentaram coloração que variou de bege a marrom claro e ao marrom escuro (isolados de *C.neoformans*).

Na classificação bioquímica, foram positivos para a prova da hidrólise da ureia e tiveram resultados variáveis na prova com meio CGB. Para confirmação das espécies de isolados ambientais de *Cryptococcus* spp. foi utilizada a técnica automatizada VITEK II (bioMerieux) e reação de sequenciamento quando necessário. O apêndice 2 mostra os testes realizados para a identificação de cada isolado ambiental obtido.

Tabela 2: Localidades públicas da cidade de Campinas onde foram realizadas coletas de excretas de pombos e espécies de *Cryptococcus* spp. obtidas

Local de Coleta	Data	Quantidade de fezes (g)	Presença <i>Cryptococcus</i> spp.	Espécie <i>Cryptococcus</i> (n)
Largo do Rosário	03/08/2012	4g	Não	Não houve crescimento
HC-UNICAMP	17/08/2012	13g	Sim	<i>Cryptococcus laurentii</i> (5)
Mercado Público	31/08/2012	4g	Sim	<i>Cryptococcus laurentii</i> (5)
HC-UNICAMP	19/09/2012	3g	Sim	<i>Cryptococcus neoformans</i> (11) <i>Cryptococcus laurentii</i> (3)
Largo do Rosário	03/10/2012	6g	Sim	<i>Cryptococcus laurentii</i> (8) <i>Cryptococcus albidus</i> (3)
Mercado Público	30/08/2013	5g	Não	Não houve crescimento
Biblioteca Central	30/08/2013	9g	Sim	<i>Cryptococcus albidus</i> (6)
Biblioteca Central	16/09/2013	3g	Sim	<i>Cryptococcus albidus</i> (10)
Teatro Castro Mendes	10/10/2013	1g	Sim	<i>Cryptococcus albidus</i> (3)
Centro de convivências	10/10/2013	3g	Sim	<i>Cryptococcus albidus</i> (1)
Centro de convivências	21/11/2013	1g	Não	Não houve crescimento
Teatro Castro Mendes	21/11/2013	1g	Sim	<i>Cryptococcus laurentii</i> (14) <i>Cryptococcus albidus</i> (6)

As espécies isoladas a partir de coletas de excretas de pombos foram *C.neoformans*, *C.laurentii* e *C.albidus* (tabela 2), enquanto que as espécies isoladas a partir do material obtido de árvores foram *C.flavescens* e *C.laurentii*. Além das espécies identificadas, 12 isolados foram classificados até gênero (tabela 3). A espécie *C.gattii* não foi isolada em nenhuma das amostras ambientais.

Em 2 das 3 coletas realizadas com swab úmido em ocos de árvores, foi possível o isolamento de espécies de *Cryptococcus* spp..

Tabela 3: Localidades públicas da cidade de Campinas-SP onde foram realizadas coletas de material de ocos de árvores, com a utilização de swab úmido e as espécies de *Cryptococcus* spp. obtidas

Local de Coleta	Data	Presença de <i>Cryptococcus</i> spp.	Espécie <i>Cryptococcus</i> (n)
Parque Taquaral	27/08/2013	Sim	<i>Cryptococcus flavescens</i> (2) <i>Cryptococcus</i> spp.(12)
PUCC	10/10/2013	Não	Não houve isolamento
Igreja N ^a Sr ^a do Carmo	10/10/2013	Sim	<i>Cryptococcus laurentii</i> (3)

Os isolados classificados como *C.neoformans*, *C.laurentii* e *C.albidus* foram identificados pela metodologia automatizada VITEK II (bioMerieux). Os isolados de *C.flavescens* e *Cryptococcus* spp. foram identificados pela técnica de sequenciamento da região ITS (item 4.4). A técnica VITEK não possibilitou a identificação destes isolados.

O isolado LR11 foi sequenciado, pois o equipamento VITEK, com 91% de probabilidade, o identificou como *C.neoformans*. Por apresentar resultado positivo de CGB, seria identificado como *C.gattii*. Para a confirmação da identificação desse isolado, foi realizado o sequenciamento (item 4.4).

4.3. Genotipagem de isolados clínicos e ambientais de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*

Os perfis de *URA5*-RFLP dos isolados de *C.neoformans* e *C.gattii* foram atribuídos por comparação visual com os perfis obtidos de isolados de referência de cada um dos genótipos (figura 6), sendo eles VNI, VNII, VNIII e VNIV para *C.neoformans* e VGI, VGII, VGIII e VGIV para *C.gattii*.

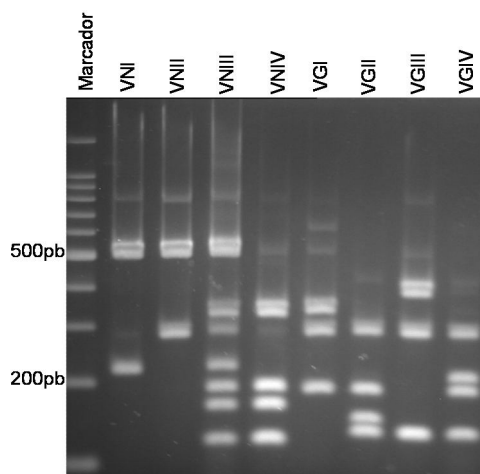


Figura 6: Figura 6: Gel de agarose a 3% com perfis de URA5-RFLP dos 8 genótipos de *C.neoformans* (VNI-VNIV) e *C.gattii* (VGI-VGIV) utilizados para a determinação dos perfis de RFLP dos isolados clínicos e ambientais de *C.neoformans* e *C.gattii*

Na genotipagem dos isolados clínicos de *Cryptococcus* spp., 2 isolados que foram inicialmente classificados como *C.neoformans*, foram identificados como *C.gattii*, ao apresentarem o perfil VGII na técnica de URA5-RFLP, que corresponde à essa espécie. Esse resultado foi confirmado por sequenciamento (item 4.4, tabela 4). Desta forma, do total de 75 isolados clínicos de *Cryptococcus* spp., 66 foram classificados como *C.neoformans* e 9 como *C.gattii*.

Assim, dos 75 isolados clínicos estudados, 62 (82,6% do total) pertencem ao genótipo VNI (*C.neoformans*) e 4 (5,3% do total) ao VNII (*C.neoformans*). Todos os 9 isolados de *C.gattii* analisados pertencem ao genótipo VGII (12% do total). Os 11 isolados ambientais de *C.neoformans* encontrados pertencem ao genótipo VNI.

Os 5 isolados de *C.gattii* incluídos no estudo para análise estatística pertencem ao genótipo VGII.

4.4. Sequenciamento

Ao todo, foram sequenciados 2 isolados clínicos e 15 isolados ambientais (tabela 4). Os isolados clínicos sequenciados foram classificados como *C.gattii*. A análise das sequências desses isolados clínicos obtidas por sequenciamento confirmaram os resultados encontrados com a técnica de *URA5-RFLP*, sendo classificados como *C.gattii* com 100% de identidade com essa espécie.

Foram sequenciados 15 isolados ambientais que não puderam ser identificados pela metodologia clássica e pela metodologia automatizada do VITEK. Do total de 15 isolados ambientais sequenciados, 12 foram classificados até gênero. Destes, 2 isolados tiveram 98% de identidade com a espécie *C.yokohamensis*. Dessa forma, foram classificados como *Cryptococcus* spp.. Testes complementares devem ser feitos para confirmar a identificação desses isolados.

Dois isolados foram identificados como *C.flavescens*, tendo 100% de identidade com a sequência depositada no banco de dados *GenBank* (NCBI) e 1 isolado foi identificado como *C.laurentii* (isolado LR11) Os números de acesso podem ser visualizados na tabela 4.

O isolado LR11 foi sequenciado, pois o equipamento VITEK, com 91% de probabilidade, o identificou como *C.neoformans* e por apresentar resultado positivo de CGB, seria identificado como *C.gattii*. Para a confirmação, foi realizado o sequenciamento que o classificou como *C.laurentii* com 100% de identidade com a sequência depositada no banco de dados.

Tabela 4: Identificação molecular de isolados clínicos e ambientais de *Cryptococcus* spp. pela técnica de sequenciamento da região ITS do DNA ribossomal com os primers ITS1 e ITS4

Identificação	Origem	Sequenciamento ITS1 e ITS4	Identidade	Nº de acesso GenBank
LIF 418	clínica	<i>C.gattii</i>	100%	JQ812708.1
LIF 526	clínica	<i>C.gattii</i>	100%	JQ812708.1
T1	ambiental	<i>C.flavescens</i>	100%	KF850393.1
T2	ambiental	<i>Cryptococcus</i> spp.	94%	AY518273.1
T3	ambiental	<i>Cryptococcus</i> spp. ^a	98%	HM222928.1
T5	ambiental	<i>Cryptococcus</i> spp. ^a	98%	HM222928.1
T7	ambiental	<i>Cryptococcus</i> spp.	96%	AY518273.1
T9	ambiental	<i>Cryptococcus</i> spp.	91%	AY518273.1
T10	ambiental	<i>Cryptococcus</i> spp.	93%	AY518273.1
T11	ambiental	<i>C.flavescens</i>	100%	KF850393.1
T12	ambiental	<i>Cryptococcus</i> spp.	94%	AY518273.1
T13	ambiental	<i>Cryptococcus</i> spp.	95%	AY518273.1
T14	ambiental	<i>Cryptococcus</i> spp.	93%	AY518273.1
T15	ambiental	<i>Cryptococcus</i> spp.	100%	AY518273.1
T16	ambiental	<i>Cryptococcus</i> spp.	94%	AY518273.1
T17	ambiental	<i>Cryptococcus</i> spp.	94%	AY518273.1
LR11	ambiental	<i>C.laurentii</i>	100%	HM469461.1

T: Parque Taquaral; LR: Largo do Rosário; (a): isolado com 98% de identidade com *C.yokohamensis*;

4.5. Testes de suscetibilidade *in vitro*

4.5.1. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Na tabela 5 é possível a visualização dos resultados de CIM obtidos de cada um dos 75 isolados clínicos provenientes de 52 pacientes frente aos antifúngicos AMB, 5FC, FCL, VRC, ITC e TRB. Os isolados estão agrupados por paciente.

Tabela 5: Dados de Concentração inibitória mínima (CIM) obtidos para os isolados clínicos agrupados por paciente

Nº LIF	Paciente	Material	Identificação	Genótipo	Teste de CIM para antifúngicos isolados					
					AMB	5FC	FCL	VRC	ITC	TRB
390	1	LCR	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	1	2	0,06	0,125	1
394	1	Sangue	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,5	2	0,03	0,125	0,25
376	2	LCR	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	≤0,125	4	0,06	0,125	0,25
383	2	Sangue	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,125	1	4	0,06	0,125	0,5
349	3	LCR	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	1	4	0,06	0,25	0,5
319	4	Sangue	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,125	0,5	0,25	0,125	0,125	0,25
324	4	Urina	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,125	1	2	0,03	0,03	0,25
325	4	LCR	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	1	4	0,06	0,03	0,125
536	5	LCR	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,125	0,25	4	0,06	0,06	1
538	5	Escarro	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,125	0,25	2	0,03	0,06	2
556	5	Sangue	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	1	4	0,06	0,06	1
442	6	LCR	<i>C.neoformans</i>	VNII	0,5	2	2	0,06	0,125	2
321	7	LCR	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,125	0,5	4	0,03	0,125	0,5
352	8	LCR	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	2	4	0,06	0,125	0,25
439	9	LCR	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	2	2	0,03	0,125	0,5
495	10	LCR	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,5	1	2	0,03	0,125	2
521	10	Sangue	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,5	1	4	0,03	0,06	0,5
535	11	LCR	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,5	2	0,06	0,06	0,5
560	11	Sangue	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	2	4	0,06	0,06	0,5
451	12	LPL	<i>C.neoformans</i>	VNII	0,25	0,25	0,5	<0,015	0,25	0,25
499	13	LCR	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	2	1	0,03	0,125	1
517	14	Sangue	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,5	2	0,03	0,06	1
527	15	LCR	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	1	4	0,06	0,06	0,5
435	16	BAL	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,5	2	4	0,03	0,125	2
529	17	LCR	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	1	8	0,06	0,125	2
518	18	Sangue	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	2	4	0,03	0,125	1
452	19	LCR	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,5	1	2	0,03	0,125	1
476	19	Sangue	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,125	0,25	2	0,06	0,06	1
360	20	LPL	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,5	4	0,06	0,06	1
454	21	Sangue	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,5	1	4	0,06	0,125	0,5
328	22	LCR	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,125	0,5	4	0,03	0,06	0,5
362	23	BAL	<i>C.neoformans</i>	VNII	0,5	0,5	4	0,03	0,125	0,5
506	24	BAL	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,5	2	2	≤0,015	0,06	1
402	25	SANGUE	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,5	4	0,125	0,125	0,5
418	26	LCR	<i>C.gattii</i>	VGII	0,25	1	2	0,125	0,125	1
502	26	LCR	<i>C.gattii</i>	VGII	1	2	8	0,25	0,25	4
504	27	massa mediastinal	<i>C.gattii</i>	VGII	0,25	0,5	2	0,06	0,06	2
408	28	LCR	<i>C.gattii</i>	VGII	0,25	0,5	2	0,06	0,125	1
417	29	LCR	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,5	2	0,06	0,06	0,25
421	29	SANGUE	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,125	0,5	0,5	≤0,015	0,06	0,25
426	30	LCR	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,5	2	2	0,03	0,125	1

BAL: lavado brônquico; LAS: líquido ascítico; LCR: líquido; LPL: líquido peritoneal; CIM: concentração inibitória mínima; AMB: anfotericina B; 5FC: 5-flucitosina; FCL: fluconazol; VRC: voriconazol; ITC: itraconazol; TRB: terbinafina.

Nº LIF	Paciente	Material	Identificação	Genótipo	Teste de CIM para antifúngicos isolados					
					AMB	5FC	FCL	VRC	ITC	TRB
432	31	BAL	<i>C.gattii</i>	VGII	0,5	4	16	0,25	0,25	2
467	32	Sangue	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,5	1	4	0,03	0,125	1
445	33	LAS	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,5	1	2	0,03	0,06	0,5
450	33	LPL	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,125	1	4	0,03	0,06	0,25
468	33	Sangue	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,5	4	0,06	0,125	1
448	34	LCR	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,5	1	4	0,03	0,125	1
474	35	Sangue	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,5	1	2	0,03	0,125	0,5
470	36	Sangue	<i>C.neoformans</i>	VNII	0,5	0,5	4	≤0,015	0,06	1
487	37	Sangue	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	1	1	0,03	0,125	1
505	38	Sangue	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,5	1	4	0,06	0,125	2
507	38	LCR	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,125	0,25	4	0,06	0,06	0,25
514	39	LCR	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	2	2	0,03	0,125	1
526	40	BAL	<i>C.gattii</i>	VGII	0,25	0,5	4	0,125	0,125	0,5
522	41	pele	<i>C.gattii</i>	VGII	0,5	2	8	0,125	0,5	2
524	41	LCR	<i>C.gattii</i>	VGII	0,25	1	8	0,125	0,125	0,5
534	42	LCR	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	1	4	0,06	0,03	0,5
550	42	SET	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	2	8	0,06	0,125	1
557	42	Sangue	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	2	8	0,06	0,125	1
548	43	LCR	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	2	8	0,125	0,125	1
552	43	Sangue	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,5	4	0,06	0,06	0,5
525	44	pele	<i>C.gattii</i>	VGII	0,25	1	8	0,06	0,25	2
544	45	LCR	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	2	8	0,06	0,125	1
551	45	BAL	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	2	4	0,06	0,06	1
564	45	Sangue	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	2	4	0,06	0,06	1
357	46	LCR	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,5	8	0,06	0,125	1
393	47	Sangue	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,125	0,5	2	0,03	0,06	0,125
398	48	LCR	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,5	0,5	0,06	0,125	0,5
440	49	LCR	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	2	2	0,03	0,125	2
463	49	Sangue	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,25	4	0,06	0,06	2
478	50	Sangue	<i>C.neoformans</i>	VNI	1	2	2	≤0,015	0,125	1
480	50	LCR	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,125	2	4	0,06	0,125	0,5
488	50	Escarro	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	1	4	0,03	0,06	1
492	51	LCR	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,5	2	2	0,03	0,125	1
411	52	LCR	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,5	2	8	0,06	0,125	2

BAL: lavado brônquico; LAS: líquido ascítico; LCR: líquido; LPL: líquido peritoneal; CIM: concentração inibitória mínima; AMB: anfotericina B; 5FC: 5-flucitosina; FCL: fluconazol; VRC: voriconazol; ITC: itraconazol; TRB: terbinafina.

As faixas de intervalos de CIM encontradas para cada antifúngico avaliado contra os isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. podem ser visualizadas na tabela 6, que mostra também a CIM₅₀ e CIM₉₀ para cada genótipo de *C.neoformans* e *C.gattii*. CIM₅₀ e CIM₉₀

correspondem aos valores de CIM onde 50 e 90% dos isolados foram inibidos, respectivamente.

Tabela 6: Intervalos de Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL dos agentes antifúngicos anfotericina B, 5-flucitosina, fluconazol, voriconazol, itraconazol e terbinafina frente a clínicos de *Cryptococcus* spp.

Espécie	Genótipo (n)	Parâmetro	CIM (µg/ml)					
			AMB	5FC	FCL	VRC	ITC	TRB
<i>C. neoformans</i>	VNI(62)	intervalo CIM	0,125-1	≤0,125-2	0,25-8	≤0,015-0,125	0,03-0,25	0,125-2
		CIM ₅₀	0,25	1	4	0,06	0,125	1
		CIM ₉₀	0,5	2	8	0,06	0,125	2
<i>C. neoformans</i>	VNII(4)	intervalo CIM	0,25-0,5	0,25-2	0,5-4	≤0,015-0,06	0,125-0,06	0,25-2
		CIM ₅₀	0,5	0,5	2	0,015	0,125	0,5
		CIM ₉₀	0,5	2	4	0,06	0,25	2
<i>C. gattii</i>	VGII (9)	intervalo CIM	0,25-1	0,5-4	2-16	0,06-0,25	0,06-0,5	0,5-4
		CIM ₅₀	0,25	1	8	0,125	0,125	2
		CIM ₉₀	1	4	16	0,25	0,5	4

CIM50 e CIM90: CIMs em que 50 e 90% dos isolados foram inibidos; IC: índice de inibição de crescimento; AMB: anfotericina B; 5FC: 5-flucitosina; FCL: fluconazol; VRC: voriconazol; ITC: itraconazol; TRB: terbinafina

Na tabela 7 é possível a visualização da distribuição do número de isolados em cada valor de concentração para cada antifúngico. Os PCEs para cada antifúngico estão destacados com um (*) na tabela.

Tabela 7: Distribuição do número de isolados em cada Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL dos antifúngicos anfotericina B, 5-flucitosina, fluconazol, voriconazol, itraconazol e terbinafina frente a isolados clínicos de *Cryptococcus* spp.

Espécie	genótipo	Antifúngico	Distribuição das CIMs (em ug/mL)										
			0,015	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16
C. neoformans	VNI	AMB				13	34*	14	1				
		5FC				1	5	15	20	21*			
		FCL					1	2	2	20	30*	7	
		VRC	3	25	31*	3							
		ITC		3	23	35*	1						
		TRB				2	9	17	26*	8			
C. neoformans	VNII	AMB					1	3*					
		5FC					1	2*		1			
		FCL						1		1	2*		
		VRC	2*	1	1								
		ITC			1	2*	1						
		TRB					1	1	1	1			
C. gattii	VGII	AMB					6*	2	1				
		5FC						3	3*	2	1		
		FCL								3	1	4*	1
		VRC			3	4*	2						
		ITC			1	4*	3	1					
		TRB						2	2	4*	1		

*Ponto de corte epidemiológico calculado para esta amostra; ** não foi possível calcular.

4.5.1.1. Determinação da CIM para isolados ambientais

Foram avaliados 6 isolados ambientais de *C.albidus* e 6 isolados de *C.laurentii* (tabela 8). Todos isolados são provenientes de coletas diferentes. Foi avaliado um isolado de cada espécie proveniente de cada local de coleta, em datas distintas. As CIMs encontradas para os isolados de *C.albidus* variaram de 0,5 – 1 µg/mL para AMB; foram > 64 µg/mL para 5FC; variaram de 4 a > 64 µg/mL para FCL; 0,06 – 1µg/mL para VRC e de 0,06 a > 8 µg/mL para ITC. As CIMs encontradas para os isolados de *C.laurentii* foram: 1 µg/mL para AMB; > 64 µg/mL para 5-FC; variaram de 2 – 8 µg/mL para FCL; 0,125 – 0,5 µg/mL para VRC e 0,06 – 0,125 µg/mL para ITC.

A tabela traz também os valores de CIM encontrados para o isolado ambiental de *C.neoformans*, para os isolados ambientais classificados como *Cryptococcus* spp. e para os isolados de *C.flavescens*. Os resultados de CIM dos isolados da espécie *C.flavescens* foram bem distintos, sendo que o isolado T11 apresentou valores de CIM mais elevados do que o isolado T1.

Como não foi possível identificar a espécie dos isolados identificados como *Cryptococcus* spp., a suscetibilidade de todos foi avaliada, exceto dos isolados T2 e T3, que não cresceram nos testes em sucessivas tentativas e em diferentes temperaturas.

Tabela 8: Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL dos agentes antifúngicos anfotericina B, 5-flucitosina, fluconazol, voriconazol e itraconazol frente a isolados ambientais de *Cryptococcus* spp.

Identificação	Espécie	CIM µg/mL				
		AMB	5FC	FCL	VRC	ITC
T1	<i>C.flavescens</i>	0,25	≤0,125	0,5	≤0,015	0,03
T11	<i>C.flavescens</i>	1	>64	0,5	0,5	0,5
CnHC1	<i>C.neoformans</i>	0,5	4	4	0,06	0,5
HC7	<i>C.laurentii</i>	1	>64	2	0,25	0,06
M1	<i>C.laurentii</i>	1	>64	8	0,125	0,25
LR4	<i>C.laurentii</i>	1	>64	8	0,5	0,125
TCM4	<i>C.laurentii</i>	1	>64	8	0,125	0,125
CM2	<i>C.laurentii</i>	1	>64	8	0,25	0,125
LR1	<i>C.albidus</i>	1	>64	4	0,06	0,06
BC1	<i>C.albidus</i>	0,5	>64	>64	0,5	4
BC15	<i>C.albidus</i>	1	>64	32	1	4
CC10	<i>C.albidus</i>	0,5	>64	32	0,5	8
TCM1	<i>C.albidus</i>	0,5	>64	>64	1	4
TCM12	<i>C.albidus</i>	0,5	>64	>64	0,5	>8
T2 *	<i>Cryptococcus</i> spp.	—	—	—	—	—
T3 *	<i>Cryptococcus</i> spp. ^a	—	—	—	—	—
T5	<i>Cryptococcus</i> spp. ^a	0,5	0,5	2	0,125	0,125
T7	<i>Cryptococcus</i> spp.	0,25	≤0,125	0,5	≤0,015	0,03
T9	<i>Cryptococcus</i> spp.	0,5	0,25	2	0,03	0,06
T10	<i>Cryptococcus</i> spp.	1	≤0,125	2	0,06	0,06
T12	<i>Cryptococcus</i> spp.	0,5	≤0,125	0,5	≤0,015	≤0,015
T13	<i>Cryptococcus</i> spp.	0,25	≤0,125	0,5	≤0,015	≤0,015
T14	<i>Cryptococcus</i> spp.	0,25	≤0,125	1	≤0,015	≤0,015
T15	<i>Cryptococcus</i> spp.	0,25	≤0,125	1	≤0,015	0,03
T16	<i>Cryptococcus</i> spp.	0,25	≤0,125	1	0,06	0,03
T17	<i>Cryptococcus</i> spp.	0,5	≤0,125	2	0,06	0,06

T: Parque Taquaral; HC: Hospital de Clínicas UNICAMP; M: Mercado Municipal; LR: Largo do Rosário; TCM: Teatro Castro Mendes; CM: Igreja Na Sra Do Carmo; BC: Biblioteca Central UNICAMP; CC: Centro de Convivências; (*): isolados que não cresceram nos testes de suscetibilidade; (a): isolado com 98% de homologia com *C.yokohamensis*; AMB: anfotericina B; 5FC: 5-flucitosina; FCL: fluconazol; VRC: voriconazol; ITC: itraconazol

4.5.2. Teste de suscetibilidade *in vitro* aos antifúngicos em combinação e determinação do Coeficiente de Interação Fracional (CIF)

A tabela 9 mostra os resultados de intervalos de CIM encontrados para cada antifúngico sozinho e em combinação (os resultados expostos na íntegra podem ser

visualizados nos apêndices 3,4,5 e 6, onde constam dos valores de CIM obtidos). É possível observar que, em todas as associações realizadas, houve decréscimo dos valores de CIM e de seus intervalos. Esse efeito pôde ser observado até mesmo nas associações que apresentaram efeito indiferente nas associações.

Tabela 9: Intervalos de concentração inibitória mínima (CIM) em µg/mL dos agentes antifúngicos anfotericina B, 5-flucitosina, fluconazol e terbinafina sozinhos e em quatro combinações frente a isolados clínicos de *Cryptococcus* spp.

Espécie	Genótipo (n)	AMB+5FC (intervalos de CIM em µg/mL)			
		CIM AMB	CIM AMB assoc	CIM 5FC	CIM 5FC assoc
<i>C.neoformans</i>	VNI (62)	0,125-1	0,06-1	≤0,125-2	0,06-0,125
<i>C.neoformans</i>	VNII (4)	0,25-0,5	0,06	0,25-2	0,06
<i>C.gattii</i>	VGII (9)	0,25-1	0,06-0,5	0,5-4	0,06
		AMB+FCL (intervalos de CIM em µg/mL)			
		CIM AMB	CIM AMB assoc	CIM FCL	CIM FCL assoc
<i>C.neoformans</i>	VNI (62)	0,125-1	0,06	0,25-8	0,125-5
<i>C.neoformans</i>	VNII (4)	0,25-0,5	0,06	0,5-4	0,125
<i>C.gattii</i>	VGII (9)	0,25-1	0,06-0,5	2-16	0,125
		AMB+TRB (intervalos de CIM em µg/mL)			
		CIM AMB	CIM AMB assoc	CIM TRB	CIM TRB assoc
<i>C.neoformans</i>	VNI (62)	0,125-1	0,06	0,125-2	0,06
<i>C.neoformans</i>	VNII (4)	0,25-0,5	0,06	0,25-2	0,06
<i>C.gattii</i>	VGII (9)	0,25-1	0,06	0,5-4	0,06
		FCL+TRB (intervalos de CIM em µg/mL)			
		CIM FCL	CIM FCL assoc	CIM TRB	CIM TRB assoc
<i>C.neoformans</i>	VNI (62)	0,25-8	0,125-0,5	0,125-2	0,06
<i>C.neoformans</i>	VNII (4)	0,5-4	0,125	0,25-2	0,06
<i>C.gattii</i>	VGII (9)	2-16	0,06-0,125	0,5-4	0,06

CIM: concentração inibitória mínima; AMB: anfotericina B; 5FC: 5-flucitosina; FCL: fluconazol; VRC: voriconazol
ITC: itraconazol; TRB: terbinafina; CIM assoc: concentração inibitória mínima do antifúngico em associação

Os efeitos de interação encontrados nas combinações de antifúngicos realizadas foram sinergismo (S) e indiferença (I). Não foi observado efeito antagônico em nenhuma das associações realizadas (tabela 10). Para os 4 isolados de *C.neoformans* identificados com o genótipo VNII, todas as associações foram sinérgicas. Da mesma forma, em duas associações (AMB + TRB e FCL + TRB) foi observado 100% de sinergismo para os isolados de *C.gattii*, genótipo VGII. Para os isolados de *C.neoformans*, genótipo VNI foi

observado mais de 75% de sinergismo em todas as associações e na associação entre FCL e TRB foi observado 95,16% de efeito sinérgico.

Tabela 10: Porcentagem dos tipos de efeito de interação para cada genótipo em cada uma das 4 combinações de agentes antifúngicos frente a isolados clínicos de *Cryptococcus* spp.

Genótipo (n)	Efeito de Interação							
	AMB + 5FC		AMB + FCL		AMB + TRB		FCL + TRB	
	S	I	S	I	S	I	S	I
VNI (62)	47 (75.80%)	15 (24.20%)	49 (79.03%)	13 (20.97%)	48 (77.42%)	14 (22.58%)	59 (95.16%)	3 (4.84%)
VNII (4)	4 (100%)	0	4 (100%)	0	4 (100%)	0	4 (100%)	0
VGII (9)	8 (88,9%)	1 (11,11%)	8 (88,9%)	1 (11,11%)	9 (100%)	0	9 (100%)	0

AMB: anfotericina B; 5FC: 5-flucitosina; FCL: fluconazol; TRB:terbinafina; S: efeito sinérgico; I: efeito indiferente

4.5.3. Relação entre genótipos e CIMs

Foi encontrada diferença significativa no comparativo das CIMs entre os genótipos. Para o antifúngico AMB, foi observada diferença significativa entre os genótipos VNI e VNII, sendo o VNII mais resistente que o VNI frente à AMB ($P=0.0407$). Para o antifúngico 5FC não foi observada diferença significativa entre os genótipos. Para VRC, VGII foi significativamente menos sensível do que VNI e VNII ($P< 0,0001$).

Para FCL, houve diferença significativa entre VGII e VNI, sendo o VGII menos sensível do que o VNI ($P=0,0170$). Da mesma forma para ITC ($P< 0,0001$), e para TRB ($P=0,0090$).

Para todas as associações realizadas, foi observada redução significativa das CIMs dos antifúngicos quando associados em relação às CIMs dos antifúngicos testados isoladamente ($P< 0,0001$).

5. Discussão

Indivíduos imunossuprimidos são mais suscetíveis às doenças oportunistas causadas por diversos micro-organismos. A incidência de IFIs aumentou nos últimos anos devido à expansão do número de indivíduos em imunossupressão. Apesar das diversas opções terapêuticas existentes, a taxa de mortalidade em indivíduos acometidos por IFIs permanece alta (74).

A criptococose é uma IFI, que pode se manifestar como doença oportunista em indivíduos imunossuprimidos, e como doença primária em indivíduos imunocompetentes (61). No entanto, a população mais atingida por essa IFI é de indivíduos com algum tipo de comprometimento imunológico como portadores de doenças linfoproliferativas, indivíduos transplantados, pacientes submetidos a tratamentos com medicamentos imunossupressores e, principalmente, portadores de HIV em estágio avançado, com sida (10,59,133).

As principais espécies apontadas como agentes causais de criptococose são *C.neoformans* e *C.gattii*, que afetam, com maior frequência, indivíduos imunossuprimidos e imunocompetentes, respectivamente. O gênero *Cryptococcus* spp. é responsável pela maioria dos casos de meningite fúngica (61-63).

A partir dos 110 isolados selecionados para este estudo, foi possível a reativação apenas de 75 (68,18%) dos mesmos. Não foi possível recuperar 35 (31,82%) isolados, mesmo após sucessivas tentativas em meio YEPD. Os isolados clínicos de *Cryptococcus* selecionados para esse estudo estavam armazenados em água destilada estéril a temperatura ambiente e um elevado número não pôde ser avaliado. A preservação em água destilada estéril a temperatura ambiente, conforme descrito por Castellani em 1939 (125), é um método simples, rápido e barato de preservação, porém não se mostrou muito eficiente para a preservação dos isolados clínicos selecionados para o presente estudo. Por outro lado,

esse método se mostrou efetivo para conservação de isolados de fungos filamentosos e leveduras do gênero *Candida* em nosso laboratório (dados não publicados).

O presente trabalho foi a primeira experiência vivenciada para a conservação de *Cryptococcus* com a utilização deste método em nosso laboratório. O método de Castellani é a metodologia disponível para a conservação do elevado número de isolados clínicos de leveduras e fungos filamentosos obtidos na rotina do HC-UNICAMP.

Estudo de Franzot et al (134) avaliou as características de isolados de *Cryptococcus* spp. após a manutenção dos mesmos em laboratório. No estudo, os pesquisadores concluíram que a melhor forma de armazenar esses micro-organismos é o congelamento ou liofilização.

A criopreservação em nitrogênio líquido e liofilização são os métodos recomendados e utilizados pela *American Type Culture Collection* (ATCC). Embora a liofilização de células vivas forneça um mecanismo efetivo para a estabilização destas por longos períodos de tempo, este processo é complicado, demorado e requer equipamento de alto custo, o que faz com que o método seja inviável para muitos laboratórios. A preservação em nitrogênio líquido é uma alternativa mais conveniente e menos dispendiosa para o armazenamento a longo prazo de células vivas (135).

Para a preservação de isolados fúngicos por congelamento, o guia de micologia do ATCC recomenda o uso de glicerol ou DMSO como crioprotetores (ATCC® *MyCology CulTure guide*) (136). Desta forma, todos os isolados reativados no presente trabalho, além de serem estocados novamente em água destilada estéril, foram armazenados em glicerol a 15% e mantidos a temperatura de -80°C.

Dos 75 isolados reativados, 66, ou seja, 88% pertencem à espécie *C.neoformans* e 12% pertencem à espécie *C.gattii*.

Dois isolados (LIF 418 e LIF 526), inicialmente identificados como *C.neoformans*, por apresentarem resultados duvidosos de CGB, foram classificados como *C.gattii* pelas duas técnicas moleculares aplicadas. Esses isolados foram classificados como pertencentes ao genótipo VGII pela técnica de RFLP e tiveram 100% de identidade com *C.gattii* pelo sequenciamento de DNA.

O diagnóstico laboratorial da criptococose é constituído principalmente de: pesquisa direta do agente em fluido biológico, cultivo do agente, pesquisa de antígeno capsular criptocócico e exame anatomopatológico. A análise do LCR é a principal ferramenta no diagnóstico precoce da meningite criptocócica. A tinta da China é um exame útil e rápido para o diagnóstico da infecção do SNC. Todavia, existem relatos na literatura de resultados falso negativos em infecções por *Cryptococcus* com cápsula deficiente ou devido à baixa carga fúngica do agente no LCR, principalmente nos casos iniciais, quando o diagnóstico é fundamental, representando ainda um desafio no diagnóstico da infecção (137). Depois de ser diagnosticada a infecção, os laboratórios enfrentam outro desafio, a diferenciação entre as espécies.

O cultivo de isolados de *Cryptococcus* spp. em meio CGB é um método amplamente utilizado para diferenciação entre as duas principais espécies causadoras de criptococose, *C.neoformans* e *C.gattii*. O teste é positivo para a espécie *C.gattii*, que, ao degradar a glicina, faz com que amônia seja liberada ocorrendo alcalinização do meio que adquire a cor azul cobalto. No entanto, como todos os testes bioquímicos, o teste de CGB pode apresentar resultados duvidosos, prejudicando a identificação correta do micro-organismo quando essa for a única ferramenta disponível para a diferenciação das espécies (138). Além disso, outras espécies de leveduras também podem apresentar resultados

positivos de CGB como *C.laurentii*, *C.luteolus*, *Candida parapsilosis* e espécies do gênero *Trichosporon* (139).

A metodologia VITEK II® (bioMérieux) apresenta a grande desvantagem de não diferenciar *C.neoformans* e *C.gattii*, exigindo metodologias complementares para a identificação/diferenciação destas duas espécies. Durante o presente estudo, foi possível detectar falhas desta técnica que identificou como *C.neoformans* um isolado ambiental (LR11) identificado posteriormente como *C.laurentii* pelo sequenciamento, com 100% de identidade com a sequência depositada no banco de dados *GenBank* (NCBI) e o número de acesso pode ser visualizado na tabela 4.

Além do isolado LR11, o equipamento não identificou outros 14 isolados ambientais, que foram sequenciados, o que pode ser explicado pelo fato de se tratarem de micro-organismos ambientais sem importância médica no momento e não estarem incluídos no banco de dados do equipamento.

Estudo de Massonet et al. (87) avaliou a metodologia do VITEK II® para a identificação de 61 leveduras variadas, tais como espécies de *Candida*, *Cryptococcus* spp. e *Saccharomyces* spp.. Das 61 leveduras estudadas, o equipamento identificou corretamente apenas 41, o que sugere que o VITEK é uma metodologia complementar que auxilia o diagnóstico laboratorial, mas que ainda necessita de adequações para a identificação de leveduras de importância médica.

Ferramentas moleculares são eficazes e confiáveis para a diferenciação das espécies e também para o diagnóstico das infecções direto do material clínico, mas ainda estão restritas a centros de referência e a grupos de pesquisa. A maioria das técnicas é considerada de alto custo, o que restringe a utilização pelos laboratórios de rotina (68).

Portanto, é necessária a busca de metodologias diagnósticas de fácil realização e interpretação e, principalmente, de baixo custo.

A espécie predominantemente encontrada como agente causal de criptococose nos pacientes atendidos no HC-UNICAMP é *C.neoformans*. No Brasil, essa é a principal espécie causadora da doença, o que também ocorre em todo mundo. *C.gattii* é mais comum no Norte e Nordeste do país, onde é considerado endêmico (77-81).

Linderberg et al. (140), avaliaram 123 casos de criptococose no estado do Mato Grosso do Sul. Foi possível a identificação da espécie em 77 casos. Destes, 69 (89.6%) foram identificados como *C.neoformans* e 8 (10.4%) como *C.gattii*.

Estudo avaliando o perfil epidemiológico dos casos de criptococose no Rio Grande do Sul mostrou que a espécie predominante entre os pacientes é *C.neoformans*. A espécie foi responsável por 95% dos casos analisados (77).

Da mesma forma, em estudo realizado por Mora et al. (80) na cidade de Uberaba, no estado de Minas Gerais, que avaliou 163 isolados clínicos, a espécie mais frequente foi *C.neoformans*, sendo identificada em 95% dos isolados.

Geralmente, a criptococose é adquirida por meio da inalação do agente. Espécies de *Cryptococcus* são ubiqüitárias e podem ser encontradas nos mais diversos ambientes. A exposição humana às espécies desse gênero é bem comum, pois esses fungos têm sido isolados de vários locais como construções abandonadas, jardins, igrejas, praças e domicílios (29-31, 36, 126).

Excretas de pombos têm sido reportadas como potencial fonte ambiental de micro-organismos patogênicos, principalmente de espécies de *Cryptococcus*. Os pombos, que são abundantes em áreas públicas e se adaptam facilmente aos mais diversos ambientes,

exercem o papel de carreadores de agentes patogênicos no ambiente e, por consequência, entre os seres humanos e animais (141,142).

Os 2 isolados de *C.flavescens* foram identificados com 100% de identidade com a sequência depositada no banco de dados *GenBank* (NCBI) e o número de acesso pode ser visualizado na tabela 4. Inicialmente, essa espécie era considerada uma variedade da espécie *C.laurentii* e análises das sequências da região ITS determinaram que as espécies fossem separadas (143).

Entre os isolados classificados como *Cryptococcus* spp., 2 tiveram 98% de identidade com a espécie *C.yokohamensis*. Essa espécie foi descrita pela primeira vez em estudo realizado por Alshahni et al. (144). Os pesquisadores isolaram a espécie a partir de troncos de árvores e a partir das narinas de coalas de um zoológico em Yokohama no Japão. O sequenciamento de outra região do DNA fúngico é necessário para confirmação da identificação da espécie dos demais isolados que foram identificados somente até gênero, como, por exemplo, o sequenciamento das regiões da região D1/D2 constituinte do DNA ribossomal 28S (144).

Do total de 15 coletas ambientais, 11, ou seja, 73,3% delas foram positivas para o isolamento de *Cryptococcus* spp.. O isolamento de *C.neoformans* ocorreu em uma das 15 coletas, representando 6,7%.

No estudo realizado Delgado et al. (127) em 2005, foram obtidos 55 isolados ambientais de *C.neoformans*, sendo 28 deles isolados no HC-UNICAMP, 18 na Igreja Na Sra Do Carmo, 5 na PUCCII e 4 no Mercado Municipal. Naquele período, o número de pombos relatado pelos autores era maior que o encontrado nos dias de hoje. Foram realizadas 96 coletas, sendo que em seis delas foi possível o isolamento de *C.neoformans*. Outras espécies de *Cryptococcus* não foram relatadas.

Takahara et al. (41), em estudo realizado no estado de Mato Grosso, na cidade de Cuiabá, analisaram 122 amostras de excretas de pombos e a espécie *C.neoformans* foi isolada em 6,6% amostras. Em 49 (78%) dos 63 locais públicos visitados, foi observada a presença de excretas de pombos.

Em estudo realizado por Faria et al. (30) em Pelotas, no estado do Rio Grande do Sul, 70 locais públicos como Igrejas, praças, prédios históricos, engenhos e armazéns foram avaliados quanto à presença de excretas de pombos e de *C.neoformans*. Dos 70 locais avaliados, 26 possuíam excretas de pombos e o isolamento de *C.neoformans* ocorreu em 7 desses locais.

Teodoro et al. (145) avaliaram 87 amostras de fezes de pombos quanto a presença de *Cryptococcus* e a taxa de positividade para o gênero foi de 66.6%. Nesse estudo, realizado na cidade de Araraquara, no estado de São Paulo, os pesquisadores isolaram *C.neoformans* (17.2%), *C.gattii* (5.2%), *C.ater* (3.5%), *C.laurentti* (1.7%) e *C.luteolus* (1.7%).

Canónico-González et al. (146) isolaram espécies de *Cryptococcus* a partir de excretas de pombos, em regiões áridas do México. Nesse estudo, foram coletadas 50 amostras de fezes de pombos e 20% delas foram positivas para a presença de *Cryptococcus*. Foram isoladas as espécies *C.neoformans* e *C.albidus*.

Pedroso et al (147) avaliaram amostras de ar e de excretas de pombos quanto a presença de espécies de *Cryptococcus* spp. na cidade de Ribeirão Preto, estado de São Paulo. Foram analisadas 86 amostras (32 de ar e 54 de excretas de pombos). Das 86 amostras, 35 (41%) foram positivas para o gênero *Cryptococcus*. Foram encontrados 41 isolados de *Cryptococcus* spp.. Entre os 41 isolados, foram identificados 15 *C.albidus* (12

provenientes de excretas e 3 do ar), 9 *C.laurentii* (7 de excretas e 2 do ar), 2 *C.uniguttulatus* (excretas) e 15 isolados de *C.neoformans* (12 de excretas e 3 do ar).

Estudo de Rosário et al. (31) mostrou a presença de *Cryptococcus*spp. em 47% das 174 amostras de excretas de pombos provenientes das Ilhas Canárias, em ambiente urbano e rural. Foram isolados *C.albidus* (n = 6), *C.laurentii* (n = 8) e *C.uniguttulatus* (n = 9) e *C.neoformans* (n = 59) confirmando que esses animais são importantes carreadores epidemiológicos desses micro-organismos patogênicos. De 331 amostras coletadas com swab, 81 (24,4%) foram positivas para o gênero. As espécies *C.albidus*, *C.laurentii* e *C.uniguttulatus* e *C.neoformans* foram identificadas.

Na Tunísia, África, estudo realizado por Mseddi et al. (32) analisaram 950 amostras ambientais de excretas de pombos, folhas de árvores, frutos, flores, madeira e solo. Foi possível o isolamento de 27 *C.neoformans* e 3 *C.gattii*. *C.neoformans* foi isolado em 26 (10,4%) das 250 amostras de excretas de pombos. O isolamento de espécies do complexo *C.neoformans/C.gattii* foi mais frequente em amostras de excretas de pombos (9,2%) do que em amostras vegetais (0.6%).

Apesar de a presença de *Cryptococcus* spp. ser bastante comum e estudada em excretas de pombos, outras aves também parecem ser carreadoras desses agentes patogênicos como pôde ser observado por Lugarini et al. (148) em estudo realizado no Paraná, que mostrou que em excretas de aves de espécies de *Pissarine* e *Psittacine* também foi possível o isolamento de *Cryptococcus* spp..

Rosario et al. (149) mostraram que em excretas de diversas espécies de aves como galinhas, patos, gansos, canários, entre outros, já foram isoladas espécies de *Cryptococcus* spp..

Além de excretas de aves, estudos avaliando material vegetal também demonstram a presença de *Cryptococcus* spp.. O gênero *Eucalyptus* é conhecido como uma das principais fontes de *C.gattii*. Lazera et al. (34) mostraram que árvores são importantes nichos ecológicos de *C.neoformans* e *C.gattii*.

Em estudo realizado em Cuiabá, no estado do Mato Grosso por Anzai et al. (150), foi possível o isolamento de *C.gattii* a partir de árvore *Plathymenia reticulata*. *C.gattii* também foi isolado em árvores de parques de Buenos Aires, Argentina, em trabalho realizado por Mazza et al. (151).

Estudo realizado por Kidd et al. (39), na *British Columbia*, Canadá, mostrou que foi possível o isolamento de *C.gatti* a partir de superfície de árvores, solo, ar, água e água do mar confirmando que espécies de *Cryptococcus* não possuem um nicho específico e que podem ser isolados a partir dos mais variados materiais.

Leite et al. (36) estudaram a poeira de bibliotecas na cidade de Cuiabá, no Mato Grosso, e encontraram diversas espécies de *Cryptococcus* spp.. *C.gattii* foi a espécie mais frequente, seguida por *C.terreus*, *C.luteolus*, *C.neoformans*, *C.uniguttulatus*, *C.albidus* e *C.humicolus*.

Embora sejam *C.neoformans* e *C.gattii* as principais espécies consideradas responsáveis pelas infecções em humanos e animais, outras espécies têm sido descritas como causadoras de criptococose como *C.uniguttulatus*, *C.albidus*, *C.laurentii*, *C.diffluens*, entre outros. Esses micro-organismos têm sido relatados como agentes etiológicos de diversas infecções como infecções de pele, queratite, abscesso pulmonar, meningite e fungemia (47-49).

Estudo de Liu et al. (51) relatou um caso de encefalite causada por *C.albidus* em paciente com SIDA, além disso, o estudo aponta outros 11 casos encontrados na literatura,

nos últimos 20 anos, de criptococose extra dérmica causados por *C.albidus*, sendo que, na maioria dos casos, os indivíduos acometidos eram portadores de HIV ou passaram por transplantes de órgãos.

Cleveland et al. (48) relataram um caso de fungemia causada por *C.albidus* em paciente submetido a transplante de fígado. Da mesma forma, em receptor de rim, Lee et al. (52) relataram um caso de criptococose disseminada causada por *C.albidus*.

Também em receptor de órgão sólido, foi relatada infecção por *C.laurentii*. O agente foi responsável por infecção cutânea primária em receptor de rim (47).

Molina-Leyva et al. (49) relataram um caso de *C.laurentii* isolado em amostra clínica proveniente de infecção cutânea de criança imunocompetente.

C.laurentii, *C.albidus* e *C.flavescens* já foram relatados causando infecções em cães (50,143). Assim como cães, felinos também são acometidos por infecções por *Cryptococcus* spp.. Kano et al. (152) relataram criptococose sistêmica em gato, causada por *C.albidus*.

A única amostra ambiental positiva para *C.neoformans* encontrada no presente estudo foi a amostra coletada no HC-UNICAMP.

O pequeno número de isolados ambientais de *C.neoformans* e *C.gattii* encontrado nesse trabalho, provavelmente, se deve ao fato de que os ambientes públicos determinados para a coleta de excretas passam por higienização diária, diminuindo o acúmulo de fezes. É descrito na literatura que excretas secas e envelhecidas são mais propícias para o isolamento desses micro-organismos e com a limpeza diária dos ambientes isso se torna mais difícil (32,148).

Ocorre ainda o rápido crescimento de fungos filamentosos contaminantes que, conseqüentemente, favorece resultado falso negativo. Além disso, resultado de cultura

negativo não exclui a possibilidade do fungo estar presente no ambiente. Para minimizar este viés seria interessante realizar várias coletas nos mesmos sítios em diferentes ocasiões (32,148, 153).

Os 11 isolados ambientais de *C.neoformans* foram classificados como VNI e, apesar de se tratar de apenas uma amostra positiva, o tipo molecular encontrado corresponde ao mais prevalentemente encontrado por outros pesquisadores.

Andrade - Silva et al. (29), em estudo realizado em Uberaba, Minas Gerais, avaliaram áreas hospitalares externas quanto a presença de *Cryptococcus* spp.. Foram coletadas 73 amostras (63 de excretas de pombos e 11 de detritos vegetais). Foram isoladas as espécies *C.neoformans* (n = 51) e *C.laurentii* (n = 21). Dos 51 isolados de *C.neoformans*, 47 pertenciam ao genótipo VNI e 4 ao genótipo VNII. Nesse estudo, 41% das amostras foram positivas para o isolamento de espécies de *Cryptococcus*.

O genótipo mais frequente entre os isolados clínicos provenientes de pacientes tratados no HC-UNICAMP, foi o VNI, sendo determinado em 62 isolados (82,7% do total) seguido pelo VGII (*C.gattii*), encontrado em 9 isolados (12%) e pelo VNII (*C.neoformans*), genótipo atribuído a 4 isolados clínicos (5,3%).

No Brasil, o genótipo mais comumente encontrado é o VNI. Para *C.gattii*, o subgrupo molecular mais frequentemente encontrado é o VGII (12,76-81).

Estudo realizado por Matsumoto et al. (154), analisou 47 isolados clínicos de *C.neoformans* obtidos no estado de São Paulo. O genótipo VNI foi determinado em 45 (96%) desses isolados.

Trabalho de Matos et al. (155) mostrou que a espécie predominantemente encontrada entre os pacientes com meningite criptocócica no estado da Bahia é *C.neoformans*. A espécie foi isolada em 49 (79%) dos 62 casos estudados. O genótipo VNI

foi o predominante, sendo determinado em 98% dos isolados clínicos de *C.neoformans*. *C.gattii* foi identificado em 13 isolados clínicos, sendo todos pertencentes ao genótipo VGII.

Da mesma forma, estudo realizado por Freire et al. (81), apontou *C.neoformans* como a principal espécie causadora de criptococose no estado no Amazonas. Esse estudo avaliou 57 isolados clínicos de *Cryptococcus*, sendo que 40 pertenceram a espécie *C.neoformans*. Dos 40 isolados de *C.neoformans*, 39 (97%) foram classificados como pertencentes ao genótipo VNI. Todos os 17 *C.gattii* estudados pertenceram ao genótipo VGII.

Estudo realizado no Pará por Santos et al. (78) avaliou 56 isolados clínicos de *Cryptococcus*. Os resultados demonstraram que, apesar de o genótipo VNI (*C.neoformans*) ser o mais comum (28/56, 50%), a espécie *C.gattii* esteve também em elevado número e o genótipo VGII (25/56, 44.6%) foi o mais frequente para essa espécie, seguido pelo VGI (3/56, 5.4%).

Em trabalho realizado por Martins et al. (156) na cidade de Teresina, Piauí, 63 pacientes com criptococose foram avaliados. Desses 63 pacientes, 37(58.7%) foram infectados pelo genótipo VNI (*C.neoformans*). O genótipo VGII (*C.gattii*) foi identificado em 24 (38,1%) pacientes. Os genótipos VGI (*C.gattii*, 1,6 %) e VNII (*C.neoformans*, 1,6%) também foram identificados.

Meyer et al. (7), avaliaram 340 isolados clínicos e ambientais da América Latina. A espécie mais frequente foi *C.neoformans* bem como o genótipo VNI, identificado em 68% dos isolados, seguido por VGII, 9% e VGI, 6% (*C.gattii*).

Estudo multicêntrico realizado no Brasil por Trilles et al. (76), avaliou 443 isolados clínicos e ambientais de *Cryptococcus* spp.. O genótipo VNI (*C.neoformans*) foi

identificado em 64% dos isolados, seguido pelo genótipo VGII (*C.gattii*) identificado em 21% dos isolados. Além desses genótipos, foram identificados VNII 5% (*C.neoformans*), VGIII 4%, VGI (*C.gattii*) e VNIV 3% e VNIII (*C.neoformans*) encontrado em menos de 1% dos isolados.

Estudo de Souza et al. (79) analisou isolados clínicos e ambientais de *Cryptococcus* quanto ao genótipo na cidade de Goiânia, no estado de Goiás. Foram avaliados 84 isolados clínicos e 40 isolados ambientais. O genótipo VNI (*C.neoformans*) foi identificado em 80 isolados clínicos e em todos os 40 isolados ambientais. A espécie *C.gattii* foi atribuída a 4 isolados clínicos, sendo todos pertencentes ao genótipo VGIII.

Com o aumento das micoses sistêmicas e oportunistas nos últimos anos, devido ao aumento do número de estados de imunossupressão, o estudo da suscetibilidade dos antifúngicos contra os agentes etiológicos dessas micoses se torna essencial para a compreensão do perfil de cada micro-organismo, além disso, os testes de suscetibilidade têm como objetivo guiar as decisões clínicas e acompanhar o possível surgimento de isolados resistentes.

De modo similar aos resultados deste trabalho, isolados clínicos de *Cryptococcus*, em outros estudos, mostraram-se suscetíveis, *in vitro*, à AMB ($\text{CIM} \leq 1 \mu\text{g/mL}$) (157-163). Por outro lado, Andrade-Silva et al. (164) relataram resistência à AMB ($\text{CIM} \geq 2 \mu\text{g/mL}$) em 10% dos 95 isolados clínicos de *C.neoformans* avaliados.

Para o antifúngico 5FC, no presente estudo, foram observados valores de $\leq 0,125 - 2 \mu\text{g/mL}$ para *C.neoformans* e valores variando de $0,5 - 4 \mu\text{g/mL}$ para *C.gattii*. Trilles et al. (165) relataram valores mais altos para esse antifúngico para ambas as espécies, com valores chegando a $16 \mu\text{g/mL}$ para *C.neoformans* e $> 64 \mu\text{g/mL}$ para *C.gattii*. Estudo de

Chowdhary relatou valores de CIM que variaram de 0,03 - > 64 µg/mL para isolados clínicos de *C.neoformans*.

Neste trabalho, foram encontrados reduzidos valores de CIM para os antifúngicos VRC e ITC. Outros estudos também mostraram que os isolados de *Cryptococcus* apresentaram reduzidos valores de CIM para esses antifúngicos (159,160,165,166). Andrade-Silva et al. (164) por outro lado, relataram resistência de 21% ($CIM \geq 1$) para isolados clínicos de *C.neoformans* frente ao ITC, enquanto que para VRC resistência não foi observada.

Foi possível observar que 6 isolados clínicos de *C.neoformans* (provenientes de 5 pacientes) e 3 isolados clínicos de *C.gattii* (provenientes de 2 pacientes) apresentaram valores de CIM de FCL igual a 8 µg/mL (tabela 5).

Um isolado clínico de *C.gattii* (LIF 432) apresentou valor de CIM de FCL de 16 µg/mL. Silva et al. (163) encontraram valores de CIM variando de 1 a 32 µg/mL para essa espécie, da mesma forma, Trilles et al. (165) relataram isolados com elevados valores de CIM para *C.gattii*. Andrade e Silva et al. (164) relataram valores de CIM de FCL de 2-32 µg/mL para *C.neoformans* e de 8-32 µg/mL para *C.gattii*. Guinea et al. (166) relataram sensibilidade de 16 µg/mL para 2 isolados de *C.neoformans*.

O que os elevados valores de CIM obtidos *in vitro* representaram no tratamento desses pacientes não pôde ser determinado até o presente momento. Análises futuras em seus prontuários para avaliação de desfecho clínico podem levar a discussões mais detalhadas.

Os PCEs obtidos no presente estudo estão expostos na tabela 7. Espinel-Ingroff et al. (120) encontraram valores de PCEs de 8 a 32 µg/mL para FCL, 0.25 a 1 µg/mL para ITC, 0.25 a 0.5 µg/mL para PSC 0.12 a 0.25 µg/mL para VRC para isolados do complexo

C.neoformans/C.gattii. Lockhart et al. (121) apresentaram valores de PCEs para a espécie *C.gattii*. Para FCL, VRC, ITC e PSC, os valores de PCEs foram 32, 0.5, 1 e 1 µg/mL, respectivamente. Pfaller et al. (118) encontraram valores de PCEs de 16 µg/mL para FCL, 0.25 µg/mL para VRC e 0.5 µg/mL para PSC para isolados de *C.neoformans*.

A resistência de isolados de *Cryptococcus* frente aos antifúngicos ainda é bastante controversa e de difícil definição em laboratório devido à ausência de pontos de corte definidos e reconhecidos para esses fungos.

Se a resistência ou diminuída sensibilidade obtida para antifúngico FCL, em alguns casos, é derivada de exposição prévia a esse medicamento ainda permanece uma questão a ser discutida. Estudos sugerem que a resistência ou a diminuída sensibilidade possa ser também intrínseca em alguns casos, pois isolados clínicos e ambientais de *C.neoformans* que nunca foram expostos ao FCL exibiram reduzida suscetibilidade ao mesmo, sugerindo a necessidade de estudar os mecanismos envolvidos e a sensibilidade de cada isolado, acompanhando o surgimento de possível resistência em pacientes em uso de FCL com o objetivo de evitar possíveis falhas terapêuticas (167).

Estudo realizado na Índia por Chowdhary et al. (162) comparou as espécies *C.neoformans*(n =246) e *C.gattii* (n = 62) quanto ao perfil de sensibilidade frente aos antifúngicos, utilizando a metodologia de microdiluição em caldo, padronizada pelo CLSI. Os resultados demonstraram que a espécie *C.gattii* é menos suscetível aos derivados azoicos do que *C.neoformans*. Entre os antifúngicos AMB e 5FC não foram observadas diferenças significativas.

Outros estudos também reportaram que isolados de *C.gattii* são menos suscetíveis aos antifúngicos AMB, ITC, FCL, VRC, cetoconazol (KTC) e ravuconazol (RVC) do que os isolados de *C.neoformans* (165,167-169).

O isolado ambiental de *C.neoformans* (CnHC1) apresentou valores de CIM de 0,5 µg/mL para AMB, 4 µg/mL para 5FC, 4 µg/mL para FCL, 0,06 µg/mL para VRC e 0,5 µg/mL para ITC.

Andrade-Silva et al. (164) ao avaliarem 81 isolados ambientais de *C.neoformans* quanto ao perfil de sensibilidade, encontraram valores de CIM variando de 0,03-1 µg/mL para AMB, 0,12-64 µg/mL para FCL, 0,03-2µg/mL para VRC, 0,03-1 µg/mL para ITC e 0,03-2µg/mL para KTC.

A determinação do genótipo das espécies de *Cryptococcus* é muito importante para o entendimento da epidemiologia desses micro-organismos. Em adição, diferenças de suscetibilidade frente aos antifúngicos entre os diferentes genótipos já foi descrita, enfatizando a importância de definir o tipo molecular ao se diagnosticar a criptococose para assim decidir qual a melhor opção de tratamento (165).

Como no presente estudo, em trabalho realizado por Guinea et al. (166), também foi observada diferença significativa de CIM de AMB para os diferentes genótipos de *C.neoformans*.

Estudo de Trilles et al. (165), avaliou o perfil de suscetibilidade de isolados clínicos e ambientais de *C. neoformans* (VNI, n = 18), de *C. gattii* (VGI, n = 11) e de *C.gattii* (VGII, n = 38), frente a 8 antifúngicos: AMB, 5FC, FCL, ITC, VRC, KTC, RVC e albaconazol (ABZ) e foi possível observar que o genótipo VGII foi o menos suscetível entre os genótipos avaliados, seguido do VGI e VNI, indicando uma relação entre o genótipo e o perfil de sensibilidade frente aos antifúngicos.

Lockhart et al. (121) avaliaram a correlação entre o genótipo e o perfil de suscetibilidade, utilizando a metodologia padronizada pelo CLSI de microdiluição em caldo, dos antifúngicos FCL, ITC VRC e posaconazol (PSC) de 298 isolados de *C.gattii*

provenientes dos Estados Unidos, Austrália, Índia e de países da África. Os isolados eram originados de amostras clínicas humanas (n = 219), amostras clínicas veterinárias (n = 62) e ambientais (n = 17). Para os antifúngicos FCL, ITC e VRC o genótipo VGII foi o menos suscetível, seguido por VGIV, VGIII e VGI. Para o antifúngico PSC os genótipos VGIII e VGIV foram menos suscetíveis do que o VGII. Além dessa análise, os pesquisadores observaram que dentro de um mesmo genótipo, nas subclassificações obtidas por técnicas como MLST, é possível encontrar diferenças de suscetibilidade, e ainda constataram que para isolados de um mesmo genótipo, vindos de localidades diferentes, podem haver diferenças no perfil de suscetibilidade.

Estudo de Chong et al. (170) comparou, através da metodologia de microdiluição em caldo do CLSI, o perfil de suscetibilidade frente aos antifúngicos AMB, 5FC, FCL, VRC e ITC de diferentes genótipos de *Cryptococcus* spp.. Foi possível observar que o genótipo VGII (*C.gattii*) apresentou maiores valores de CIM, comparados com os de outros genótipos de *C.gattii* frente aos compostos FCL, VRC, ITC e 5FC. Além disso, os isolados de *C.gattii*, pertencentes ao genótipo VGII provenientes da Austrália precisavam de maiores concentrações de antifúngicos para serem inibidos, em comparação com os isolados do mesmo genótipo vindos do Canadá. O genótipo VNII (*C.neoformans*) foi mais sensível ao FCL do que o genótipo VNI (*C.neoformans*).

As CIMs encontradas para os isolados ambientais de *C.albidus* variaram de 0,5 – 1 µg/mL para AMB; foram > 64 µg/mL para 5FC; variaram de 4 a > 64 µg/mL para FCL; 0,06 – 1 para VRC e de 0,06 a > 8 µg/mL para ITC. Resistência ao FCL e ao ITC já foi descrita em isolados de *C.albidus* (48).

As CIMs encontradas para os isolados de *C.laurentii* foram: 1 µg/mL para AMB; > 64 µg/mL para 5-FC; variaram de 2 – 8 µg/mL para FCL; 0,125 – 0,5 para VRC e 0,06 –

0,125 µg/mL para ITC. Para ambas espécies, foram encontrados elevados valores de CIM para 5FC, sendo os valores de CIM > 64 µg/mL.

Há poucos estudos na literatura avaliando a sensibilidade de espécies não pertencentes ao complexo *C.neoformans/C.gattii*. Assim como neste trabalho, outros autores encontraram elevados valores de CIM para os antifúngicos 5-FC e FCL frente a isolados de *C.albidus* e *C.laurentii* (171-174).

Alguns casos são descritos na literatura de tratamentos que foram bem sucedidos com a utilização de FCL contra infecção por *C.laurentii* (49,175).

Ragupathi & Reyna (176) relataram um caso de peritonite causada por *C.albidus*, em paciente com diálise peritoneal, com doença renal e hepatite. O paciente foi tratado com AMB contra a infecção fúngica e respondeu bem ao tratamento.

Foi possível encontrar boa performance em todas as associações de antifúngicos realizadas frente a isolados clínicos de *Cryptococcus*. É possível observar queda significativa nos valores de CIM dos antifúngicos combinados em comparação com as CIMs dos antifúngicos isolados, sugerindo que quando associados, os compostos necessitam menores concentrações para inibirem os micro-organismos. O efeito de diminuição dos valores de CIM é observado até mesmo nos casos de efeito de interação indiferente (apêndice 3).

Não foi observado efeito antagônico em nenhuma das associações realizadas contra os 75 isolados clínicos estudados.

O genótipo VNI de *C.neoformans* mostrou 75,80% de interação sinérgica para AMB + 5FC; 79,03% para AMB + FCL; 77,41% para AMB +TRB e 95,16% para FCL + TRB. O genótipo VNII apresentou 100% de sinergismo em todas as combinações. *C.gattii*

(VGII) apresentou 88,91% de sinergismo na combinação entre AMB + 5FC e entre AMB + FCL e 100% de sinergismo nas duas associações envolvendo o antifúngico TRB.

Mais de 95% de sinergismo foi observado na associação entre FCL e TRB contra o genótipo VNI e para os genótipos VNII e VGII o efeito sinérgico chegou a 100%.

Os bons resultados entre as associações realizadas *in vitro* entre TRB e FCL estão de acordo com outros estudos que demonstram o efeito sinérgico entre azólicos e TRB para isolados de *Zigomicetos* (177), *Fonsecaea pedrosoi*, *Cladophialophora carrioni*, *Phialophora verrucosa* (178), *Scedosporium* (179), *Pythium* (130) e espécies de *Aspergillus* (180) com a utilização da metodologia de “tabuleiro de xadrez”.

O efeito sinérgico entre TRB e os azólicos se deve ao fato de ambos agirem na via da síntese de ergosterol, porém em diferentes pontos. Enquanto que a TRB inibe a enzima esqualeno epoxidase, os derivados azólicos agem por meio do bloqueio da enzima 14- α -demetilase, presente no citocromo P-450 da célula fúngica (181).

Estudo de Cantón et al. (182) analisou o efeito entre antifúngicos combinados contra isolados de *Candida* spp. através do método de tabuleiro de xadrez, com a utilização de E-test® e através de curvas de morte. Foram avaliadas duas combinações com o antifúngico TRB, FCL+ TRB e VRC+TRB contra 20 isolados de *Candida* spp.. Os pesquisadores observaram boa correlação entre as metodologias e os resultados mostraram que houve efeito sinérgico entre os antifúngicos para a maioria dos isolados de *C.albicans*, *C.glabrata* e *C.tropicalis*. Contra os isolados de *C.krusei* foi observado efeito indiferente nas duas combinações. Outros estudos também encontraram efeito sinérgico entre azólicos e TRB contra espécies de *Candida* (183,184).

Biancalana et al. (185) avaliaram, a atividade *in vitro* de TRB em associação com VRC, AMB (poliênico) e ITC contra isolados clínicos de fungos demáceos. Foi observado

100% de sinergismo na associação entre TRB e VRC, 96.5% de efeito sinérgico entre TRB e AMB, e 75.9% de sinergismo entre TRB e ITC.

Zhang et al. (181) avaliaram o efeito de TRB em associação com AMB, PSC e ITC contra isolados de *Mucor irregularis*. Valores de sinergismo foram de 38,9; 33,3 e 44.4%, respectivamente. Não foi observado efeito antagônico.

Ainda não há ponto de corte estabelecido para a TRB para *Cryptococcus*, mas alguns autores consideram que CIM > 8µg/mL é indicativo de resistência para espécies de *Candida* (113,115,186). No presente estudo os intervalos de CIM foram 0,125-2 µg/mL para *C.neoformans* e de 0,5-4 µg/mL para *C.gattii* (tabela 6).

Guerra et al. (115) avaliaram a TRB *in vitro* contra isolados de *C.neoformans*. Os pesquisadores demonstraram que a TRB sozinha exerce potente efeito contra isolados de *Cryptococcus*, inclusive em isolados resistentes à AMB. Os valores de CIM obtidos para a TRB contra 20 isolados clínicos de *C.neoformans* foram de 0,12 – 0,5 µg/mL. Os pesquisadores também avaliaram três associações com a TRB, TRB + FCL, TRB + ITC e TRB + AMB contra dois isolados de *C.neoformans* (escolhidos por apresentarem resultados distintos nos testes com antifúngicos isolados). As três combinações de antifúngicos exibiram efeito sinérgico contra os dois isolados. Além disso, foram realizadas análises estruturais nas células fúngicas após o tratamento com os antifúngicos e foi observado que, quando associados, os antifúngicos AMB e TRB provocaram maiores danos nas células em comparação com o controle e em comparação com as células tratadas com os antifúngicos isolados.

Clinicamente, há estudos isolados relatando a utilização da TRB em associação com outros antifúngicos no tratamento de IFIs. Um caso de candidíase resistente ao FCL e à

TRB sozinhos, respondeu positivamente após a utilização dos dois antifúngicos ao mesmo tempo (187).

Casos de fusariose invasiva que responderam à utilização de TRB associada a outros antifúngicos como AMB (188) e VRC (116) também já foram relatados.

A *Infectious Diseases Society of America* (61) e a Organização Mundial da Saúde (101) recomendam a utilização de AMB e 5FC como a primeira linha de antifúngicos na fase de indução do tratamento de meningite causada por *Cryptococcus*.

No entanto, o acesso à terapia recomendada (associação de AMB e 5FC) e mais efetiva da criptococose até o momento, é dificultado em diversos países, inclusive no Brasil (103,104).

Estudo de Dromer et al. (189) analisou os resultados obtidos no tratamento de 230 pacientes com criptococose. Os pesquisadores observaram que houve menor número de falhas terapêuticas e mortes em pacientes que receberam o regime recomendado de AMB e 5FC, em comparação com os pacientes que receberam AMB e FCL.

Estudo clínico com 299 pacientes realizado por Day et al. (190) mostrou diminuída mortalidade em pacientes com criptococose tratados com AMB em associação com 5FC em comparação com pacientes que receberam o tratamento com AMB sozinha.

Em meta-análise realizada por Yao et al. (191) comparando a terapia recomendada de indução com terapias com FCL foi possível confirmar que há menor mortalidade nos pacientes que recebem a terapia recomendada de AMB e 5FC em relação aos outros esquemas de tratamentos.

De acordo com os resultados obtidos, talvez a terbinafina em associação com os demais antifúngicos possa suprir, ao menos em parte, a atual falta de 5FC no Brasil.

Trabalhos governamentais precisam ser realizados para aumentar o acesso aos agentes antifúngicos em muitos locais em todo o mundo, inclusive no Brasil. De mesma importância, para otimizar a utilização dos antifúngicos existentes, estudos que avaliem a utilização mais ampla dos mesmos são necessários para buscar novas estratégias que possam ser seguidas no tratamento de IFIs como a criptococose.

O presente estudo possuiu algumas limitações. Em relação aos isolados ambientais, o pequeno número de isolados de *C.neoformans* e *C.gattii*, provavelmente, se deveu ao fato de os ambientes públicos determinados para a coleta de excretas passarem por higienização diária, diminuindo o acúmulo de fezes. Além disso foi realizado um reduzido número de coletas que, se ampliado, poderia aumentar as chances de isolamento desses micro-organismos.

Para os isolados clínicos, uma limitação poderia ser atribuída aos resultados dos testes de suscetibilidade frente aos antifúngicos, uma vez que os valores de CIM não puderam, até o momento, ser relacionados com os desfechos clínicos dos pacientes, principalmente nos casos em que foram obtidos valores elevados de CIM.

Além disso, apesar dos bons resultados apresentados *in vitro* do antifúngico TRB frente a isolados clínicos de *Cryptococcus* spp., esse antifúngico parece não ser capaz de penetrar a barreira hematoencefálica (BHE) em quantidade suficiente para ser efetiva no tratamento de meningite.

Estudo realizado por Machard et al. (192) avaliou a penetração de TRB pela BHE em ratos. O antifúngico foi diretamente administrado na artéria carótida dos animais e foi detectado em concentrações maiores do que as esperadas no cérebro dos animais. Por outro lado, estudo realizado por Sorensen et al. (193), que avaliou a utilização oral de TRB para o tratamento de animais com meningite coccidióidica, demonstrou que seu uso apenas

atenuou a infecção de forma não significativa e níveis de TRB não foram detectados no cérebro dos animais. Estudos que pudessem solucionar o problema da penetração do antifúngico TRB pela BHE são necessários para a possível utilização de TRB e de outros antifúngicos em casos de meningite por *Cryptococcus* spp. e outros agentes.

6. Conclusões

- Foi possível reativar 68,18% dos isolados clínicos selecionados para o presente estudo indicando a necessidade da implantação de um método mais efetivo para armazenamento de longo prazo.
- A partir de coletas ambientais realizadas na cidade de Campinas, 92 isolados de *Cryptococcus* spp. foram obtidos, sendo 11 da espécie *C.neoformans*. O presente estudo chama a atenção, para o isolamento de espécies de *Cryptococcus* em áreas urbanas da cidade de Campinas, indicando um risco para a saúde pública, especialmente para indivíduos imunossuprimidos.
- Estudos epidemiológicos adicionais podem ajudar a confirmar e definir os cenários de infecção por esses agentes e ainda estimular as campanhas de saúde para a comunidade em geral, com o objetivo de estimular a população a manter os ambientes limpos e evitar o acúmulo de fezes de pombos em áreas de tráfego humano, principalmente em áreas hospitalares.
- A maioria dos isolados clínicos estudados pertence à espécie *C.neoformans* (88% do total) e o genótipo mais frequente é o VNI (82,7% do total). Todos os isolados ambientais de *C.neoformans* pertencem ao genótipo VNI.
- Embora ainda não haja pontos de corte estabelecidos para determinação de resistência aos antifúngicos de *Cryptococcus* spp, foram detectados vários isolados com CIMs elevadas frente ao antifúngico FCL. Para o antifúngico 5FC, foram observados elevados valores de CIM para isolados ambientais de *C.laurentii* e *C.albidus*.
- Pôde ser observada boa performance em todas combinações de antifúngicos realizadas, especialmente naquelas envolvendo a TRB para ambas as espécies *C.neoformans* e *C.gattii*. Para isolados de *C.neoformans* genótipo VNI, a melhor combinação foi FCL +TRB (95.16% de sinergismo) e para o genótipo VNII observou-se 100% de sinergismo para

todas as combinações estudadas. *C.gattii* (VGII) apresentou 100% de sinergismo nas duas associações envolvendo o antifúngico TRB.

- Em todas as associações realizadas, houve significativa redução dos valores de CIM para os antifúngicos quando associados em comparação com os valores de CIM dos mesmos avaliados isoladamente.

- Como perspectivas, a análise dos desfechos clínicos dos pacientes poderia esclarecer os questionamentos envolvendo os valores encontrados de CIM e a relação destes achados com o sucesso ou a falha terapêutica. Além disso, estudos que busquem solucionar o problema da penetração do antifúngico TRB pela BHE podem vir a ser a chave para a utilização futura de TRB e de outros antifúngicos em casos de meningite por *Cryptococcus* spp..

7. Referências

1. Barnett JA. A history of research on yeasts 14: medical yeasts part 2, *Cryptococcus neoformans*. Yeast. 2010 Nov; 27 (11):875-904.
2. Srikanta D, Santiago-Tirado FH, Doering TL. *Cryptococcus neoformans*: historical curiosity to modern pathogen. Yeast. 2014 Feb; 31(2):47-60.
3. Gatti F, Eeckels R. An atypical strain of *Cryptococcus neoformans* (San Felice) Vuillemin 1894. I. Description of the disease and of the strain. Ann Soc BelgesMed Trop Parasitol Mycol. 1970 Feb; 50(6):689-93.
4. Kwon-Chung KJ, Varma A. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? FEMS Yeast Res. 2006 Jun; 6(4):574-87.
5. Casadevall A, Perfect JR. *Cryptococcus neoformans*. Washington, DC: ASM Press, 1998.
6. Kwon-Chung KJ, Polacheck I, Bennett JE. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C). J Clin Microbiol. 1982 Mar; 15(3):535-7.
7. Meyer W, Castañeda A, Jackson S, Huynh M, Castañeda E. Molecular Typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* Isolates the IberoAmerican Cryptococcal Study Group Emerg Infect Dis. 2003 Feb; 9(2): 189–195.
8. Igreja RP, Lazéra M dos S, Wanke B, Galhardo MC, Kidd SE, Meyer W. Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients of the Brazilian city, Rio de Janeiro. Medical Mycology. 2004 Jun;42(3):229-38.
9. Litvintseva AP, Thakur R, Vilgalys R, Mitchell TG. Multilocus sequence typing reveals three genetic subpopulations of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A), including a unique population in Botswana. Genetics. 2006 Apr; 172(4):2223-38.
10. Bovers M, Hagen F, Boekhout T. Diversity of the *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex. Rev Iberoam Micol. 2008 Mar; 25(1):S4-12.
11. Romeo O, Scordino F, Chillemi V, Criseo G. *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* species complex in southern Italy: an overview on the environmental diffusion of serotypes, genotypes and mating-types. Mycopathologia. 2012 Oct; 174(4):283-91.
12. Cogliati M. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types. Scientifica (Cairo). 2013 Jan; 2013: 675213.
13. National Center for Biotechnology Information (NCBI) acessado em 03/06/2014. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=107441&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>
14. Zaragoza O, Fries BC, Casadevall A. Induction of capsule growth in *Cryptococcus neoformans* by mammalian serum and CO (2). Infect Immun. 2003 Nov; 71(11):6155-64.

15. Bose I, Reese AJ, Ory JJ, Janbon G, Doering TL. A yeast under cover: the capsule of *Cryptococcus neoformans*. Eukaryot Cell. 2003 Aug; 2(4):655-63.
16. Zaragoza O, Rodrigues ML, De Jesus M, Frases S, Dadachova E, Casadevall A. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. Adv Appl Microbiol. 2009; 68:133-216.
17. Heiss C, Klutts JS, Wang Z, Doering TL, Azadi P. The structure of *Cryptococcus neoformans* galactoxylomannan contains beta-D-glucuronic acid. Carbohydr Res. 2009 May; 344(7):915-20.
18. Heiss C, Skowyra ML, Liu H, Klutts JS, Wang Z, Williams M, Srikanta D, Beverley SM, Azadi P, Doering TL. Unusual galactofuranose modification of acapsule polysaccharide in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. J BiolChem. 2013 Apr; 288(16):10994-1003.
19. McFadden DC, De Jesus M, Casadevall A. The physical properties of the capsular polysaccharides from *Cryptococcus neoformans* suggest features for capsule construction. J Biol Chem. 2006; 281(4):1868–75.
20. Cordero RJ, Frases S, Guimarães AJ, Rivera J, Casadevall A. Evidence for branching in cryptococcal capsular polysaccharides and consequences on its biological activity. Mol Microbiol. 2011 Feb; 79(4):1101-17.
21. Kwon-Chung KJ. 1975. A new genus, *Filobasidiella*, the perfect state of *Cryptococcus neoformans*. Mycologia 67: 1197–1200.
22. Kwon-Chung KJ. 1976. Morphogenesis of *Filobasidiella neoformans*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans*. Mycologia 68:821–833.
23. Kwon-Chung KJ. 1976. A new species of *Filobasidiella*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans* B and C serotypes. Mycologia 68: 942–946.
24. Kwon-Chung KJ. 1980. Nuclear genotypes of spore chains in *Filobasidiella neoformans* (*Cryptococcus neoformans*). Mycologia 72: 418–422.
25. Lin X, Heitman J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. Annu Rev Microbiol. 2006; 60:69–105.
26. Ni M, Feretzaki M, Li W, Floyd-Averette A, Mieczkowski P, Dietrich FS, Heitman J. Unisexual and heterosexual meiotic reproduction generate aneuploidy and phenotypic diversity de novo in the yeast *Cryptococcus neoformans*. PLoS Biol. 2013 Sep; 11(9):e1001653.
27. Lin X, Hull CM, Heitman J. Sexual reproduction between partners of the same mating type in *Cryptococcus neoformans*. Nature. 2005. 434: 1017–1021.
28. Lin X, Litvintseva AP, Nielsen K, Patel S, Floyd A, Mitchell TG, Heitman J. alpha AD alpha hybrids of *Cryptococcus neoformans*: evidence of same-sex mating innature and hybrid fitness. PLoS Genet. 2007 Oct; 3(10):1975-90.

29. Andrade-Silva L, Ferreira-Paim K, Silva-Vergara ML, Pedrosa AL. Molecular characterization and evaluation of virulence factors of *Cryptococcus laurentii* and *Cryptococcus neoformans* strains isolated from external hospital areas. *Fungal Biol.* 2010 May-Jun; 114(5-6):438-45.
30. Faria RO, Nascente Pda S, Meinerz AR, Cleff MB, Antunes Tde A, Silveira Eda S, Nobre Mde O, Meireles MC, Mello JR. [Occurrence of *Cryptococcus neoformans* in pigeon excrement in the city of Pelotas, State of Rio Grande do Sul]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2010 Mar-Apr; 43(2):198-200.
31. Rosario I, Soro G, Déniz S, Ferrer O, Acosta F, Padilla D, Acosta B. Presence of *C. albidus*, *C. laurentii* and *C. uniguttulatus* in crop and droppings of pigeon lofts (*Columba livia*). *Mycopathologia.* 2010 Apr; 169(4):315-9.
32. Mseddi F, Sellami A, Jarboui MA, Sellami H, Makni F, Ayadi A. First environmental isolations of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Tunisia and review of published studies on environmental isolations in Africa. *Mycopathologia.* 2011 May; 171(5):355-60.
33. Lazéra MS, Pires FDA, Camillo-Coura L, Nishikawa MM, Bezera CCF, Trilles L, Wanke B. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in decaying wood forming hollows in living trees. *J Med Vet Mycol.* 1996. 34: 127-131.
34. Lazera MS, Salmito Cavalcanti MA, Londero AT, Trilles L, Nishikawa MM, Wanke B. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. *Med Mycol.* 2000 Oct; 38(5):379-83.
35. Li AS, Pan WH, Wu SX, Hideaki T, Guo NR, Shen YN, Lu GX, Pan RG, Zhu MC, Chen M, Shi WM, Liao WQ. Ecological surveys of the *Cryptococcus* species complex in China. *Chin Med J (Engl)* 2012. 125(3):511-6.
36. Leite DP Jr, Amadio JV, Martins ER, Simões SA, Yamamoto AC, Leal-Santos FA, Takahara DT, Hahn RC. *Cryptococcus* spp isolated from dust microhabitat in Brazilian libraries. *J Occup Med Toxicol.* 2012 Jun; 7(1):11.
37. Kidd SE, Hagen F, Tschärke RL, Bartlett KH, Fyfe M, MacDougall L, et al. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101:17258–63.
38. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2010) Emergence of *Cryptococcus gattii*—Pacific Northwest, 2004– 2010. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 59(28):865–868.
39. Kidd SE, Chow Y, Mak S, Bach PJ, Chen H, Hingston AO, Kronstad JW, Bartlett KH. Characterization of environmental sources of the human and animal pathogen *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and the Pacific Northwest of the United States. *Appl Environ Microbiol.* 2007 Mar; 73(5):1433-43.
40. Ribeiro MA, Ngamskulrungron P. Molecular characterization of environmental *Cryptococcus neoformans* isolated in Vitoria, ES, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2008 Nov-Dec; 50(6):315-20.

41. Takahara DT, Lazéra Mdos S, Wanke B, Trilles L, Dutra V, Paula DA, Nakazato L, Anzai MC, Leite Júnior DP, Paula CR, Hahn RC. First report on *Cryptococcus neoformans* in pigeon excreta from public and residential locations in the metropolitan area of Cuiabá, State of Mato Grosso, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2013 Nov-Dec; 55(6):371-6.
42. Trilles L, Lazéra M, Wanke B, Theelen B, Boekhout T. Genetic characterization of environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex from Brazil. *Med Mycol*. 2003 Oct; 41(5):383-90.
43. Costa Sdo P, Lazéra Mdos S, Santos WR, Morales BP, Bezerra CC, Nishikawa MM, Barbosa GG, Trilles L, Nascimento JL, Wanke B. First isolation of *Cryptococcus gattii* molecular type VGII and *Cryptococcus neoformans* molecular type VNI from environmental sources in the city of Belém, Pará, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009 Jul; 104(4):662-4.
44. Colom MF, Hagen F, Gonzalez A, Mellado A, Morera N, Linares C, García DF, Peñataro JS, Boekhout T, Sánchez M. Ceratonia siliqua (carob) trees as natural habitat and source of infection by *Cryptococcus gattii* in the Mediterranean environment. *Med Mycol*. 2012 Jan; 50(1):67-73.
45. Chowdhary A, Randhawa HS, Boekhout T, Hagen F, Klaassen CH, Meis JF. Temperate climate niche for *Cryptococcus gattii* in Northern Europe. *Emerg Infect Dis*. 2012 Jan; 18(1):172-4.
46. Khawcharoenporn, T., A. Apisarnthanarak, and L. M. Mundy. Non-*neoformans* cryptococcal infections: a systematic review. *Infection* 2007. 35:51–58.
47. Kulkarni A, Sinha M, Anandh U. Primary cutaneous cryptococcosis due to *Cryptococcus laurentii* in a renal transplant recipient. *Saudi J Kidney Dis Transpl*. 2012 Jan; 23(1):102-5.
48. Cleveland KO, Gelfand MS, Rao V. Posaconazole as successful treatment for fungemia due to *Cryptococcus albidus* in a liver transplant recipient. *QJM*. 2013 Apr; 106(4):361-2.
49. Molina-Leyva A, Ruiz-Carrascosa JC, Leyva-Garcia A, Husein-Elahmed H. Cutaneous *Cryptococcus laurentii* infection in an immunocompetent child. *Int J Infect Dis*. 2013 Dec; 17(12):e1232-3.
50. Labrecque O, Sylvestre D, Messier S. Systemic *Cryptococcus albidus* infection in a Doberman Pinscher. *J Vet Diagn Invest*. 2005 Nov; 17(6):598-600.
51. Liu Y, Ma S, Wang X, Xu W, Tang J. *Cryptococcus albidus* encephalitis in newly diagnosed HIV-patient and literature review. *Med Mycol Case Rep*. 2013 Nov; 23;3:8-10.
52. Lee YA, Kim HJ, Lee TW, Kim MJ, Lee MH, Lee JH, Ihm CG. First report of *Cryptococcus albidus*-induced disseminated cryptococcosis in a renal transplant recipient. *Korean J Intern Med*. 2004 Mar; 19(1):53-7.

53. Mattsson R, Haemig PD, Olsen B. Feral pigeons as carriers of *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus uniguttulatus* and *Debaryomyces hansenii*. Med Mycol. 1999 Oct; 37(5):367-9.
54. Teodoro VL, Gullo FP, Sardi Jde C, Torres EM, Fusco-Almeida AM, Mendes-Giannini MJ. Environmental isolation, biochemical identification, and antifungal drug susceptibility of *Cryptococcus* species. Rev Soc Bras Med Trop. 2013 Nov-Dec; 46(6):759-64.
55. Canónico-González Y, Adame-Rodríguez JM, Mercado-Hernández R, Aréchiga-Carvajal ET. *Cryptococcus* spp. isolation from excreta of pigeons (*Columba livia*) in and around Monterrey, Mexico. Springerplus. 2013 Nov; 2:632.
56. Patterson TF. Advances and challenges in management of invasive mycoses. Lancet. 2005 Sep 17-23; 366 (9490):1013-25.
57. Pappas PG, Alexander BD, Andes DR, Hadley S, Kauffman CA, Freifeld A, Anaissie EJ, Brumble LM, Herwaldt L, Ito J, Kontoyiannis DP, Lyon GM, Marr KA, Morrison VA, Park BJ, Patterson TF, Perl TM, Oster RA, Schuster MG, Walker R, Walsh TJ, Wannemuehler KA, Chiller TM. Invasive fungal infections among organ transplant recipients: results of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET). Clin Infect Dis. 2010 Apr; 50(8):1101-11.
58. Colombo AL, Guimarães T, Camargo LF, Richtmann R, Queiroz-Telles Fd, Salles MJ, Cunha CA, Yasuda MA, Moretti ML, Nucci M. Brazilian guidelines for the management of candidiasis - a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Braz J Infect Dis. 2013 May-Jun; 17(3):283-312.
59. Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. AIDS 2009. 23, 525–530.
60. Ruan SY, Chien JY, Hsueh PR. Invasive trichosporonosis caused by *Trichosporon asahii* and other unusual *Trichosporon* species at a medical center in Taiwan. Clin Infect Dis. 2009 Jul; 49(1):e11-7.
61. Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of America. Clin Infect Dis 2010; 50: 291–322.
62. Chen J, Varma A, Diaz MR, Litvintseva AP, Wollenberg KK, Kwon-Chung KJ. *Cryptococcus neoformans* strains and infection in apparently immunocompetent patients, China. Emerg Infect Dis. 2008 May; 14(5):755-62.
63. Byrnes EJ 3rd, Bildfell RJ, Frank SA, Mitchell TG, Marr KA, Heitman J. Molecular evidence that the range of the Vancouver Island outbreak of *Cryptococcus gattii* infection has expanded into the Pacific Northwest in the United States. J Infect Dis. 2009 Apr; 199(7):1081-6.

64. Botts MR, Giles SS, Gates MA, Kozel TR, Hull CM. Isolation and characterization of *Cryptococcus neoformans* spores reveal a critical role for capsule biosynthesis genes in spore biogenesis. *Eukaryot Cell*. 2009 Apr; 8(4):595-605.
65. Li SS, Mody CH. *Cryptococcus*. *Proc Am Thorac Soc*. 2010 May; 7(3):186-96.
66. Kumar P, Saran RK, Gondal R, Malhotra V. Smear morphology of cryptococcosis presenting as a subcutaneous swelling in healthy adults: a report of three cases. *Cytopathology* 2005. 6:143-6.
67. Bivanco FC, Machado CAS, Martins EL. Criptococose cutânea. *Arq Med ABC* 2006. 31(2):102-9.
68. McMullan BJ, Sorrell TC, Chen SC. *Cryptococcus gattii* infections: contemporary aspects of epidemiology, clinical manifestations and management of infection. *Future Microbiol*. 2013 Dec; 8:1613-31.
69. Yang CJ, Hwang JJ, Wang TH et al. Clinical and radiographic presentations of pulmonary cryptococcosis in immunocompetent patients. *and. J. Infect. Dis*. 2006. 38, 788–793.
70. Bicanic T, Harrison TS: Cryptococcal meningitis. *Br Med Bull*. 2005. 72:99-118.
71. Harrison TS. The burden of HIV-associated cryptococcal disease. *AIDS*. 2009 Feb; 23(4):531-2.
72. Munivenkataswamy R, Gopi A, Usman SM, Jagadeesh. Human immunodeficiency virus associated cryptococcal meningitis at a tertiary care centre: diagnostic tools and antifungal susceptibility testing. *J Clin Diagn Res*. 2013 Aug; 7(8):1623-5.
73. Marukutira T, Huprikar S, Azie N, Quan SP, Meier-Kriesche HU, Horn DL. Clinical characteristics and outcomes in 303 HIV-infected patients with invasive fungal infections: data from the Prospective Antifungal Therapy Alliance registry, a multicenter, observational study. *HIV AIDS (Auckl)*. 2014 Mar; 6:39-47.
74. Nucci M, Queiroz-Telles F, Tobón AM, Restrepo A, Colombo AL. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. *Clin Infect Dis*. 2010 Sep; 51(5):561-70.
75. Prado M, Silva MB, Laurenti R, Travassos LR, Taborda CP. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009. 104(3):513–521.
76. Trilles L, Lazéra Mdos S, Wanke B, Oliveira RV, Barbosa GG, Nishikawa MM, Morales BP, Meyer W. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008. Aug; 103(5):455-62.
77. Leal AL, Faganello J, Fuentefria AM, Boldo JT, Bassanesi MC, Vainstein MH. Epidemiological profile of cryptococcal meningitis patients in Rio Grande do Sul, Brazil. *Mycopathologia*. 2008 Aug; 166(2):71-5.

78. Santos WR, Meyer W, Wanke B, Costa SPSE, Trilles L, Nascimento JLM, Medeiros R, Morales BP, Bezerra CCF, Macêdo RCL, Ferreira SO, Barbosa GG, Perez MA, Nishikawa MM, Lazéra MS. Primary endemic *Cryptococcus gattii* by molecular type VGII in the state of Pará, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2008. 103:813–818.
79. Souza LKH, Souza Junior AH, Costa CR, Faganello J, Vainstein MH, Chagas ALB, Souza ACM, Silva MRR. Molecular typing and antifungal susceptibility of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* species complex isolates in Goiânia, Brazil. *Mycoses*. 2009. 53: 62-67.
80. Mora DJ, da Cunha Colombo ER, Ferreira-Paim K, Andrade-Silva LE, Nascentes GA, Silva-Vergara ML. Clinical, epidemiological and outcome features of patients with cryptococcosis in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. *Mycopathologia*. 2012 Jun; 173(5-6):321-7.
81. Freire AK, dos Santos Bentes A, de Lima Sampaio I, Matsuura AB, Ogusku MM, Salem JI, Wanke B, de Souza JV. Molecular characterisation of the causative agents of Cryptococcosis in patients of a tertiary healthcare facility in the state of Amazonas-Brazil. *Mycoses*. 2012 May; 55(3):e145-50.
82. Marukutira T, Huprikar S, Azie N, Quan SP, Meier-Kriesche HU, Horn DL. Clinical characteristics and outcomes in 303 HIV-infected patients with invasive fungal infections: data from the Prospective Antifungal Therapy Alliance registry, a multicenter, observational study. *HIV AIDS (Auckl)*. 2014 Mar; 6:39-47.
83. Nadrous HF, Antonios VS, Terrell CL, Ryu JH. Pulmonary cryptococcosis in non-immunocompromised patients. *Chest*. 2003 Dec; 124(6):2143-7.
84. Moretti ML, Resende MR, Lazéra MS, Colombo AL, Shikanai-Yasuda MA. Guidelines in cryptococcosis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008 Sep-Oct; 41(5):524-44.
85. Lacaz SC, Porto E, Martins JEC, Heinz-Vacari EM, Melo NT. *Tratado de Micologia Médica*. 9^o edição. São Paulo: Sarvier, 2002.
86. Kwon-Chung KJ, Polacheck I, Bennet JE. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var *gattii* (serotype B and C). *J.Clin. Microbiol.*1982. 15:535-537.
87. Massonet C, Van Eldere J, Vanechoutte M, De Baere T, Verhaegen J, Lagrou K. Comparison of VITEK 2 with ITS2-fragment length polymorphism analysis for identification of yeast species. *J Clin Microbiol*. 2004 May; 42(5):2209-11.
88. Wengenack NL, Binnicker MJ. Fungal molecular diagnostics. *Clin Chest Med*. 2009 Jun; 30(2):391-408.
89. Feng X, Fu X, Ling B, Wang L, Liao W, Pan W, Yao Z. Rapid differentiation of cryptic species within *Cryptococcus gattii* by a duplex PCR assay. *J Clin Microbiol*. 2013 Sep; 51(9):3110-2.

90. McTaggart L, Richardson SE, Seah C, Hoang L, Fothergill A, Zhang SX. Rapid identification of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*, *C. neoformans* var. *neoformans*, and *C. gattii* by use of rapid biochemical tests, differential media, and DNA sequencing. J Clin Microbiol. 2011 Jul; 49(7):2522-7.
91. Soper SA, Williams DC, Xu Y, Lassiter SJ, Zhang Y, Ford SM, Bruch RC. Sanger DNA-sequencing reactions performed in a solid-phase nanoreactor directly coupled to capillary gel electrophoresis. Anal Chem. 1998 Oct; 70(19):4036-43.
92. Ferreira-Paim K, Andrade-Silva L, Mora DJ, Pedrosa AL, Rodrigues V, Silva-Vergara ML. Genotyping of *Cryptococcus neoformans* isolated from captive birds in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. Mycoses. 2011 Sep; 54(5):e294-300.
93. Kõljalg U, Nilsson RH, Abarenkov K, Tedersoo L, Taylor AF, Bahram M, Bates ST, Bruns TD, Bengtsson-Palme J, Callaghan TM, Douglas B, Drenkhan T, Eberhardt U, Dueñas M, Grebenc T, Griffith GW, Hartmann M, Kirk PM, Kohout P, Larsson E, Lindahl BD, Lücking R, Martín MP, Matheny PB, Nguyen NH, Niskanen T, Oja J, Peay KG, Peintner U, Peterson M, Põldmaa K, Saag L, Saar I, Schüßler A, Scott JA, Senés C, Smith ME, Suija A, Taylor DL, Telleria MT, Weiss M, Larsson KH. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. Mol Ecol. 2013 Nov; 22(21):5271-7.
94. Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W; Fungal Barcoding Consortium; Fungal Barcoding Consortium Author List. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Apr; 109(16):6241-6.
95. Meyer W, Mitchell TG. Polymerase chain reaction fingerprinting in fungi using single primers specific to minisatellites and simple repetitive DNA sequences: strain variation in *Cryptococcus neoformans*. Electrophoresis. 1995 Sep; 16(9):1648-56.
96. Boekhout T, Theelen B, Diaz M, Fell JW, Hop WC, Abeln EC, Dromer F, Meyer W. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. Microbiology 2001 147: 891–907.
97. Hagen F, Illnait-Zaragozi MT, Bartlett KH, Swinne D, Geertsens E, Klaassen CH, Boekhout T, Meis JF. In vitro antifungal susceptibilities and amplified fragment length polymorphism genotyping of a worldwide collection of 350 clinical, veterinary, and environmental *Cryptococcus gattii* isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2010 Dec; 54(12):5139-45.
98. Litvintseva AP, Thakur R, Vilgalys R, Mitchell TG. Multilocus sequence typing reveals three genetic subpopulations of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A), including a unique population in Botswana. Genetics. 2006; 172:2223–38.
99. Meyer W, Aanensen DM, Boekhout T, Cogliati M, Diaz MR, Esposto MC, Fisher M, Gilgado F, Hagen F, Kaocharoen S, Litvintseva AP, Mitchell TG, Simwami SP, Trilles L, Viviani MA, Kwon-Chung J. Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. Med Mycol. 2009; 47(6):561-70.

100. National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10188949>)
101. World Health Organization. Rapid advice: diagnosis, prevention a management of cryptococcal disease in HIV-infected adults, adolescents and children Geneva: WHO, Dec 2011. http://www.who.int/hiv/pub/cryptococcal_disease2011/en/index.html. (Acessado 03/2014).
102. Espinel-Ingroff A. Novel antifungal agentes, targets or therapeutic strategies for the treatment of invaise fungal diseases: a review of the literature (2005-2009). Rev Iberoamericana de Mícolgia. 2009. 26(1):15-22.
103. Moreira ME. Controversies about the management of invasive fungal infections in very low birth weight infants. J Pediatr (Rio J). 2005 Mar;81(1 Suppl):S52-8.
104. Loyse A, Dromer F, Day J, Lortholary O, Harrison TS. Flucytosine and cryptococcosis: time to urgently address the worldwide accessibility of a 50-year-old antifungal. J Antimicrob Chemother. 2013 November; 68(11): 2435–2444.
105. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/renome/renome_2006_5ed.pdf
106. Posteraro B, Torelli R, De Carolis E, Posteraro P, Sanguinetti M. Antifungal susceptibility testing: current role from the clinical laboratory perspective. Mediterr J Hematol Infect Dis. 2014 Apr; 6(1):e2014030.
107. *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard, third edition. CLSI document M27-A3. Wayne, PA, 2008.
108. Sidrim JJC, Rocha MFG. Micologia Médica à luz de autores contemporâneos. 1 ed. Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan; 2004.
109. Ellis D. Amphotericin B: spectrum and resistance. J Antimicrob Chemother. 2002 Feb; 49 Suppl 1:7-10.
110. Hamill RJ, Sobel JD, El-Sadr W, Johnson PC, Graybill JR, Javaly K, Barker DE. Comparison of 2 doses of liposomal amphotericin B and conventional amphotericin B deoxycholate for treatment of AIDS-associated acute cryptococcal meningitis: arandomized, double-blind clinical trial of efficacy and safety. Clin Infect Dis. 2010 Jul; 51(2):225-32.
111. Perfect JR, Cox GM, Dodge RK, Schell WA. In vitro and in vivo efficacies ofthe azole SCH56592 against *Cryptococcus neoformans*. Antimicrob Agents Chemother. 1996 Aug; 40(8):1910-3.
112. Bennett J. E Flucytosine. Ann Intern Med. 1977 Mar; 86(3):319-21.
113. Ryder NS. Terbinafine: mode of action and properties of the squalene epoxidase inhibition. Br J Dermatol. 1992 Feb; 126 Suppl 39:2-7.

114. Krishnan-Natesan S. Terbinafine: a pharmacological and clinical review. *Expert Opin Pharmacother*. 2009 Nov; 10(16):2723-33.
115. Guerra CR, Ishida K, Nucci M, Rozental S. Terbinafine inhibits *Cryptococcus neoformans* growth and modulates fungal morphology. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012 Aug; 107(5):582-90.
116. Inano S, Kimura M, Iida J, Arima N. Combination therapy of voriconazole and terbinafine for disseminated fusariosis: case report and literature review. *J Infect Chemother*. 2013 Dec; 19(6):1173-80.
117. Abruzzo G K, Flattery A M, Gill C J, Kong L, Smith J G, Pikounis V B, Balkovec J M, Bouffard A F, Dropinski J F, Rosen H, Kropp H, Bartizal K. Evaluation of the echinocandin antifungal MK-0991 (L-743,872): efficacies in mouse models of disseminated aspergillosis, candidiasis, and cryptococcosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997 Nov; 41(11): 2333–2338.
118. Pfaller MA, Castanheira M, Messer SA, Moet GJ, Jones RN. Echinocandin and triazole antifungal susceptibility profiles for *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus fumigatus*: application of new CLSI clinical breakpoints and epidemiologic cutoff values to characterize resistance in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2009). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011 Jan; 69(1):45-50.
119. Pfaller MA, Messer SA, Woosley LN, Jones RN, Castanheira M. Echinocandin and triazole antifungal susceptibility profiles for clinical opportunistic yeast and mold isolates collected from 2010 to 2011: application of new CLSI clinical breakpoints and epidemiological cutoff values for characterization of geographic and temporal trends of antifungal resistance. *J Clin Microbiol*. 2013 Aug; 51(8):2571-81.
120. Espinel-Ingroff A, Aller AI, Canton E, Castañón-Olivares LR, Chowdhary A, Cordoba S, Cuenca-Estrella M, Fothergill A, Fuller J, Govender N, Hagen F, Illnait-Zaragozi MT, Johnson E, Kidd S, Lass-Flörl C, Lockhart SR, Martins MA, Meis JF, Melhem MS, Ostrosky-Zeichner L, Pelaez T, Pfaller MA, Schell WA, St-Germain G, Trilles L, Turnidge J. *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* species complex: an international study of wild-type susceptibility endpoint distributions and epidemiological cutoff values for fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Nov; 56(11):5898-906.
121. Lockhart SR, Iqbal N, Bolden CB, DeBess EE, Marsden-Haug N, Worhle R, Thakur R, Harris JR; *Cryptococcus gattii* PNW Public Health Working Group. Epidemiologic cutoff values for triazole drugs in *Cryptococcus gattii*: correlation of molecular type and in vitro susceptibility. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012 Jun; 73(2):144-8.
122. Odds FC, Brown AJ, Gow NA. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol*. 2003 Jun; 11(6):272-9.
123. Eliopoulos GM, Moellering RC. Antimicrobial combinations. In: Lorian V, editor. *Antibiotics in laboratory medicine*. 3rd ed. Baltimore, MD: Williams & Wilkins Co.; 432–92. 1991.

124. Ruíz-Cendoya M, Rodriguez MM, Mariné M, et al. *In vitro* interactions of itraconazole and micafungin against clinically important filamentous fungi. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2008 Nov; 32 (5):418-420.
125. Rodrigues EG, Lirio VS, Lacaz CS. Preservação de fungos e actinomicetos de interesse médico em água destilada. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*. 1992 Mar-Apr; 34 (2):159-165.
126. Alvarez C, Barbosa GG, Oliveira Rde V, Morales BP, Wanke B, Lazéra Mdos S. Techniques for the detection of pathogenic *Cryptococcus* species in wood decay substrat and the evaluation of viability in stored samples. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2013 Feb; 108(1):126-9.
127. Delgado AC, Taguchi H, Mikami Y, Myiajy M, Villares MC, Moretti ML. Human cryptococcosis: relationship of environmental and clinical strains of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* from urban and rural areas. *Mycopathologia*. 2005 Jan; 159(1):7-11.
128. Kulski JK, Pryce T. Preparation of mycobacterial DNA from blood culture fluids by simple alkali wash and heat lysis method for PCR detection. *J Clin Microbiol*. 1996 Aug; 34(8):1985-91.
129. Millar BC, Jiru X, Moore JE, Earle JA. A simple and sensitive method to extract bacterial, yeast and fungal DNA from blood culture material. *J Microbiol Methods*. 2000 Oct; 42(2):139-47.
130. Argenta JS, Santurio JM, Alves SH, Pereira DI, Cavalleiro AS, Spanamberg A, Ferreira L. In vitro activities of voriconazole, itraconazole, and terbinafine alone or in combination against *Pythium insidiosum* isolates from Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Feb; 52(2):767-9.
131. Conover WJ. *Practical Nonparametric Statistics*. 3^oed. John Wiley & Sons Inc. Nova Iorque. 1999.
132. Stokes ME, Davis CS, E Koch GG. *Categorical Data Analysis Using the SAS System*. SAS Institute Inc. Caty. NC. 1996.
133. Bassetti M, Repetto E, Mikulska M, Miglino M, Clavio M, Gobbi M, Righi E, Viscoli C. *Cryptococcus neoformans* fatal sepsis in a chronic lymphocytic leukemia patient treated with alemtuzumab: case report and review of the literature. *J Chemother*. 2009 Apr; 21(2):211-4.
134. Franzot SP, Mukherjee J, Cherniak R, Chen LC, Hamdan JS, Casadevall A. Microevolution of a standard strain of *Cryptococcus neoformans* resulting in differences in virulence and other phenotypes. *Infect Immun*. 1998 Jan; 66(1):89-97.
135. Espinel-Ingroff A, Montero D, Martin-Mazuelos E. Long-term preservation of fungal isolates in commercially prepared cryogenic microbank vials. *J Clin Microbiol*. 2004 Mar; 42(3):1257-9.

136. ATCC® MyCology CulTure guide tips and techniques for culturing yeasts and filamentous fungi© 2013 American Type Culture Collection.
137. Zhang M, Li J, Lin H, Zhang W, Lin M, Wu L, Liu W, Mu J, Ye J, Cui X. Diagnostic value of cytological and microbiological methods in cryptococcal meningitis. *Genet Mol Res.* 2014 Mar 26;13 (AOP).
138. Khan ZU, Al-Anezi AA, Chandy R, Xu J. Disseminated cryptococcosis in an AIDS patient caused by a canavanine-resistant strain of *Cryptococcus neoformans* var.*grubii*. *J Med Microbiol.* 2003 Mar; 52(Pt 3):271-5.
139. Klein K R, Hall L, Deml SM, Rysavy JM, Wohlfiel SL, Wengenack NL. Identification of *Cryptococcus gattii* by Use of l-Canavanine Glycine Bromothymol Blue Medium and DNA Sequencing. *J Clin Microbiol.* 2009 Nov; 47(11): 3669–3672.
140. Lindenberg Ade S, Chang MR, Paniago AM, Lazéra Mdos S, Moncada PM, Bonfim GF, Nogueira SA, Wanke B. Clinical and epidemiological features of 123 cases of cryptococcosis in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2008 Mar-Apr; 50(2):75-8.
141. Soltani M, Bayat M, Hashemi SJ, Zia M, Pestechian N. Isolation of *Cryptococcus neoformans* and other opportunistic fungi from pigeon droppings. *J Res Med Sci.* 2013 Jan; 18(1):56-60.
142. Tangwattanachuleeporn M, Somparn P, Poolpol K, Gross U, Weig M, Bader O. Prevalence and antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* isolated from pigeon excreta in Chon Buri Province, Eastern Thailand. *Med Mycol J.* 2013; 54(3):303-7.
143. Kano R, Ishida R, Nakane S, Sekiguchi M, Hasegawa A, Kamata H. The first reported case of canine subcutaneous *Cryptococcus flavescens* infection. *Mycopathologia.* 2012 Mar; 173(2-3):179-82.
144. Alshahni MM, Makimura K, Satoh K, Nishiyama Y, Kido N, Sawada T. *Cryptococcus yokohamensis* sp. nov., a basidiomycetous yeast isolated from trees and a Queensland koala kept in a Japanese zoological park. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2011 Dec; 61(Pt 12):3068-71.
145. Teodoro VL, Gullo FP, Sardi Jde C, Torres EM, Fusco-Almeida AM, Mendes-Giannini MJ. Environmental isolation, biochemical identification, and antifungal drug susceptibility of *Cryptococcus* species. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2013 Nov-Dec; 46(6):759-64.
146. Canónico-González Y, Adame-Rodríguez JM, Mercado-Hernández R, Aréchiga-Carvajal ET. *Cryptococcus* spp. isolation from excreta of pigeons (*Columba livia*) in and around Monterrey, Mexico. *Springerplus.* 2013 Nov 23;2:632.
147. Pedroso RS, Ferreira JC, Candido RC. The isolation and characterization of virulence factors of *Cryptococcus* spp. from saprophytic sources in the city of Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. *Microbiol Res.* 2009; 164(2):221-7.

148. Lugarini C, Goebel CS, Condas LA, Muro MD, de Farias MR, Ferreira FM, Vainstein MH. *Cryptococcus neoformans* Isolated from Passerine and Psittacine bird excreta in the state of Paraná, Brazil. *Mycopathologia*. 2008 Aug; 166(2):61-9.
149. Rosario I, Acosta B, Colom MF. [Pigeons and other birds as a reservoir for *Cryptococcus* spp]. *Rev Iberoam Micol*. 2008 Mar; 25(1):S13-8.
150. Anzai MC, Lazéra MD, Wanke B, Trilles L, Dutra V, de Paula DA, Nakazato L, Takahara DT, Simi WB, Hahn RC. *Cryptococcus gattii* VGII in a *Plathymenia reticulata* hollow in Cuiabá, Mato Grosso, Brazil. *Mycoses*. 2014 Jul;57(7):414-8.
151. Mazza M, Refojo N, Bosco-Borgeat ME, Taverna CG, Trovero AC, Rogé A, Davel G. *Cryptococcus gattii* in urban trees from cities in North-eastern Argentina. *Mycoses*. 2013 Nov; 56(6):646-50.
152. Kano R, Kitagawat M, Oota S, Oosumi T, Murakami Y, Tokuriki M, Hasegawa A. First case of feline systemic *Cryptococcus albidus* infection. *Med Mycol*. 2008 Feb; 46(1):75-7.
153. Kobayashi CC, Souza LK, Fernandes Ode F, Brito SC, Silva AC, Sousa ED, Silva Mdo R. Characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated from urban environmental sources in Goiânia, Goiás State, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2005 Jul-Aug; 47(4):203-7.
154. Matsumoto MT, Fusco-Almeida AM, Baeza LC, Melhem Mde S, Medes-Giannini MJ. Genotyping, serotyping and determination of mating-type of *Cryptococcus neoformans* clinical isolates from São Paulo State, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2007 Jan-Feb; 49(1):41-7.
155. Matos CS, de Souza Andrade A, Oliveira NS, Barros TF. Microbiological characteristics of clinical isolates of *Cryptococcus* spp. in Bahia, Brazil: molecular types and antifungal susceptibilities. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012 Jul; 31(7):1647-52.
156. Martins LM, Wanke B, Lazéra Mdos S, Trilles L, Barbosa GG, Macedo RC, Cavalcanti Mdo A, Eulálio KD, Castro JA, Silva AS, Nascimento FF, Gouveia VA, Monte SJ. Genotypes of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* as agents of endemic cryptococcosis in Teresina, Piauí (northeastern Brazil). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011 Sep; 106(6):725-30.
157. Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, Rice C, Tendolkar S, Hollis RJ, Doern GV, Diekema DJ. Global trends in the antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* (1990 to 2004). *J Clin Microbiol*. 2005 May; 43(5):2163-7.
158. Almeida AM, Matsumoto MT, Baeza LC, de Oliveira E Silva RB, Kleiner AA, Melhem Mde S, Mendes Giannini MJ; Laboratory Group on Cryptococcosis. Molecular typing and antifungal susceptibility of clinical sequential isolates of *Cryptococcus neoformans* from São Paulo State, Brazil. *FEMS Yeast Res*. 2007 Jan; 7(1):152-64.
159. Souza LK, Fernandes Ode F, Kobayashi CC, Passos XS, Costa CR, Lemos JA, Souza-Júnior AH, Silva Mdo R. Antifungal susceptibilities of clinical and environmental isolates

of *Cryptococcus neoformans* in Goiânia city, Goiás, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2005 Sep-Oct; 47(5):253-6.

160-Illnait-Zaragozi MT, Martínez GF, Curfs-Breuker I, Fernández CM, Boekhout T, Meis JF. In Vitro activity of the new azole isavuconazole (BAL4815) compared with six other antifungal agents against 162 *Cryptococcus neoformans* isolates from Cuba. Antimicrob Agents Chemother. 2008 Apr; 52(4):1580-2.

161- Mlinaric-Missoni E, Hagen F, Chew WH, Vazic-Babic V, Boekhout T, Begovac J. In vitro antifungal susceptibilities and molecular typing of sequentially isolated clinical *Cryptococcus neoformans* strains from Croatia. J Med Microbiol. 2011 Oct; 60(Pt 10):1487-95.

162. Chowdhary A, Randhawa HS, Sundar G, Kathuria S, Prakash A, Khan Z, Sun S, Xu J. In vitro antifungal susceptibility profiles and genotypes of 308 clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii* serotype B from north-western India. J Med Microbiol. 2011 Jul; 60(Pt7):961-7.

163. Silva DC, Martins MA, Szeszs MW, Bonfietti LX, Matos D, Melhem MS. Susceptibility to antifungal agents and genotypes of Brazilian clinical and environmental *Cryptococcus gattii* strains. Diagn Microbiol Infect Dis. 2012 Apr; 72(4):332-9.

164. Andrade-Silva L, Ferreira-Paim K, Mora DJ, Da Silva PR, Andrade AA, Araujo NE, Pedrosa AL, Silva-Vergara ML. Susceptibility profile of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. Med Mycol. 2013 Aug; 51(6):635-40.

165. Trilles L, Meyer W, Wanke B, Guarro J, Lazéra M. Correlation of antifungal susceptibility and molecular type within the *Cryptococcus neoformans*/*C. gattii* species complex. Med Mycol. 2012 Apr; 50(3):328-32.

166. Guinea J, Hagen F, Peláez T, Boekhout T, Tahoune H, Torres-Narbona M, Bouza E. Antifungal susceptibility, serotyping, and genotyping of clinical *Cryptococcus neoformans* isolates collected during 18 years in a single institution in Madrid, Spain. Med Mycol. 2010 Nov; 48(7):942-8.

167. Cheong JW, McCormack J. Fluconazole resistance in cryptococcal disease: emerging or intrinsic? Med Mycol. 2013 Apr; 51(3):261-9.

168. Khan ZU, Randhawa HS, Kowshik T, Chowdhary A, Chandy R. Antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates from decayed wood of trunk hollows of *Ficus religiosa* and *Syzygium cumini* trees in north-western India. J Antimicrob Chemother. 2007 Aug; 60(2):312-6.

169. Trilles L, Fernández-Torres B, Lazéra Mdos S, Wanke B, Guarro J. In vitro antifungal susceptibility of *Cryptococcus gattii*. J Clin Microbiol. 2004 Oct; 42(10):4815-7.

170. Chong HS, Dagg R, Malik R, Chen S, Carter D. In vitro susceptibility of the yeast pathogen *Cryptococcus* to fluconazole and other azoles varies with molecular genotype. J Clin Microbiol. 2010 Nov; 48(11):4115-20.

171. Bernal-Martinez L, Gomez-Lopez A, Castelli MV, Mesa-Arango AC, Zaragoza O, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Susceptibility profile of clinical isolates of *non-Cryptococcus neoformans/non-Cryptococcus gattii* *Cryptococcus* species and literature review. *Med Mycol*. 2010 Feb; 48(1):90-6.
172. Pedroso RS, Ferreira JC, Candido RC. In vitro susceptibility to antifungal agents of environmental *Cryptococcus* spp. isolated in the city of Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006 May; 101(3):239-43.
173. Serena C, Pastor FJ, Ortoneda M, Capilla J, Nolard N, Guarro J. In vitro antifungal susceptibilities of uncommon basidiomycetous yeasts. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Jul; 48(7):2724-6.
174. García-Martos P, Noval JF, García-Tapia A, Marín P, Puerto JL, Sepúlveda A. Susceptibility to antifungal agents of *Cryptococcus* species of clinical interest. *Med Clin (Barc)*. 2002 Jul; 119(6):211-3.
175. Furman-Kuklińska K, Naumnik B, Myśliwiec M. Fungaemia due to *Cryptococcus laurentii* as a complication of immunosuppressive therapy-a case report. *Adv Med Sci*. 2009; 54(1):116-9.
176. Ragupathi L, Reyna M. Case report of *Cryptococcus albidus* peritonitis in a peritoneal dialysis patient and a review of the literature. *Perit Dial Int*. 2014 Mar 1.
177. Gómez-López A, Cuenca-Estrella M, Mellado E, Rodríguez-Tudela JL. In vitro evaluation of combination of terbinafine with itraconazole or amphotericin B against Zygomycota. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2003 Mar; 45(3):199-202.
178. Yu J, Li R, Zhang M, Liu L, Wan Z. In vitro interaction of terbinafine with itraconazole and amphotericin B against fungi causing chromoblastomycosis in China. *Med Mycol*. 2008 Nov; 46(7):745-7.
179. Meletiadis J, Mouton JW, Meis JF, Verweij PE. In vitro drug interaction modeling of combinations of azoles with terbinafine against clinical *Scedosporium prolificans* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003 Jan; 47(1):106-17.
180. Ryder NS, Leitner I. Synergistic interaction of terbinafine with triazoles or amphotericin B against *Aspergillus* species. *Med Mycol*. 2001 Feb; 39(1):91-5.
181. Zhang S, Li R, Yu J. Drug combinations against *Mucor irregularis* in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Jul; 57(7):3395-7.
182. Cantón E, Pemán J, Gobernado M, Viudes A, Espinel-Ingroff A. Synergistic Activities of Fluconazole and Voriconazole with Terbinafine against Four *Candida* Species Determined by Checkerboard, Time-Kill, and Etest Methods. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Apr; 49(4): 1593–1596.
183. Weig M, Müller FM. Synergism of voriconazole and terbinafine against *Candida albicans* isolates from human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001 Mar; 45(3):966-8.

184. Perea S, Gonzalez G, Fothergill AW, Sutton DA, Rinaldi MG. In vitro activities of terbinafine in combination with fluconazole, itraconazole, voriconazole, and posaconazole against clinical isolates of *Candida glabrata* with decreased susceptibility to azoles. J Clin Microbiol. 2002 May; 40(5):1831-3.
185. Biancalana FS, Lyra L, Moretti ML, Schreiber AZ. Susceptibility testing of terbinafine alone and in combination with amphotericin B, itraconazole, or voriconazole against conidia and hyphae of dematiaceous molds. Diagn Microbiol Infect Dis. 2011 Dec; 71(4):378-85.
186. Ryder NS, Wagner S, Leitner I. In vitro activities of terbinafine against cutaneous isolates of *Candida albicans* and other pathogenic yeasts. Antimicrob Agents Chemother. 1998 May; 42(5):1057-61.
187. Ghannoum MA, Elewski B. Successful Treatment of Fluconazole-Resistant Oropharyngeal Candidiasis by a Combination of Fluconazole and Terbinafine. Clin Diagn Lab Immunol. 1999 Nov; 6(6): 921–923.
188. Rothe A, Seibold M, Hoppe T, Seifert H, Engert A, Caspar C. Combination therapy of disseminated *Fusarium oxysporum* infection with terbinafine and amphotericin B. Ann Hematol. 2004 Jun; 83(6):394-7.
189. Dromer F, Bernede-Bauduin C, Guillemot D, Lortholary O; French Cryptococcosis Study Group. Major role for amphotericin B-flucytosine combination in severe cryptococcosis. PLoS One. 2008 Aug; 3(8):e2870.
190. Day JN, Chau TT, Wolbers M, Mai PP, Dung NT, Mai NH, Phu NH, Nghia HD, Phong ND, Thai CQ, Thai le H, Chuong LV, Sinh DX, Duong VA, Hoang TN, Diep PT, Campbell JI, Sieu TP, Baker SG, Chau NV, Hien TT, Lalloo DG, Farrar JJ. Combination antifungal therapy for cryptococcal meningitis. N Engl J Med. 2013 Apr; 368(14):1291-302.
191. Yao ZW, Lu X, Shen C, Lin DF. Comparison of flucytosine and fluconazole combined with amphotericin B for the treatment of HIV-associated cryptococcal meningitis: a systematic review and meta-analysis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2014 Aug; 33(8):1339-44.
192. Machard B, Misslin P, Lemaire M. Influence of plasma protein binding on the brain uptake of an antifungal agent, terbinafine, in rats. J Pharm Pharmacol. 1989 Oct; 41(10):700-4.
193. Sorensen KN, Sobel RA, Clemons KV, Calderon L, Howell KJ, Irani PR, Pappagianis D, Williams PL, Stevens DA. Comparative efficacies of terbinafine and fluconazole in treatment of experimental coccidioidal meningitis in a rabbit model. Antimicrob Agents Chemother. 2000 Nov; 44(11):3087-91.

8. Apêndices

Apêndice 1: Isolados clínicos selecionados para o estudo provenientes de pacientes com criptococose atendidos no Hospital de Clínicas da UNICAMP no período de janeiro de 2007 a dezembro de 2011, com identificação molecular para os que foram reativados

Paciente	Nº LIF	HC	Data	Iniciais paciente	Material clínico	Dados clínicos	Identificação	
							Clássica	Molecular
1	499	8387745	03/05/10	ABB	LCR	Meningite	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>
2	389	9932056	04/12/07	ABD	SANGUE	Febre	<i>C. neoformans</i>	não reativado
	392	9932056	13/12/08	ABD	LCR	NI	<i>C. neoformans</i>	não reativado
3	457	10306567	24/01/10	ABS	SANGUE	Criptococose	<i>C. neoformans</i>	não reativado
4	439	7295452	01/07/09	ACAS	LCR	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>
5	363	9797034	28/09/07	ACPA	LCR	Cefaléia	<i>C. neoformans</i>	não reativado
	366	9797034	04/10/07	ACPA	MO	NI	<i>C. neoformans</i>	não reativado
	382	9797034	08/10/07	ACPA	SANGUE	Febre	<i>C. neoformans</i>	não reativado
6	319	535725-6	11/01/07	ACS	SANGUE	Febre	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>
	324	535725-6	08/01/07	ACS	URINA	Febre	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>
	325	535725-6	08/01/07	ACS	LCR	Febre	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>
7	330	70405604	04/04/07	ACS	LCR	NI	<i>C. neoformans</i>	não reativado
8	408	10049080	19/05/08	ADVG	LCR	Cripto pulmonar	<i>C. gatti</i>	<i>C. gattii</i>
9	461	9481841	14/07/10	AFR	SANGUE	Febre	<i>C. neoformans</i>	não reativado
10	398	80185854	19/02/08	AIM	LCR	Neurocriptococose	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>
11	413	2787070	16/07/08	AM	ESCARRO	TX renal	<i>C. neoformans</i>	não reativado
12	346	5122663	01/05/07	AO	LCR	NI	<i>C. neoformans</i>	não reativado
13	420	8816168	12/10/08	APB	LAB	Recuperação anestesia	<i>C. neoformans</i>	não reativado
14	518	8736487	05/10/10	APC	SANGUE	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>
15	525	11166794	30/11/11	ARG	PELE	Úlcera de mão	<i>C. gatti</i>	<i>C. gattii</i>
16	514	10797766	21/08/10	AS	LCR	Neurocriptococose	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>
17	321	583306-2	01/01/07	ASO	LCR	Meningite	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>
18	432	10371732	13/04/09	AU	LAB	Massa HTX	<i>C. gatti</i>	<i>C. gattii</i>
19	527	8551085	21/01/11	CADF	LCR	Meningite	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>
20	517	8449842	31/08/10	CC	SANGUE	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>
21	442	5494163	10/09/09	CLSA	LCR	Neurocriptococose	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>
22	349	5154252	25/05/07	CMZ	LCR	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>
23	409	9934676	13/05/08	CRS	LCR	Neurocriptococose	<i>C. neoformans</i>	não reativado
24	433	10380991	28/04/09	DAS	LAB	NI	<i>Cryptococcus sp</i>	não reativado
25	328	946447-7	05/02/07	DCS	LCR	Confusão mental	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>
26	426	10260713	30/12/08	DJ	LCR	Febre	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>
	428	10260713	06/01/09	DJ	BX PRÓSTATA	Criptococose	<i>C. neoformans</i>	não reativado
27	548	11157705	12/11/11	DLS	LCR	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>
	552	11157705	08/11/11	DLS	SANGUE	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>
28	526	10799855	07/01/11	DTF	LAB	Tuberculose	<i>C. neoformans</i>	<i>C. gattii</i>
29	492	100335870	12/03/10	ECG	LCR	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>
30	544	11178759	08/12/11	EFOJr	LCR	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>
	551	11178759	19/12/11	EFOJr	LAB	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>
	564	11178759	06/12/11	EFOJr	SANGUE	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>
31	352	7092844	02/06/07	EFS	LCR	Neurocriptococose	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>
32	529	8700012	19/09/11	EPS	LCR	Meningite	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>
33	495	7663479	13/03/10	FCN	LCR		<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>
	521	7663479	13/04/10	FCN	SANGUE	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>
34	362	9797802	13/08/07	FFA	LAB	Tuberculose	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>
35	451	8313988	23/11/09	FR	LPL	CAPD	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>
	475	8313988	23/11/10	FR	LPL	CAPD	<i>C. neoformans</i>	não reativado
36	474	10554475	23/11/10	IRS	SANGUE	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>
37	534	11094927	25/11/11	JAT	LCR	Meningite	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>
	550	11094927	21/12/11	JAT	SET	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>
	557	11094927	27/11/11	JAT	SANGUE	Meningite	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>
38	502	10024666	21/05/10	JBS	LCR	Meningite	<i>C. gatti</i>	<i>C. gattii</i>
	504	10024666	06/06/10	JBS	MASSA MEDIASTINO	Massa mediastinal	<i>C. gatti</i>	<i>C. gattii</i>
39	429	9157701	16/01/09	JFC	LCR	Meningite	<i>C. neoformans</i>	não reativado
	454	9157701	16/01/09	JFC	SANGUE	TX renal	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>

BX: biópsia; CAPD: diálise peritoneal; CH: cirrose hepática; LAB: lavado brônquico; LAS: líquido ascítico; LCR: líquor; LES: lúpus eritematoso sistêmico; LPL: líquido peritoneal; NI: não informado; SIDA: síndrome da imunodeficiência adquirida; SNC: sistema nervoso central; TX: transplante

Paciente	Nº LIF	HC	Data	Iniciais paciente	Material clínico	Dados clínicos	Identificação	
							Clássica	Molecular
40	445	10510053	16/10/09	JFMF	LAS	CH	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>
	450	10510053	06/11/09	JFMF	LPL	Disúria	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>
	468	10510053	16/10/10	JFMF	SANGUE	NI	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>
41	411	100477769	05/06/08	JG	LCR	NI	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>
42	536	5409883	01/12/11	JL	LCR	SIDA	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>
	538	5409883	02/12/11	JL	ESCARRO	SIDA	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>
	556	5409883	23/11/11	JL	SANGUE	SIDA	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>
43	452	9137743	27/11/09	JLC	LCR	Cefaléia	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>
	476	9137743	28/11/10	JLC	SANGUE	Febre	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>
44	378	9065203	28/07/07	JLS	SANGUE	Bacteremia	<i>C.neoformans</i>	não reativado
45	522	10890972	03/01/11	JLS	PELE	Cisticercose	<i>C.gatti</i>	<i>C.gattii</i>
	524	10890972	10/01/11	JLS	LCR	Cisticercose	<i>C.gatti</i>	<i>C.gattii</i>
46	447	2683800	16/10/09	JNT	LCR	Baixo nível SNC	<i>C.neoformans</i>	não reativado
47	343	9752018	21/04/07	JOA	LCR	Neurocriptococose	<i>C.neoformans</i>	não reativado
48	357	70715924	12/06/07	JRP	LCR	Meningite	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>
49	467	10494297	29/08/10	JVBS	SANGUE	Controle	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>
50	478	91749576	28/12/10	LAGT	SANGUE	Pneumonia	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>
	480	91749576	29/12/10	LAGT	LCR	Meningite	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>
	488	91749576	01/01/10	LAGT	ESCARRO	SIDA	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>
51	434	10398314	12/05/09	LFC	LAB	Tuberculose	<i>Cryptococcus sp</i>	não reativado
	437	10398314	17/06/09	LFC	LCR	Neurocriptococose	<i>Cryptococcus sp</i>	não reativado
52	528	8695580	16/06/11	LFF	LCR	SIDA	<i>C.neoformans</i>	não reativado
53	393	71444601	06/12/08	LJA	SANGUE	SIDA	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>
54	436	9679284	11/06/09	LM	ESCARRO	Pneumonia	<i>Cryptococcus sp</i>	não reativado
55	506	9870980	17/06/10	LOR	LAB	Nódulo	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>
56	418	9987647	22/10/08	LST	LCR	NI	<i>C.neoformans</i>	<i>C.gattii</i>
57	374	7295434	18/11/07	MAA	LCR	NI	<i>C.neoformans</i>	não reativado
58	412	9839232	27/06/08	MAOM	LCR	Hidrocefalia	<i>C.neoformans</i>	não reativado
59	431	10344301	10/03/09	MDR	ESCARRO	SIDA	<i>C.neoformans</i>	não reativado
60	458	90294366	07/03/10	MDR	SANGUE	IR	<i>C.neoformans</i>	não reativado
61	487	10600731	27/10/10	MFG	SANGUE	Febre	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>
62	376	4349284	28/11/07	MFMC	LCR	Baixo nível SNC	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>
	383	4349284	26/11/07	MFMC	SANGUE	Sepse	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>
	406	4349284	03/12/08	MFMC	RASP. UNHA	NI	<i>C.neoformans</i>	não reativado
63	407	7563758	10/12/08	MFSS	LCR		<i>C.gatti</i>	não reativado
64	361	637574	09/08/07	MLF	LCR	Neurocriptococose	<i>C.neoformans</i>	não reativado
	377	637574	23/07/07	MLF	SANGUE	NI	<i>C.neoformans</i>	não reativado
65	448	10542575	22/10/09	MR	LCR	Neurocriptococose	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>
66	535	8291934	28/11/11	MR	LCR	Meningite	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>
	560	8291934	29/11/11	MR	SANGUE	Rim transplantado	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>
67	347	9750252	09/05/07	OES	LCR	NI	<i>C.neoformans</i>	não reativado
	355	9750252	19/04/07	OES	LAB	Massa pulmonar	<i>C.neoformans</i>	não reativado
68	423	4134118	30/11/08	PC	LCR	Meningite	<i>C.neoformans</i>	não reativado
69	360	9147481	19/07/07	PPVP	LPL	NI	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>
70	490	10600289	12/01/10	RLS	LPL	Derrame pleural	<i>C.albidus</i>	não reativado
71	440	91139850	02/09/09	RNA	LCR	Neurocriptococose	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>
	463	91139850	22/08/10	RNA	SANGUE	Febre	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>
72	390	3951705	08/12/08	RRS	LCR	Meningite	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>
	394	3951705	09/12/08	RRS	SANGUE	Sepse	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>
73	402	9945588	14/03/08	RSA	SANGUE	LES	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>
74	505	10682038	09/07/10	SS	SANGUE	SIDA	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>
	507	10682038	05/07/10	SS	LCR		<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>
75	435	8656506	14/05/09	VCL	LAB	Pneumonia	<i>Cryptococcus sp</i>	<i>C.neoformans</i>
76	417	10231683	11/10/08	VLM	LCR	Baixo nível SNC	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>
	421	10231683	11/10/08	VLM	SANGUE	Febre	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>
77	470	10563892	14/11/10	WAM	SANGUE	SIDA	<i>C.neoformans</i>	<i>C.neoformans</i>

BX: biópsia; CAPD: diálise peritoneal; CH: cirrose hepática; LAB: lavado brônquico; LAS: líquido ascítico; LCR: líquido; LES: lúpus eritematoso sistêmico; LPL: líquido peritoneal; NI: não informado; SIDA: síndrome da imunodeficiência adquirida; SNC: sistema nervoso central; TX: transplante

Apêndice 2: Identificação dos isolados ambientais coletados na cidade de Campinas

Amostra Local	Data	Melanina	Ureia	CGB	RFLP	VITEK	Prob	ID	Sequenciamento ITS	Identidade	Nº acesso	
HC1	HC	17/08/2012	POS Fraco	POS	POS	NA	<i>C.laurentii</i>	95%	muito boa	NR	NA	NA
HC2	HC	17/08/2012	POS Fraco	POS	POS	NA	<i>C.laurentii</i>	98%	excelente	NR	NA	NA
HC3	HC	17/08/2012	POS Fraco	POS	POS	NA	<i>C.laurentii</i>	98%	excelente	NR	NA	NA
HC4	HC	17/08/2012	POS Fraco	POS	POS	NA	<i>C.laurentii</i>	96%	excelente	NR	NA	NA
HC5	HC	17/08/2012	POS Fraco	POS	POS	NA	<i>C.laurentii</i>	95%	muito boa	NR	NA	NA
M1	M	31/08/2012	POS Fraco	POS	POS	NA	<i>C.laurentii</i>	96%	excelente	NR	NA	NA
M2	M	31/08/2012	POS Fraco	POS	POS	NA	<i>C.laurentii</i>	94%	muito boa	NR	NA	NA
M3	M	31/08/2012	POS Fraco	POS	POS	NA	<i>C.laurentii</i>	98%	excelente	NR	NA	NA
M4	M	31/08/2012	POS Fraco	POS	POS	NA	<i>C.laurentii</i>	94%	excelente	NR	NA	NA
M5	M	31/08/2012	POS Fraco	POS	POS	NA	<i>C.laurentii</i>	96%	excelente	NR	NA	NA
CnHC1	HC	19/09/2012	POS	POS	NEG	VNI	<i>C.neoformans</i>	91%	boa	NR	NA	NA
CnHC2	HC	19/09/2012	POS	POS	NEG	VNI	<i>C.neoformans</i>	91%	boa	NR	NA	NA
CnC3	HC	19/09/2012	POS	POS	NEG	VNI	NR	NR	NR	NR	NA	NA
CnHC4	HC	19/09/2012	POS	POS	NEG	VNI	NR	NR	NR	NR	NA	NA
CnHC6	HC	19/09/2012	POS	POS	NEG	VNI	NR	NR	NR	NR	NA	NA
CnHC7	HC	19/09/2012	POS	POS	NEG	VNI	NR	NR	NR	NR	NA	NA
CnHC8	HC	19/09/2012	POS	POS	NEG	VNI	NR	NR	NR	NR	NA	NA
CnHC9	HC	19/09/2012	POS	POS	NEG	VNI	NR	NR	NR	NR	NA	NA
CnHC10	HC	19/09/2012	POS	POS	NEG	VNI	NR	NR	NR	NR	NA	NA
CnHC11	HC	19/09/2012	POS	POS	NEG	VNI	NR	NR	NR	NR	NA	NA
HC7	HC	19/09/2012	POS Fraco	POS	POS	NA	<i>C.laurentii</i>	98%	excelente	NR	NA	NA
HC8	HC	19/09/2012	POS Fraco	POS	POS	NA	<i>C.laurentii</i>	96%	excelente	NR	NA	NA
HC9	HC	19/09/2012	POS Fraco	POS	POS	NA	<i>C.laurentii</i>	96%	excelente	NR	NA	NA
LR1	LR	03/10/2012	POS Fraco	POS	NEG	NA	<i>C.albidus</i>	94%	muito boa	NR	NA	NA
LR2	LR	03/10/2012	POS Fraco	POS	NEG	NA	<i>C.albidus</i>	95%	muito boa	NR	NA	NA
LR3	LR	03/10/2012	POS Fraco	POS	NEG	NA	<i>C.albidus</i>	97%	excelente	NR	NA	NA
LR4	LR	03/10/2012	POS Fraco	POS	POS	NA	<i>C.laurentii</i>	95%	muito boa	NR	NA	NA
LR5	LR	03/10/2012	POS Fraco	POS	POS	NA	<i>C.laurentii</i>	98%	excelente	NR	NA	NA
LR6	LR	03/10/2012	POS Fraco	POS	POS	NA	<i>C.laurentii</i>	95%	muito boa	NR	NA	NA
LR7	LR	03/10/2012	POS Fraco	POS	POS	NA	<i>C.laurentii</i>	95%	muito boa	NR	NA	NA
LR8	LR	03/10/2012	POS Fraco	POS	POS	NA	<i>C.laurentii</i>	96%	excelente	NR	NA	NA
LR9	LR	03/10/2012	POS Fraco	POS	POS	NA	<i>C.laurentii</i>	98%	excelente	NR	NA	NA
LR10	LR	03/10/2012	POS Fraco	POS	POS	NA	<i>C.laurentii</i>	98%	excelente	NR	NA	NA
LR11	LR	03/10/2012	POS Fraco	POS	POS	NA	<i>C.neoformans</i> ^a	91%	boa	<i>C.laurentii</i>	100%	HM469461.1
LR14	LR	03/10/2012	POS Fraco	POS	POS	NA	<i>C.laurentii</i>	98%	excelente	NR	NA	NA
T1	T	27/08/2013	POS Fraco	POS	NEG	NA	NI	NI	NI	<i>C. flavescens</i>	100%	KF850393.1
T2	T	27/08/2013	POS Fraco	POS	NEG	NA	NI	NI	NI	<i>Cryptococcus</i> spp.	94%	AY518273.1
T3	T	27/08/2013	POS Fraco	POS	NEG	NA	NI	NI	NI	<i>Cryptococcus</i> spp. ^b	98%	HM222928.1
T5	T	27/08/2013	POS Fraco	POS	NEG	NA	NI	NI	NI	<i>Cryptococcus</i> spp. ^b	98%	HM222928.1
T7	T	27/08/2013	POS Fraco	POS	NEG	NA	NI	NI	NI	<i>Cryptococcus</i> spp.	96%	AY518273.1
T9	T	27/08/2013	POS Fraco	POS	NEG	NA	NI	NI	NI	<i>Cryptococcus</i> spp.	91%	AY518273.1
T10	T	27/08/2013	POS Fraco	POS	NEG	NA	NI	NI	NI	<i>Cryptococcus</i> spp.	93%	AY518273.1
T11	T	27/08/2013	POS Fraco	POS	POS	NA	NI	NI	NI	<i>C. flavescens</i>	100%	KF850393.1
T12	T	27/08/2013	POS Fraco	POS	NEG	NA	NI	NI	NI	<i>Cryptococcus</i> spp.	94%	AY518273.1
T13	T	27/08/2013	POS Fraco	POS	NEG	NA	NI	NI	NI	<i>Cryptococcus</i> spp.	95%	AY518273.1
T14	T	27/08/2013	POS Fraco	POS	NEG	NA	NI	NI	NI	<i>Cryptococcus</i> spp.	93%	AY518273.1
T15	T	27/08/2013	POS Fraco	POS	NEG	NA	NI	NI	NI	<i>Cryptococcus</i> spp.	100%	AY518273.1
T16	T	27/08/2013	POS Fraco	POS	NEG	NA	NI	NI	NI	<i>Cryptococcus</i> spp.	94%	AY518273.1
T17	T	27/08/2013	POS Fraco	POS	NEG	NA	NI	NI	NI	<i>Cryptococcus</i> spp.	94%	AY518273.1
BC1	BC	30/08/2013	POS Fraco	POS	NEG	NA	<i>C.albidus</i>	93%	muito boa	NR	NA	NA
BC2	BC	30/08/2013	POS Fraco	POS	NEG	NA	<i>C.albidus</i>	94%	muito boa	NR	NA	NA
BC6	BC	30/08/2013	POS Fraco	POS	NEG	NA	<i>C.albidus</i>	95%	muito boa	NR	NA	NA
BC7	BC	30/08/2013	POS Fraco	POS	NEG	NA	<i>C.albidus</i>	97%	excelente	NR	NA	NA
BC8	BC	30/08/2013	POS Fraco	POS	NEG	NA	<i>C.albidus</i>	97%	excelente	NR	NA	NA
BC13	BC	30/08/2013	POS Fraco	POS	NEG	NA	<i>C.albidus</i>	88%	aceitável	NR	NA	NA
BC15	BC	16/09/2013	POS Fraco	POS	NEG	NA	<i>C.albidus</i>	94%	muito boa	NR	NA	NA
BC16	BC	16/09/2013	POS Fraco	POS	NEG	NA	<i>C.albidus</i>	92%	boa	NR	NA	NA
BC17	BC	16/09/2013	POS Fraco	POS	NEG	NA	<i>C.albidus</i>	89%	boa	NR	NA	NA

(a): isolado identificado pelo VITEK que foi sequenciado; CGB: canavanina-glicina-azul de bromotímolo; NA: teste não se aplica; NI: não identificado; NR: não realizado (b) isolados com 98% de identidade com *C.yokohamensis*; T: Parque Taquaral; HC: Hospital de Clínicas UNICAMP; M: Mercado Municipal; LR: Largo do Rosário; TCM: Teatro Castro Mendes; CM: Igreja Na Sra Do Carmo; BC: Biblioteca Central UNICAMP; CC: Centro de Convivências; POS: teste positivo; NEG: teste negativo; Prob: probabilidade

Amostra	Local	Data	Melanina	Ureia	CGB	RFLP	VITEK	Prob	ID	Sequenciamento ITS	Identidade	Nº acesso
BC18	BC	16/09/2013	POS Fraco	POS	NEG	NA	<i>C.albidus</i>	95%	muito boa	NR	NA	NA
BC19	BC	16/09/2013	POS Fraco	POS	NEG	NA	<i>C.albidus</i>	93%	muito boa	NR	NA	NA
BC20	BC	16/09/2013	POS Fraco	POS	NEG	NA	<i>C.albidus</i>	95%	muito boa	NR	NA	NA
BC21	BC	16/09/2013	POS Fraco	POS	NEG	NA	<i>C.albidus</i>	91%	boa	NR	NA	NA
BC22	BC	16/09/2013	POS Fraco	POS	NEG	NA	<i>C.albidus</i>	94%	muito boa	NR	NA	NA
BC23	BC	16/09/2013	POS Fraco	POS	NEG	NA	<i>C.albidus</i>	90%	boa	NR	NA	NA
BC24	BC	16/09/2013	POS Fraco	POS	NEG	NA	<i>C.albidus</i>	91%	boa	NR	NA	NA
CC10	CC	10/10/2013	POS Fraco	POS	NEG	NA	<i>C.albidus</i>	95%	muito boa	NR	NA	NA
CM2	CM	10/10/2013	POS Fraco	POS	POS	NA	<i>C.laurentii</i>	98%	excelente	NR	NA	NA
CM3	CM	10/10/2013	POS Fraco	POS	POS	NA	<i>C.laurentii</i>	97%	excelente	NR	NA	NA
CM5	CM	10/10/2013	POS Fraco	POS	POS	NA	<i>C.laurentii</i>	97%	excelente	NR	NA	NA
TCM1	TCM	10/10/2013	POS Fraco	POS	NEG	NA	<i>C.albidus</i>	94%	muito boa	NR	NA	NA
TCM2	TCM	10/10/2013	POS Fraco	POS	NEG	NA	<i>C.albidus</i>	90%	boa	NR	NA	NA
TCM3	TCM	10/10/2013	POS Fraco	POS	NEG	NA	<i>C.albidus</i>	94%	muito boa	NR	NA	NA
TCM4	TCM	21/11/2013	POS Fraco	POS	POS	NA	<i>C.laurentii</i>	95%	muito boa	NR	NA	NA
TCM5	TCM	21/11/2013	POS Fraco	POS	POS	NA	<i>C.laurentii</i>	95%	muito boa	NR	NA	NA
TCM6	TCM	21/11/2013	POS Fraco	POS	POS	NA	<i>C.laurentii</i>	97%	excelente	NR	NA	NA
TCM7	TCM	21/11/2013	POS Fraco	POS	POS	NA	<i>C.laurentii</i>	97%	excelente	NR	NA	NA
TCM8	TCM	21/11/2013	POS Fraco	POS	POS	NA	<i>C.laurentii</i>	97%	excelente	NR	NA	NA
TCM9	TCM	21/11/2013	POS Fraco	POS	POS	NA	<i>C.laurentii</i>	95%	muito boa	NR	NA	NA
TCM10	TCM	21/11/2013	POS Fraco	POS	POS	NA	<i>C.laurentii</i>	97%	excelente	NR	NA	NA
TCM11	TCM	21/11/2013	POS Fraco	POS	POS	NA	<i>C.laurentii</i>	98%	excelente	NR	NA	NA
TCM12	TCM	21/11/2013	POS Fraco	POS	NEG	NA	<i>C.albidus</i>	95%	muito boa	NR	NA	NA
TCM13	TCM	21/11/2013	POS Fraco	POS	POS	NA	<i>C.laurentii</i>	96%	excelente	NR	NA	NA
TCM14	TCM	21/11/2013	POS Fraco	POS	POS	NA	<i>C.laurentii</i>	96%	excelente	NR	NA	NA
TCM15	TCM	21/11/2013	POS Fraco	POS	NEG	NA	<i>C.albidus</i>	95%	muito boa	NR	NA	NA
TCM17	TCM	21/11/2013	POS Fraco	POS	NEG	NA	<i>C.albidus</i>	90%	boa	NR	NA	NA
TCM18	TCM	21/11/2013	POS Fraco	POS	NEG	NA	<i>C.albidus</i>	96%	excelente	NR	NA	NA
TCM19	TCM	21/11/2013	POS Fraco	POS	NEG	NA	<i>C.albidus</i>	94%	muito boa	NR	NA	NA
TCM20	TCM	21/11/2013	POS Fraco	POS	NEG	NA	<i>C.albidus</i>	87%	aceitável	NR	NA	NA
TCM22	TCM	21/11/2013	POS Fraco	POS	POS	NA	<i>C.laurentii</i>	98%	excelente	NR	NA	NA
TCM23	TCM	21/11/2013	POS Fraco	POS	POS	NA	<i>C.laurentii</i>	97%	excelente	NR	NA	NA
TCM24	TCM	21/11/2013	POS Fraco	POS	POS	NA	<i>C.laurentii</i>	98%	excelente	NR	NA	NA
TCM25	TCM	21/11/2013	POS Fraco	POS	POS	NA	<i>C.laurentii</i>	97%	excelente	NR	NA	NA

(a):isolado identificado pelo VITEK que foi sequenciado; CGB: canavanina-glicina-azul de bromotimol; NA: teste não se aplica; NI: não identificado; NR: não realizado (b) isolados com 98% de identidade com *C.yokohamensis*; T: Parque Taquaral; HC: Hospital de Clínicas UNICAMP; M: Mercado Municipal; LR: Largo do Rosário; TCM: Teatro Castro Mendes; CM: Igreja Na Sra Do Carmo; BC: Biblioteca Central UNICAMP; CC: Centro de Convivências; POS: teste positivo; NEG: teste negativo; Prob: probabilidade

Apêndice 3: Dados de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Coeficiente de Interação Fracional (CIF) da combinação dos antifúngicos anfotericina B + 5-flucitosina contra 75 isolados clínicos de *Cryptococcus* spp.

LIF	Espécie	Genótipo	CIM				CIF			Efeito
			AMB	AMB Assoc	5FC	5FC Assoc	AMB	5FC	AMB+5FC	
319	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,125	0,06	0,5	0,06	0,48	0,12	0,60	I
321	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,125	0,06	0,5	0,06	0,48	0,12	0,60	I
324	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,125	0,06	1	0,06	0,48	0,06	0,54	I
325	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	1	0,06	0,24	0,06	0,30	S
328	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,125	0,06	0,5	0,06	0,48	0,12	0,60	I
349	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	1	0,06	0,24	0,06	0,30	S
352	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	2	0,06	0,24	0,03	0,27	S
357	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	0,5	0,06	0,24	0,12	0,36	S
360	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	0,5	0,06	0,24	0,12	0,36	S
362	<i>C.neoformans</i>	VNII	0,5	0,06	0,5	0,06	0,12	0,12	0,24	S
376	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	0,125	0,06	0,24	0,48	0,72	I
383	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,125	0,06	1	0,06	0,48	0,06	0,54	I
390	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	1	0,06	0,24	0,06	0,30	S
393	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,125	0,06	0,5	0,06	0,48	0,12	0,60	I
394	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	0,5	0,06	0,24	0,12	0,36	S
398	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	0,5	0,06	0,24	0,12	0,36	S
402	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	0,5	0,06	0,24	0,12	0,36	S
408	<i>C.gattii</i>	VGII	0,25	0,06	0,5	0,06	0,24	0,12	0,36	S
411	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,5	0,06	2	0,06	0,12	0,03	0,15	S
417	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	0,5	0,06	0,24	0,12	0,36	S
418	<i>C.gattii</i>	VGII	0,25	0,06	1	0,06	0,24	0,06	0,30	S
421	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,125	0,06	0,5	0,06	0,48	0,12	0,60	I
426	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,5	1	2	0,06	2,00	0,03	2,03	I
432	<i>C.gattii</i>	VGII	0,5	0,5	4	0,06	1,00	0,02	1,02	I
435	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,5	0,06	2	0,06	0,12	0,03	0,15	S
439	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	2	0,06	0,24	0,03	0,27	S
440	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	2	0,06	0,24	0,03	0,27	S
442	<i>C.neoformans</i>	VNII	0,5	0,06	2	0,06	0,12	0,03	0,15	S
445	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,5	0,06	1	0,06	0,12	0,06	0,18	S
448	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,5	0,06	1	0,125	0,12	0,13	0,25	S
450	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,125	0,06	1	0,06	0,48	0,06	0,54	I
451	<i>C.neoformans</i>	VNII	0,25	0,06	0,25	0,06	0,24	0,24	0,48	S
452	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,5	0,06	1	0,06	0,12	0,06	0,18	S
454	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,5	0,06	1	0,06	0,12	0,06	0,18	S
463	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	0,25	0,06	0,24	0,24	0,48	S
467	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,5	0,06	1	0,125	0,12	0,13	0,25	S
468	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	0,5	0,06	0,24	0,12	0,36	S
470	<i>C.neoformans</i>	VNII	0,5	0,06	0,5	0,06	0,12	0,12	0,24	S
474	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,5	0,06	1	0,06	0,12	0,06	0,18	S
476	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,125	0,06	0,25	0,06	0,48	0,24	0,72	I
478	<i>C.neoformans</i>	VNI	1	0,06	2	0,06	0,06	0,03	0,09	S
480	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,125	0,06	2	0,06	0,48	0,03	0,51	I
487	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	1	0,06	0,24	0,06	0,30	S
488	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	1	0,06	0,24	0,06	0,30	S
492	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,5	0,06	2	0,06	0,12	0,03	0,15	S
495	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,5	0,06	1	0,06	0,12	0,06	0,18	S
499	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	2	0,06	0,24	0,03	0,27	S
502	<i>C.gattii</i>	VGII	1	0,06	2	0,06	0,06	0,03	0,09	S
504	<i>C.gattii</i>	VGII	0,25	0,06	2	0,06	0,24	0,03	0,27	S
505	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,5	0,06	1	0,06	0,12	0,06	0,18	S
506	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,5	0,06	2	0,06	0,12	0,03	0,15	S
507	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,125	0,06	0,25	0,06	0,48	0,24	0,72	I
514	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	2	0,125	0,24	0,06	0,30	S
517	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	0,5	0,06	0,24	0,12	0,36	S
518	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	2	0,125	0,24	0,06	0,30	S
521	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,5	0,06	1	0,06	0,12	0,06	0,18	S

CIM: Concentração Inibitória Mínima; CIM assoc: CIM do antifúngico em associação; CIF:Concentração Inibitória Fracional; AMB: anfotericina B; 5FC: 5-flucitosina; S: sinergismo; I: indiferença

LIF	Espécie	Genótipo	CIM				CIF			Efeito
			AMB	AMB Assoc	5FC	5FC Assoc	AMB	5FC	AMB+5FC	
522	<i>C.gattii</i>	VGII	0,5	0,06	2	0,06	0,12	0,03	0,15	S
524	<i>C.gattii</i>	VGII	0,25	0,06	1	0,06	0,24	0,06	0,30	S
525	<i>C.gattii</i>	VGII	0,25	0,06	1	0,06	0,24	0,06	0,30	S
526	<i>C.gattii</i>	VGII	0,25	0,06	0,5	0,06	0,24	0,12	0,36	S
527	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	1	0,06	0,24	0,06	0,30	S
529	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	1	0,06	0,24	0,06	0,30	S
534	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	1	0,06	0,24	0,06	0,30	S
535	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	0,5	0,06	0,24	0,12	0,36	S
536	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,125	0,06	0,25	0,06	0,48	0,24	0,72	I
538	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,125	0,06	0,25	0,06	0,48	0,24	0,72	I
544	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	2	0,06	0,24	0,03	0,27	S
548	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	2	0,06	0,24	0,03	0,27	S
550	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	2	0,06	0,24	0,03	0,27	S
551	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	2	0,06	0,24	0,03	0,27	S
552	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	0,5	0,06	0,24	0,12	0,36	S
556	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	1	0,06	0,24	0,06	0,30	S
557	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	2	0,06	0,24	0,03	0,27	S
560	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	2	0,06	0,24	0,03	0,27	S
564	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	2	0,06	0,24	0,03	0,27	S

CIM: Concentração Inibitória Mínima; CIM assoc: CIM do antifúngico em associação; CIF:Concentração Inibitória Fracional; AMB: anfotericina B; 5FC: 5-flucitosina; S: sinergismo; I: indiferença

Apêndice 4: Dados de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Coeficiente de Interação Fracional (CIF) da combinação dos antifúngicos Anfotericina B + fluconazol contra 75 isolados clínicos de *Cryptococcus* spp.

LIF	Espécie	Genótipo	CIM				CIF			Efeito
			AMB	AMB Assoc	FCL	FCL Assoc	AMB	FCL	AMB+FCL	
319	<i>C. neoformans</i>	VNI	0,125	0,06	0,25	0,125	0,48	0,50	0,98	I
321	<i>C. neoformans</i>	VNI	0,125	0,06	4	0,125	0,48	0,03	0,51	I
324	<i>C. neoformans</i>	VNI	0,125	0,06	2	0,125	0,48	0,06	0,54	I
325	<i>C. neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	4	0,125	0,24	0,03	0,27	S
328	<i>C. neoformans</i>	VNI	0,125	0,06	4	0,125	0,48	0,03	0,51	I
349	<i>C. neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	4	0,125	0,24	0,03	0,27	S
352	<i>C. neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	4	0,125	0,24	0,03	0,27	S
357	<i>C. neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	8	0,125	0,24	0,02	0,26	S
360	<i>C. neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	4	0,125	0,24	0,03	0,27	S
362	<i>C. neoformans</i>	VNII	0,5	0,06	4	0,125	0,12	0,03	0,15	S
376	<i>C. neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	4	0,125	0,24	0,03	0,27	S
383	<i>C. neoformans</i>	VNI	0,125	0,06	4	0,125	0,48	0,03	0,51	I
390	<i>C. neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	2	0,125	0,24	0,06	0,30	S
393	<i>C. neoformans</i>	VNI	0,125	0,06	2	0,125	0,48	0,06	0,54	I
394	<i>C. neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	2	0,125	0,24	0,06	0,30	S
398	<i>C. neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	0,5	0,125	0,24	0,25	0,49	S
402	<i>C. neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	4	0,125	0,24	0,03	0,27	S
408	<i>C. gattii</i>	VGII	0,25	0,06	2	0,125	0,24	0,06	0,30	S
411	<i>C. neoformans</i>	VNI	0,5	0,06	8	0,125	0,12	0,02	0,14	S
417	<i>C. neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	2	0,125	0,24	0,06	0,30	S
418	<i>C. gattii</i>	VGII	0,25	0,06	2	0,125	0,24	0,06	0,30	S
421	<i>C. neoformans</i>	VNI	0,125	0,06	0,5	0,125	0,48	0,25	0,73	I
426	<i>C. neoformans</i>	VNI	0,5	0,06	2	0,125	0,12	0,06	0,18	S
432	<i>C. gattii</i>	VGII	0,5	0,5	16	0,125	1,00	0,01	1,01	I
435	<i>C. neoformans</i>	VNI	0,5	0,06	4	0,125	0,12	0,03	0,15	S
439	<i>C. neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	2	0,125	0,24	0,06	0,30	S
440	<i>C. neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	2	0,125	0,24	0,06	0,30	S
442	<i>C. neoformans</i>	VNII	0,5	0,06	2	0,125	0,12	0,06	0,18	S
445	<i>C. neoformans</i>	VNI	0,5	0,06	2	0,125	0,12	0,06	0,18	S
448	<i>C. neoformans</i>	VNI	0,5	0,06	4	0,5	0,12	0,13	0,25	S
450	<i>C. neoformans</i>	VNI	0,125	0,06	4	0,125	0,48	0,03	0,51	I
451	<i>C. neoformans</i>	VNII	0,25	0,06	0,5	0,125	0,24	0,25	0,49	S
452	<i>C. neoformans</i>	VNI	0,5	0,06	2	0,125	0,12	0,06	0,18	S
454	<i>C. neoformans</i>	VNI	0,5	0,06	4	0,125	0,12	0,03	0,15	S
463	<i>C. neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	4	0,125	0,24	0,03	0,27	S
467	<i>C. neoformans</i>	VNI	0,5	0,06	4	0,5	0,12	0,13	0,25	S
468	<i>C. neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	4	0,125	0,24	0,03	0,27	S
470	<i>C. neoformans</i>	VNII	0,5	0,06	4	0,125	0,12	0,03	0,15	S
474	<i>C. neoformans</i>	VNI	0,5	0,06	2	0,125	0,12	0,06	0,18	S
476	<i>C. neoformans</i>	VNI	0,125	0,06	2	0,125	0,48	0,06	0,54	I
478	<i>C. neoformans</i>	VNI	1	0,06	2	0,125	0,06	0,06	0,12	S
480	<i>C. neoformans</i>	VNI	0,125	0,06	4	0,125	0,48	0,03	0,51	I
487	<i>C. neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	1	0,125	0,24	0,13	0,37	S
488	<i>C. neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	4	0,125	0,24	0,03	0,27	S
492	<i>C. neoformans</i>	VNI	0,5	0,06	2	0,125	0,12	0,06	0,18	S
495	<i>C. neoformans</i>	VNI	0,5	0,06	2	0,125	0,12	0,06	0,18	S
499	<i>C. neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	1	0,125	0,24	0,13	0,37	S
502	<i>C. gattii</i>	VGII	1	0,06	8	0,125	0,06	0,02	0,08	S
504	<i>C. gattii</i>	VGII	0,25	0,06	2	0,125	0,24	0,06	0,30	S
505	<i>C. neoformans</i>	VNI	0,5	0,06	4	0,125	0,12	0,03	0,15	S
506	<i>C. neoformans</i>	VNI	0,5	0,06	2	0,125	0,12	0,06	0,18	S
507	<i>C. neoformans</i>	VNI	0,125	0,06	4	0,125	0,48	0,03	0,51	I
514	<i>C. neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	2	0,5	0,24	0,25	0,49	S
517	<i>C. neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	2	0,125	0,24	0,06	0,30	S
518	<i>C. neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	4	0,5	0,24	0,13	0,37	S
521	<i>C. neoformans</i>	VNI	0,5	0,06	4	0,125	0,12	0,03	0,15	S

CIM: Concentração Inibitória Mínima; CIM assoc: CIM do antifúngico em associação; CIF: Concentração Inibitória Fracional; AMB: anfotericina B; FCL: fluconazol; S: sinergismo; I: indiferença

LIF	Espécie	Genótipo	CIM				CIF			Efeito
			AMB	AMB Assoc	FCL	FCL Assoc	AMB	FCL	AMB+FCL	
522	<i>C.gattii</i>	VGII	0,5	0,06	8	0,125	0,12	0,02	0,14	S
524	<i>C.gattii</i>	VGII	0,25	0,06	8	0,125	0,24	0,02	0,26	S
525	<i>C.gattii</i>	VGII	0,25	0,06	8	0,125	0,24	0,02	0,26	S
526	<i>C.gattii</i>	VGII	0,25	0,06	4	0,125	0,24	0,03	0,27	S
527	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	4	0,125	0,24	0,03	0,27	S
529	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	8	0,125	0,24	0,02	0,26	S
534	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	4	0,125	0,24	0,03	0,27	S
535	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	2	0,125	0,24	0,06	0,30	S
536	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,125	0,06	4	0,125	0,48	0,03	0,51	I
538	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,125	0,06	2	0,125	0,48	0,06	0,54	I
544	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	8	0,125	0,24	0,02	0,26	S
548	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	8	0,125	0,24	0,02	0,26	S
550	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	8	0,5	0,24	0,06	0,30	S
551	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	4	0,125	0,24	0,03	0,27	S
552	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	4	0,125	0,24	0,03	0,27	S
556	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	4	0,125	0,24	0,03	0,27	S
557	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	8	0,125	0,24	0,02	0,26	S
560	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	4	0,125	0,24	0,03	0,27	S
564	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	4	0,125	0,24	0,03	0,27	S

CIM: Concentração Inibitória Mínima; CIM assoc: CIM do antifúngico em associação; CIF: Concentração Inibitória Fracional; AMB: anfotericina B; FCL: fluconazol; S: sinergismo; I: indiferença

Apêndice 5: Dados de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Coeficiente de Interação Fracional (CIF) da combinação dos antifúngicos anfotericina B + terbinafina contra 75 isolados clínicos de *Cryptococcus* spp.

LIF	Espécie	Genótipo	CIM				CIF			Efeito
			AMB	AMB Assoc	TRB	TRB Assoc	AMB	TRB	AMB+TRB	
319	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,125	0,06	0,25	0,06	0,48	0,24	0,72	I
321	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,125	0,06	0,5	0,06	0,48	0,12	0,60	I
324	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,125	0,06	0,25	0,06	0,48	0,24	0,72	I
325	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	0,125	0,06	0,24	0,48	0,72	I
328	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,125	0,06	0,5	0,06	0,48	0,12	0,60	I
349	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	0,5	0,06	0,24	0,12	0,36	S
352	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	0,25	0,06	0,24	0,24	0,48	S
357	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	1	0,06	0,24	0,06	0,30	S
360	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	1	0,06	0,24	0,06	0,30	S
362	<i>C.neoformans</i>	VNII	0,5	0,06	0,5	0,06	0,12	0,12	0,24	S
376	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	0,25	0,06	0,24	0,24	0,48	S
383	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,125	0,06	0,5	0,06	0,48	0,12	0,60	I
390	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	1	0,06	0,24	0,06	0,30	S
393	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,125	0,06	0,125	0,06	0,48	0,48	0,96	I
394	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	0,25	0,06	0,24	0,24	0,48	S
398	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	0,5	0,06	0,24	0,12	0,36	S
402	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	0,5	0,06	0,24	0,12	0,36	S
408	<i>C.gattii</i>	VGII	0,25	0,06	1	0,06	0,24	0,06	0,30	S
411	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,5	0,06	2	0,06	0,12	0,03	0,15	S
417	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	0,25	0,06	0,24	0,24	0,48	S
418	<i>C.gattii</i>	VGII	0,25	0,06	1	0,06	0,24	0,06	0,30	S
421	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,125	0,06	0,25	0,06	0,48	0,24	0,72	I
426	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,5	0,06	1	0,06	0,12	0,06	0,18	S
432	<i>C.gattii</i>	VGII	0,5	0,06	2	0,06	0,12	0,03	0,15	S
435	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,5	0,06	2	0,06	0,12	0,03	0,15	S
439	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	0,5	0,06	0,24	0,12	0,36	S
440	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	2	0,06	0,24	0,03	0,27	S
442	<i>C.neoformans</i>	VNII	0,5	0,06	2	0,06	0,12	0,03	0,15	S
445	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,5	0,06	0,5	0,06	0,12	0,12	0,24	S
448	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,5	0,06	1	0,06	0,12	0,06	0,18	S
450	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,125	0,06	0,25	0,06	0,48	0,24	0,72	I
451	<i>C.neoformans</i>	VNII	0,25	0,06	0,25	0,06	0,24	0,24	0,48	S
452	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,5	0,06	1	0,06	0,12	0,06	0,18	S
454	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,5	0,06	0,5	0,06	0,12	0,12	0,24	S
463	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	2	0,06	0,24	0,03	0,27	S
467	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,5	0,06	1	0,06	0,12	0,06	0,18	S
468	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	1	0,06	0,24	0,06	0,30	S
470	<i>C.neoformans</i>	VNII	0,5	0,06	1	0,06	0,12	0,06	0,18	S
474	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,5	0,06	0,5	0,06	0,12	0,12	0,24	S
476	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,125	0,06	1	0,06	0,48	0,06	0,54	I
478	<i>C.neoformans</i>	VNI	1	0,06	1	0,06	0,06	0,06	0,12	S
480	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,125	0,06	0,5	0,06	0,48	0,12	0,60	I
487	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	1	0,06	0,24	0,06	0,30	S
488	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	1	0,06	0,24	0,06	0,30	S
492	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,5	0,06	1	0,06	0,12	0,06	0,18	S
495	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,5	0,06	2	0,06	0,12	0,03	0,15	S
499	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	1	0,06	0,24	0,06	0,30	S
502	<i>C.gattii</i>	VGII	1	0,06	4	0,06	0,06	0,02	0,08	S
504	<i>C.gattii</i>	VGII	0,25	0,06	2	0,06	0,24	0,03	0,27	S
505	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,5	0,06	2	0,06	0,12	0,03	0,15	S
506	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,5	0,06	1	0,06	0,12	0,06	0,18	S
507	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,125	0,06	0,25	0,06	0,48	0,24	0,72	I
514	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	1	0,06	0,24	0,06	0,30	S
517	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	1	0,06	0,24	0,06	0,30	S
518	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	1	0,06	0,24	0,06	0,30	S
521	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,5	0,06	0,5	0,06	0,12	0,12	0,24	S

CIM: Concentração Inibitória Mínima; CIM assoc: CIM do antifúngico em associação; CIF:Concentração Inibitória Fracional; AMB: anfotericina B; TRB: terbinafina; S: sinergismo; I: indiferença

LIF	Espécie	Genótipo	CIM				CIF			Efeito
			AMB	AMB Assoc	TRB	TRB Assoc	AMB	TRB	AMB+TRB	
522	<i>C.gattii</i>	VGII	0,5	0,06	2	0,06	0,12	0,03	0,15	S
524	<i>C.gattii</i>	VGII	0,25	0,06	0,5	0,06	0,24	0,12	0,36	S
525	<i>C.gattii</i>	VGII	0,25	0,06	2	0,06	0,24	0,03	0,27	S
526	<i>C.gattii</i>	VGII	0,25	0,06	0,5	0,06	0,24	0,12	0,36	S
527	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	0,5	0,06	0,24	0,12	0,36	S
529	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	2	0,06	0,24	0,03	0,27	S
534	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	0,5	0,06	0,24	0,12	0,36	S
535	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	0,5	0,06	0,24	0,12	0,36	S
536	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,125	0,06	1	0,06	0,48	0,06	0,54	I
538	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,125	0,06	2	0,06	0,48	0,03	0,51	I
544	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	1	0,06	0,24	0,06	0,30	S
548	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	1	0,06	0,24	0,06	0,30	S
550	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	1	0,06	0,24	0,06	0,30	S
551	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	1	0,06	0,24	0,06	0,30	S
552	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	0,5	0,06	0,24	0,12	0,36	S
556	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	1	0,06	0,24	0,06	0,30	S
557	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	1	0,06	0,24	0,06	0,30	S
560	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	0,5	0,06	0,24	0,12	0,36	S
564	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,06	1	0,06	0,24	0,06	0,30	S

CIM: Concentração Inibitória Mínima; CIM assoc: CIM do antifúngico em associação; CIF:Concentração Inibitória Fracional; AMB: anfotericina B; TRB: terbinafina; S: sinergismo; I: indiferença

Apêndice 6: Dados de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Coeficiente de Interação Fracional (CIF) da combinação dos antifúngicos fluconazol + terbinafina contra 75 isolados clínicos de *Cryptococcus* spp.

LIF	Espécie	Genótipo	CIM				CIF			Efeito
			FCL	FCL Assoc	TRB	TRB Assoc	FCL	TRB	FCL+TRB	
319	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,25	0,125	0,25	0,06	0,50	0,24	0,74	I
321	<i>C.neoformans</i>	VNI	4	0,125	0,5	0,06	0,03	0,12	0,15	S
324	<i>C.neoformans</i>	VNI	2	0,125	0,25	0,06	0,06	0,24	0,30	S
325	<i>C.neoformans</i>	VNI	4	0,125	0,125	0,06	0,03	0,48	0,51	I
328	<i>C.neoformans</i>	VNI	4	0,125	0,5	0,06	0,03	0,12	0,15	S
349	<i>C.neoformans</i>	VNI	4	0,125	0,5	0,06	0,03	0,12	0,15	S
352	<i>C.neoformans</i>	VNI	4	0,125	0,25	0,06	0,03	0,24	0,27	S
357	<i>C.neoformans</i>	VNI	8	0,125	1	0,06	0,02	0,06	0,08	S
360	<i>C.neoformans</i>	VNI	4	0,125	1	0,06	0,03	0,06	0,09	S
362	<i>C.neoformans</i>	VNII	4	0,125	0,5	0,06	0,03	0,12	0,15	S
376	<i>C.neoformans</i>	VNI	4	0,125	0,25	0,06	0,03	0,24	0,27	S
383	<i>C.neoformans</i>	VNI	4	0,125	0,5	0,06	0,03	0,12	0,15	S
390	<i>C.neoformans</i>	VNI	2	0,125	1	0,06	0,06	0,06	0,12	S
393	<i>C.neoformans</i>	VNI	2	0,125	0,125	0,06	0,06	0,48	0,54	I
394	<i>C.neoformans</i>	VNI	2	0,125	0,25	0,06	0,06	0,24	0,30	S
398	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,5	0,125	0,5	0,06	0,25	0,12	0,37	S
402	<i>C.neoformans</i>	VNI	4	0,125	0,5	0,06	0,03	0,12	0,15	S
408	<i>C.gattii</i>	VGII	2	0,125	1	0,06	0,06	0,06	0,12	S
411	<i>C.neoformans</i>	VNI	8	0,125	2	0,06	0,02	0,03	0,05	S
417	<i>C.neoformans</i>	VNI	2	0,125	0,25	0,06	0,06	0,24	0,30	S
418	<i>C.gattii</i>	VGII	2	0,06	1	0,06	0,03	0,06	0,09	S
421	<i>C.neoformans</i>	VNI	0,5	0,125	0,25	0,06	0,25	0,24	0,49	S
426	<i>C.neoformans</i>	VNI	2	0,125	1	0,06	0,06	0,06	0,12	S
432	<i>C.gattii</i>	VGII	16	0,125	2	0,06	0,01	0,03	0,04	S
435	<i>C.neoformans</i>	VNI	4	0,125	2	0,06	0,03	0,03	0,06	S
439	<i>C.neoformans</i>	VNI	2	0,125	0,5	0,06	0,06	0,12	0,18	S
440	<i>C.neoformans</i>	VNI	2	0,125	2	0,06	0,06	0,03	0,09	S
442	<i>C.neoformans</i>	VNII	2	0,125	2	0,06	0,06	0,03	0,09	S
445	<i>C.neoformans</i>	VNI	2	0,125	0,5	0,06	0,06	0,12	0,18	S
448	<i>C.neoformans</i>	VNI	4	0,125	1	0,06	0,03	0,06	0,09	S
450	<i>C.neoformans</i>	VNI	4	0,125	0,25	0,06	0,03	0,24	0,27	S
451	<i>C.neoformans</i>	VNII	0,5	0,125	0,25	0,06	0,25	0,24	0,49	S
452	<i>C.neoformans</i>	VNI	2	0,125	1	0,06	0,06	0,06	0,12	S
454	<i>C.neoformans</i>	VNI	4	0,125	0,5	0,06	0,03	0,12	0,15	S
463	<i>C.neoformans</i>	VNI	4	0,125	2	0,06	0,03	0,03	0,06	S
467	<i>C.neoformans</i>	VNI	4	0,5	1	0,06	0,13	0,06	0,19	S
468	<i>C.neoformans</i>	VNI	4	0,125	1	0,06	0,03	0,06	0,09	S
470	<i>C.neoformans</i>	VNII	4	0,125	1	0,06	0,03	0,06	0,09	S
474	<i>C.neoformans</i>	VNI	2	0,125	0,5	0,06	0,06	0,12	0,18	S
476	<i>C.neoformans</i>	VNI	2	0,125	1	0,06	0,06	0,06	0,12	S
478	<i>C.neoformans</i>	VNI	2	0,125	1	0,06	0,06	0,06	0,12	S
480	<i>C.neoformans</i>	VNI	4	0,125	0,5	0,06	0,03	0,12	0,15	S
487	<i>C.neoformans</i>	VNI	1	0,125	1	0,06	0,13	0,06	0,19	S
488	<i>C.neoformans</i>	VNI	4	0,125	1	0,06	0,03	0,06	0,09	S
492	<i>C.neoformans</i>	VNI	2	0,125	1	0,06	0,06	0,06	0,12	S
495	<i>C.neoformans</i>	VNI	2	0,125	2	0,06	0,06	0,03	0,09	S
499	<i>C.neoformans</i>	VNI	1	0,125	1	0,06	0,13	0,06	0,19	S
502	<i>C.gattii</i>	VGII	8	0,125	4	0,06	0,02	0,015	0,03	S
504	<i>C.gattii</i>	VGII	2	0,125	2	0,06	0,06	0,03	0,09	S
505	<i>C.neoformans</i>	VNI	4	0,125	2	0,06	0,03	0,03	0,06	S
506	<i>C.neoformans</i>	VNI	2	0,125	1	0,06	0,06	0,06	0,12	S
507	<i>C.neoformans</i>	VNI	4	0,125	0,25	0,06	0,03	0,24	0,27	S
514	<i>C.neoformans</i>	VNI	2	0,125	1	0,06	0,06	0,06	0,12	S
517	<i>C.neoformans</i>	VNI	2	0,125	1	0,06	0,06	0,06	0,12	S
518	<i>C.neoformans</i>	VNI	4	0,125	1	0,06	0,03	0,06	0,09	S
521	<i>C.neoformans</i>	VNI	4	0,125	0,5	0,06	0,03	0,12	0,15	S

CIM: Concentração Inibitória Mínima; CIM assoc: CIM do antifúngico em associação; CIF:Concentração Inibitória Fracional; FCL: fluconazol;TRB: terbinafina S: sinergismo; I: indiferença

LIF	Espécie	Genótipo	CIM				CIF			Efeito
			FCL	FCL Assoc	TRB	TRB Assoc	FCL	TRB	FCL+TRB	
522	<i>C.gattii</i>	VGII	8	0,125	2	0,06	0,02	0,03	0,05	S
524	<i>C.gattii</i>	VGII	8	0,125	0,5	0,06	0,02	0,12	0,14	S
525	<i>C.gattii</i>	VGII	8	0,125	2	0,06	0,02	0,03	0,05	S
526	<i>C.gattii</i>	VGII	4	0,125	0,5	0,06	0,03	0,12	0,15	S
527	<i>C.neoformans</i>	VNI	4	0,125	0,5	0,06	0,03	0,12	0,15	S
529	<i>C.neoformans</i>	VNI	8	0,125	2	0,06	0,02	0,03	0,05	S
534	<i>C.neoformans</i>	VNI	4	0,125	0,5	0,06	0,03	0,12	0,15	S
535	<i>C.neoformans</i>	VNI	2	0,125	0,5	0,06	0,06	0,12	0,18	S
536	<i>C.neoformans</i>	VNI	4	0,125	1	0,06	0,03	0,06	0,09	S
538	<i>C.neoformans</i>	VNI	2	0,125	2	0,06	0,06	0,03	0,09	S
544	<i>C.neoformans</i>	VNI	8	0,125	1	0,06	0,02	0,06	0,08	S
548	<i>C.neoformans</i>	VNI	8	0,125	1	0,06	0,02	0,06	0,08	S
550	<i>C.neoformans</i>	VNI	8	0,125	1	0,06	0,02	0,06	0,08	S
551	<i>C.neoformans</i>	VNI	4	0,125	1	0,06	0,03	0,06	0,09	S
552	<i>C.neoformans</i>	VNI	4	0,125	0,5	0,06	0,03	0,12	0,15	S
556	<i>C.neoformans</i>	VNI	4	0,125	1	0,06	0,03	0,06	0,09	S
557	<i>C.neoformans</i>	VNI	8	0,125	1	0,06	0,02	0,06	0,08	S
560	<i>C.neoformans</i>	VNI	4	0,125	0,5	0,06	0,03	0,12	0,15	S
564	<i>C.neoformans</i>	VNI	4	0,125	1	0,06	0,03	0,06	0,09	S

CIM: Concentração Inibitória Mínima; CIM assoc: CIM do antifúngico em associação; CIF:Concentração Inibitória Fracional; FCL: fluconazol;TRB: terbinafina S: sinergismo; I: indiferença