

ANA CECÍLIA NASTRINI DELGADO

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, área Ciências Biomédicas da aluna **Ana Cecília Nastrini Delgado**.

Campinas, 25 de julho de 2002.

Profa. Dra. Maria Cecília Barisson Villares
Orientadora

M. Cecilia B. Villares

**TIPAGEM MOLECULAR E PERFIL DE SUSCETIBILIDADE AOS
ANTIFÚNGICOS DE ISOLADOS AMBIENTAIS E CLÍNICOS DE
Cryptococcus neoformans NA CIDADE E REGIÃO DE
CAMPINAS, SÃO PAULO.**

CAMPINAS

2002

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

200305942

ANA CECÍLIA NASTRINI DELGADO

**TIPAGEM MOLECULAR E PERFIL DE SUSCETIBILIDADE AOS
ANTIFÚNGICOS DE ISOLADOS AMBIENTAIS E CLÍNICOS DE
Cryptococcus neoformans NA CIDADE E REGIÃO DE
CAMPINAS, SÃO PAULO.**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre
em Ciências Médicas, área de Ciências Biomédicas.*

ORIENTADORA: *Profª Drª Maria Cecilia Barisson Villares*

CO-ORIENTADORA: *Profª Drª Maria Luiza Moretti Branchini*

CAMPINAS

2002

iii

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE	30
Nº CHAMADA	UNICAMP D 378t
V	EX
TOMBO BC/	52320
PROC.	124103
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	
Nº CPD	

CM00179209-1

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

D378t

Delgado, Ana Cecília Nastrini

Tipagem molecular e perfil de suscetibilidade aos antifúngicos de isolados ambientais e clínicos de *Cryptococcus neoformans* na cidade e região de Campinas, São Paulo / Ana Cecília Nastrini Delgado. Campinas, SP : [s.n.], 2002.

Orientadores : Maria Cecilia Barisson Villares, Maria Luiza Moretti Branchini

Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Microbiologia. 2. Epidemiologia. 3. Aids-Doenças. 4. Fungos. I. Maria Cecília Barisson Villares. .II. Maria Luiza Moretti Branchini. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. VI. Título.

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

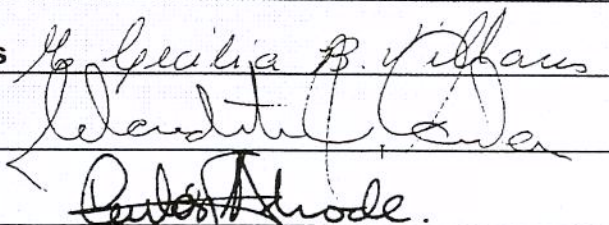
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Cecilia Barisson Villares

Membros:

1. Prof^a. Dr^a. Maria Cecilia Barisson Villares

2. Prof^a. Dr^a. Claudete Rodrigues Paula

3. Prof. Dr. Carlos Fernando S. de Andrade



The image shows three handwritten signatures in black ink. The first signature is for Maria Cecilia Barisson Villares, the second for Claudete Rodrigues Paula, and the third for Carlos Fernando S. de Andrade. The signatures are written over the printed names of the members.

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 25/07/2002

***ESTE TRABALHO FOI REALIZADO COM AUXÍLIO FINANCEIRO FORNECIDO
PELA FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO –
FAPESP (PROCESSOS: N° 99/10697-0 E N° 99/08072-1)***

DEDICATÓRIA

À meus pais João e Márcia, que ensinaram-me a caminhar com amor, humildade, respeito e verdade. Ao papai pelos esforços e a mamãe por ter-me aberto a porta de entrada desta caminhada.

Ao meu sobrinho Lucas, pela minha alegria de viver.

À minha irmã Ana Carolina e aos meus irmãos Luiz Gustavo e Flávio Augusto, pelo imenso carinho e apoio.

Aos meus avós Ezio e Elza, que ensinaram-me o sentido da família.

À Deus por abençoar a mim e a minha família, que é tudo para mim.

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª. Dr^ª. Maria Cecilia Barisson Villares, que muito além de minha amiga e orientadora, foi a pessoa que acreditou em minha capacidade profissional e me deu a oportunidade de iniciar minha carreira acadêmica.

À co-orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Maria Luiza Moretti Branchini, pela paciência, disposição e todo o apoio neste presente trabalho, além da valiosa oportunidade de aprender e trabalhar em um grande laboratório de pesquisa.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia e Micologia do Departamento de Patologia Clínica da FCM/UNICAMP, em especial à Prof^ª. Dr^ª. Angélica Zaninelli Schreiber, Dr^ª. Angela von Nowakowski, Luzia Lyra e Edson A. Luz, pela enorme amizade, carinho, disposição e colaboração.

Aos colegas e funcionários do Laboratório de Biologia Molecular e Fungos da Disciplina de Doenças Transmissíveis do Departamento de Clínica Médica da FCM/UNICAMP, em especial ao Guaracy S. Ribeiro e a Éri van O. Ribeiro, pela paciência, carinho e apoio durante a elaboração deste trabalho.

Aos funcionários do Apoio Didático, Científico e Computacional da FCM/UNICAMP, pela valiosa colaboração e prestatividade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro.

À Japan International Corporation Agency (JICA), em especial ao Prof. Dr. Hideaki Taguchi do “Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxigenesis” da Universidade de Chiba, no Japão.

Aos meus queridos amigos do Curso de Especialização em Análises Clínicas da FCF/USP, Marilivia, Juliana, Eloise, Luiz, Sandro, Munir e Tarcisio, que nos momentos mais difíceis me fizeram sorrir.

Às minhas queridas amigas Alessandra, Maria, Mariana, Ana Beatriz, Luzia, Cissa, Dulce e Ana Bolena e aos meus queridos amigos Renato, Orlando e Carlos Magno, por “tudo”.

A todos os meus familiares, em especial a Marisa Elena, pelo carinho e incentivo.

Aos demais amigos do Hospital das Clínicas da UNICAMP, que simplesmente com sorrisos e amizade, me apoiaram e acreditaram em mim.

Aos pacientes deste trabalho e aos pombos, que me fizeram acreditar que todos os esforços valem a pena ...

O meu sincero e profundo agradecimento!

Conquistar-se:

*é aceitar os seus próprios limites, é tentar
superá-los sem choro, é possuir em amor e
força, a força de ser si mesmo.*

(autor desconhecido)

	<i>Pág</i>
RESUMO	xxxv
ABSTRACT	xxxix
1. INTRODUÇÃO	43
1.1. História da Sinonímia.....	45
1.2. Ecologia.....	46
1.3. Criptococose e Epidemiologia.....	49
1.4. Identificação Laboratorial.....	51
1.4.1. Micromorfologia e Macromorfologia.....	51
1.4.2. Bioquímica.....	52
1.4.3. Identificação das variedades e sorotipos.....	52
1.5. Tipagem molecular.....	54
1.6. Suscetibilidade aos antifúngicos.....	58
2. OBJETIVOS	61
3. MATERIAL E MÉTODOS	65
3.1. Cepas de <i>Cryptococcus neoformans</i>	67
3.1.1. Isolamento e identificação de cepas ambientais de <i>C. neoformans</i>	67

3.1.2. Confirmação da viabilidade, pureza e identificação das cepas clínicas de <i>C. neoformans</i>	68
3.2. Identificação das variedades de <i>C. neoformans</i>	69
3.3. Sorotipagem de <i>C. neoformans</i>	69
3.4. Tipagem molecular de <i>C. neoformans</i>	69
3.4.1. Preparação do inóculo.....	70
3.4.2. Preparação do DNA genômico.....	70
3.4.3. Cariotipagem eletroforética.....	71
3.4.4. Análise dos resultados da CE.....	71
3.5. Avaliação da suscetibilidade aos antifúngicos de <i>C. neoformans</i>	71
3.5.1. Microdiluição em caldo.....	71
3.5.1.1. Cepa-controle.....	71
3.5.1.2. Microrganismos.....	72
3.5.1.3. Meio de Cultivo.....	72
3.5.1.4. Antifúngicos avaliados.....	72
3.5.1.5. Preparação das soluções estoque e trabalho.....	72
3.5.1.6. Inóculo.....	73
3.5.1.7. Procedimento do teste de microdiluição em caldo.....	73
3.5.1.8. Leitura.....	74
3.5.2. Análise dos resultados.....	74

4. RESULTADOS.....	75
5. DISCUSSÃO.....	99
6. CONCLUSÕES.....	113
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	117
8. ANEXOS.....	131
8.1. Anexo 1.....	133
8.2. Anexo 2.....	135
8.3. Anexo 3.....	137
8.4. Anexo 4.....	139
8.5. Anexo 5.....	141
8.6. Anexo 6.....	143
8.7. Anexo 7.....	149
8.8. Anexo 8.....	151

LISTA DE ABREVIATURAS

AFLP	amplification fragment lenght polimorfism
ASD	ágar Sabouraud dextrose
Aids	acquired immunodeficiency syndrome
AMB	anfotericina B
ATCC	American Type Culture Collection
CE	cariotipagem eletroforética
CGB	canavanina-glicina-azul de bromotimol
CHEF	contour - clamped homogenous electric field
CIM	concentração inibitória mínima
5-FC	5- fluorocitosina
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido etilenoaminotetracético
FLCZ	fluconazol
HIV	human immunodeficiency virus
ITCZ	itraconazol
Kb	kilobases

mM	milimolar
mL	mililitro
μg	micrograma
μL	microlitro
μm	micrômetro
MOPS	ácido morfolinopropanosulfônico
NCCLS	National Commitee for Clinical Laboratory Standards
OFAGE	orthogonal field alternating gel electrophoresis
PCR	polimerase chain reaction
PFGE	pulsed field gel electrophoresis
RAPD	random amplified polymorphic DNA
RFLP	restriction fragment length polimorfism
rpm	rotações por minuto
TBE	tris borato EDTA
Trizma	tris (hydroxymethyl) aminomethano
YEPD	Yeast nitrogen base

	<i>Pág</i>
TABELA 1 : Distribuição das variedades e sorotipos de cepas clínicas de <i>C. neoformans</i> , isoladas de 52 pacientes internados no HC-UNICAMP, segundo sexo e presença ou ausência de infecção pelo HIV.....	77
TABELA 2 : Diversidade genômica dos 5 perfis de <i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> sorotipo A, isoladas de excretas de pombos, de acordo com a localização na cidade de Campinas.....	78
TABELA 3 : Variação dos valores de CIM ($\mu\text{g/mL}$) obtidas de cepa-controle <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019 e seus valores de referência, frente aos antifúngicos avaliados.....	92
TABELA 4 : Atividade “ <i>in vitro</i> ” de 4 antifúngicos de 55 cepas ambientais e 52 cepas clínicas de <i>C. neoformans</i> , isoladas na cidade e região de Campinas.....	93
TABELA 5 : Variação dos valores de CIM ($\mu\text{g/mL}$) para AMB, segundo o número de cepas ambientais e clínicas de <i>C. neoformans</i>	94
TABELA 6 : Variação dos valores de CIM ($\mu\text{g/mL}$) para 5-FC, segundo o número de cepas ambientais e clínicas de <i>C. neoformans</i>	94
TABELA 7 : Variação dos valores de CIM ($\mu\text{g/mL}$) para FLCZ, segundo o número de cepas ambientais e clínicas de <i>C. neoformans</i>	95
TABELA 8 : Variação dos valores de CIM ($\mu\text{g/mL}$) para ITCZ, segundo o número de cepas ambientais e clínicas de <i>C. neoformans</i>	95

TABELA 9 :	Variação dos valores de CIM ($\mu\text{g/mL}$) de AMB, 5-FC, FLCZ e ITCZ, para <i>C. neoformans</i> isolados de espécimes clínicos, segundo variedade e sorotipo e presença ou ausência de infecção pelo HIV.....	96
TABELA 10 :	Variação dos valores de CIM ($\mu\text{g/mL}$) de AMB, 5-FC, FLCZ e ITCZ, para <i>C. neoformans</i> , isolados de excretas de pombos, segundo o perfil genômico e o número de cepas.....	97
TABELA 11 :	Variação dos valores de CIM ($\mu\text{g/mL}$) de AMB, 5-FC, FLCZ e ITCZ, para <i>C. neoformans</i> , isolados de espécimes clínicos, segundo o perfil genômico e o número de cepas..	97

	<i>Pág</i>
FIGURA 1 : Locais de coletas ambientais de <i>C. neoformans</i> na cidade de Campinas.....	67
FIGURA 2 : CE de <i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> sorotipo A isolados de excretas de pombos, na cidade de Campinas.....	79
FIGURA 3 : Dendrograma da figura 2. Os valores foram calculados pelo coeficiente de DICE (intervalo de confiança de 95%) e ilustra a similaridade entre os 5 perfis genômicos de <i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> sorotipo A, isolados de excretas de pombos, na cidade de Campinas.....	80
FIGURA 4 : Frequência da distribuição de 45 cepas clínicas de <i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> sorotipo A, de acordo com os perfis genômicos.....	81
FIGURA 5 : CE de <i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> sorotipo A, isolados de espécimes clínicos, da cidade e região de Campinas.....	83
FIGURA 6 : Dendrograma da figura 5. Os valores foram calculados pelo coeficiente de DICE (intervalo de confiança de 95%) e ilustra a similaridade entre os 14 perfis genômicos de <i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> sorotipo A, isolados de espécimes clínicos, da cidade e região de Campinas.....	85
FIGURA 7 : CE de <i>C. neoformans</i> var. <i>gattii</i> sorotipo B, isolados de espécimes clínicos, da cidade e região de Campinas.....	87

FIGURA 8 :	CE de <i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> sorotipo A, isolados de excretas de pombos e de espécimes clínicos, na cidade e região de Campinas.....	89
FIGURA 9 :	Dendrograma da figura 8. Os valores foram calculados pelo coeficiente de DICE (intervalo de confiança de 95%) e ilustra a similaridade entre os perfis genômicos de <i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> sorotipo A, isolados de excretas de pombos e de espécimes clínicos, na cidade e região de Campinas.....	91
FIGURA 10 :	Figura 10: Cultura de <i>C. neoformans</i> em ágar Sabouraud dextrose (ASD).....	151
FIGURA 11 :	Cultura de <i>C. neoformans</i> em ágar “cornmeal” com ácido cafeico.....	151
FIGURA 12 :	<i>C. neoformans</i> em meio de canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB).....	151
FIGURA 13 :	Microplaca de titulação e suporte contendo espelho reverso.....	152
FIGURA 14 :	Padrão de peso molecular – <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	152
FIGURA 15 :	Mercado Central de Campinas.....	153
FIGURA 16 :	Largo do Rosário – Campinas.....	153



RESUMO

DELGADO, A.C.N. – Tipagem molecular e perfil de suscetibilidade aos antifúngicos de isolados ambientais e clínicos na cidade e região de Campinas, São Paulo. Tese (Mestrado) – Faculdade de Ciências Médicas – Universidade Estadual de Campinas.

A criptococose representa importante micose oportunista de ocorrência freqüente e grave nos pacientes atendidos no HC-UNICAMP, em especial nos pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (Aids). O presente estudo foi proposto para aprimorar o conhecimento de *C. neoformans* isolados de pacientes com criptococose e sua correlação com o meio ambiente. Foram estudadas 52 cepas clínicas e 55 cepas ambientais (excretas de pombos) de *C. neoformans* procedentes da cidade e região de Campinas, São Paulo, Brasil. As cepas de *C. neoformans* foram isoladas em meio ágar “cornmeal” com ácido cafeico e as variedades e sorotipos foram identificados, respectivamente, pelo meio de canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB) e pelo teste de aglutinação em lâmina utilizando o kit “Crypto Check latron Co. Japão”. Foi realizado estudo do perfil genômico através da eletroforese em campo pulsátil (PFGE), utilizando o sistema “Counter-Clamped Homogeneous Electric Field” (CHEF). O estudo da suscetibilidade de *C. neoformans* frente a anfotericina B, 5-fluorocitosina, fluconazol e itraconazol foi realizado pelo método da microdiluição em caldo, segundo o National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).

Nosso estudo demonstrou o predomínio de *C. neoformans* var. *neoformans* sorotipo A em 86% das cepas clínicas, sendo a maioria presente em pacientes com infecção pelo HIV (75,5%) e *C. neoformans* var. *gattii* sorotipo B em 14% das cepas clínicas, sendo a maioria presente em pacientes imunocompetentes (71,4%). Todas as cepas ambientais foram *C. neoformans* var. *neoformans* sorotipo A. A análise da cariotipagem eletroforética (CE) diferenciou 14 perfis genômicos entre as cepas clínicas e 5 perfis entre as cepas ambientais de *C. neoformans* var. *neoformans* sorotipo A, e mostrou similaridade de 100% entre dois perfis ambientais (I e II) com dois perfis clínicos (E e F), obtidos de duas únicas cepas. O perfil de suscetibilidade mostrou a variação da concentração

inibitória mínima (CIM) de 0,5 a 1 µg/mL para AMB e de 0,125 a 0,25 µg/mL para ITCZ, para ambas as cepas de *C. neoformans* estudadas. As cepas ambientais apresentaram CIM variando de 1 a 16 µg/mL para 5-FC e 2 a 8 µg/mL para FLCZ. As cepas clínicas apresentaram CIM variando de 0,25 a 8 µg/mL para 5-FC e de 0,25 a 16 µg/mL para FLCZ. A CIM₅₀ e CIM₉₀ para AMB foi de 1 µg/mL para ambas as cepas estudadas. A 5-FC apresentou CIM₅₀ de 1 µg/mL e CIM₉₀ de 2 µg/mL, para as cepas clínicas, e CIM₅₀ e CIM₉₀ de 2 µg/mL para as cepas ambientais. O FLCZ apresentou CIM₅₀ e CIM₉₀ de 4 µg/mL para as cepas ambientais, e CIM₅₀ de 2 µg/mL e CIM₉₀ de 8 µg/mL para as cepas clínicas. O ITCZ apresentou CIM₅₀ e CIM₉₀ de 0,25 µg/mL para ambas as cepas estudadas. Esses dados apontam a necessidade de estudos continuados do perfil genômico e de sensibilidade aos antifúngicos em relação as cepas clínicas e ambientais de *C. neoformans*, bem como a correlação entre a evolução clínica da criptococose com os dados laboratoriais moleculares e de sensibilidade, para melhor caracterização de amostras de *C. neoformans* na cidade e região de Campinas, SP.



ABSTRACT

Cryptococcosis represents an important opportunistic mycosis with frequent and serious occurrence in patients hospitalized at the Hospital and Clinics of UNICAMP, specially in immunocompromised patients. The present study was proposed to perfect the knowledge of *C. neoformans* isolated from patients with cryptococcosis and its correlation with the environment. Fifty-two clinical isolates and 55 environmental (pigeon droppings) isolates of *C. neoformans* were investigated, from Campinas, which is located in the state of São Paulo in Brazil. The clinical and environmental isolates were identified to species level based on micromorphological and biochemical characteristics and confirmed to be *C. neoformans* var. *neoformans* based on the reaction of canavanine-glycine-bromthymol blue agar. Serotyping was performed by slide agglutination test (Crypto Check; latron Co., Japan). Electrophoretic karyotype (EK) analysis was performed by Counter-Clamped Homogeneous Electric Field (CHEF DR-III). All the isolates were tested by broth microdilution method, performed according to the NCCLS guidelines for amphotericin B (AMB), fluconazole (FLCZ), itraconazole (ITCZ), and fluorocytosine (5-FC).

Our study demonstrated the predominance of *C. neoformans* var. *neoformans* serotype A in 86% of the clinical isolates, specially in HIV-positive patients (75,5%), and *C. neoformans* var. *gattii* serotype B in 14% of the clinical isolates, more commonly in immunocompetent patients (71,4%). All environmental isolates were *C. neoformans* var. *neoformans* serotype A. Molecular typing distinguished 14 clinical profiles and 5 environmental profiles of *C. neoformans* var. *neoformans* serotype A, and showed two clinical profiles, E and F, individually, identical to two environmental profiles, I and II, respectively. The antifungal susceptibility showed MIC of 0.5 to 1 µg/mL for AMB and 0.125 to 0.25 µg/mL for ITCZ, for both of isolates of *C. neoformans*. The environmental isolates showed MIC of 1 to 16 µg/mL for 5-FC and 2 to 8 µg/mL for FLCZ. The clinical isolates showed MIC of 0.25 to 8 µg/mL for 5-FC and 0.25 to 16 µg/mL for FLCZ. MIC₅₀ and MIC₉₀ for AMB of 1 µg/mL for both of isolates. 5-FC showed MIC₅₀ and MIC₉₀ of 2 µg/mL for clinical isolates, and MIC₅₀ and MIC₉₀ of 2 µg/mL for environmental isolates. FLCZ showed MIC₅₀ and MIC₉₀ of 4 µg/mL for clinical isolates, and MIC₅₀ of 2 µg/mL and

MIC₉₀ of 8 µg/mL for clinical isolates. ITCZ showed MIC₅₀ and MIC₉₀ of 0.25 µg/mL for both isolates. Continuous molecular and sensitivity studies of clinical and environmental isolates, including association between clinical evaluation of cryptococcosis with molecular and susceptibility laboratory, are mandatory to improve the understanding of *C. neoformans* in Campinas, Brazil.



1. INTRODUÇÃO

1.1. HISTÓRIA DA SINONÍMIA

A etimologia da palavra do gênero *Cryptococcus* vem do sufixo grego “Kriptos”, que significa cripta ou esconderijo secreto, sendo a terminologia criada por KÜRTZING, em 1833.

A primeira descrição de *Cryptococcus neoformans* foi feita por Busse, em 1894, com base em uma levedura isolada de um caso de periosteíte crônica da tíbia, denominada *Saccharomyces* sp. A partir deste relato, vários estudos foram realizados e uma variedade de nomenclaturas foram estabelecidas para *C. neoformans*, dentre elas destacam-se: *Saccharomyces neoformans*, Sanfelice (1895); *Cryptococcus hominis*, Vuillemin (1901); *Torula neoformans*, Weiss (1902); *Torula histolytica*, Stoddard & Cutler (1916); *Debaryomyces hominis*, Todd & Herrmann (1936) (LACAZ, 1998; RIPPON, 1988).

Taxonomicamente, *C. neoformans* é classificado segundo a sua forma perfeita (KURTZMAN & FELL, 1998) em: reino Fungi, divisão Basidiomycota, ordem *Filobasidiales*, família *Filobasidiaceae*, gênero *Filobasidiella*, espécie tipo *Filobasidiella neoformans* Kwong Chung.

Espécies aceitas *Filobasidiella neoformans* (KWONG-CHUNG, 1975)

a) *Filobasidiella neoformans* Kwong-Chung var. *neoformans* (KWONG-CHUNG et al., 1982)

Anamorfo: *Cryptococcus neoformans* (Sanfelice) Vuillemin (Sorotipos A e D)

b) *Filobasidiella neoformans* Kwong-Chung var. *bacillispora* (KWONG-CHUNG et al., 1982)

Anamorfo: *Cryptococcus neoformans* (Sanfelice) Vuillemin var. *gattii* (Sorotipos B e C) (VANBREUSEGHEM & TAKASHIO (1970).

Dentre as classificações das variedades e dos sorotipos merecem destaque: a classificação dos sorotipos A, B e C de *C. neoformans*, isolados de pacientes, por EVANS (1950); a identificação do sorotipo D realizada por WILSON et al. (1968); a denominação da variedade *gattii* (sorotipos B e C) de *C. neoformans* feita por VANBREUSEGHEM & TAKASHIO (1970); a classificação atual das variedades e de seus respectivos sorotipos [*C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo A e D) e *C. neoformans* var. *gattii* (sorotipo B e C)] assinalada por KWON-CHUNG et al. (1982); a identificação do sorotipo AD pertencente a *C. neoformans* var. *neoformans*, referido por MITCHEL & PERFECT (1995) e a descrição de uma nova classificação da variedade do sorotipo A, denominada *C. neoformans* var. *grubii*, referida por FRANZOT et al. (1999).

1.2. ECOLOGIA

C. neoformans var. *neoformans* (sorotipos A, D e AD) é cosmopolita e freqüentemente isolado em excretas de pombos, enquanto *C. neoformans* var. *gattii* (sorotipos B e C) está limitado a certas regiões tropicais e subtropicais, tais como o sul da Califórnia e a região oeste da Austrália, onde foram isolados em eucaliptos (KWON-CHUNG et al., 1982).

A primeira descrição de *C. neoformans* isolado do ambiente foi feita por SANFELICE (1894), a partir do suco de pêssago, que o classificou como *Saccharomyces neoformans*, provando posteriormente sua patogenicidade.

EMMONS (1951) isolou *C. neoformans* pela primeira vez no solo e mostrou haver uma estreita relação entre isolamentos do solo e ninhos de pombos. Posteriormente, o autor demonstrou que as fezes dessas aves eram um excelente meio de cultura para *C. neoformans* (EMMONS, 1955 e 1961). Desde então, vários autores têm descrito o isolamento de *C. neoformans* var. *neoformans* em excretas de aves, particularmente, em excretas de *Columba livia*, espécie mais comum de pombo, originalmente encontrada na Europa e na América do Norte, e

que foi subseqüentemente introduzida em diferentes partes do mundo, caracterizando-se como a principal fonte universal de *C. neoformans* var. *neoformans* (ANSHENG et al., 1993, CASTANÓN-OLIVARES & LÓPEZ-MARTÍNEZ, 1994 ; FRANZOT et al., 1997; KHOSRAVI, 1997).

Existem vários fatores que podem influenciar na sobrevivência de *C. neoformans* var. *neoformans* em excretas de pombos, tais como: cápsula pequena (1 a 5.5 µm de diâmetro), pH ácido, alta umidade, temperatura baixa (4 a 26°C), pequena exposição ao sol e presença de creatinina, ácido úrico e purinas, assimiladas como fonte de nitrogênio (CASADEVALL & PERFECT, 1998). Todavia, vários estudos demonstraram a ausência de *C. neoformans* no trato intestinal do pombo, inibido pela microbiota bacteriana intestinal e alta temperatura corporal, que varia de 41 a 43°C (EMMONS, 1955; LITTMAN & BOROK, 1968).

Dentre os estudos realizados no Brasil direcionados ao isolamento de *C. neoformans* em excretas de pombos, merecem destaque: o estudo realizado por MACHADO et al. (1993), que pesquisaram a história epidemiológica de 42 pacientes com criptococose relacionada ao manuseio de locais habitados por pombos no Rio Grande do Sul. Os pesquisadores verificaram que, uma das amostras isoladas do líquido cefalorraquidiano de um dos pacientes (sorotipo A) coincidiu com o sorotipo do fungo isolado em um dos locais estudados, entretanto, estudos moleculares são necessários para comprovar a identificação desta possível fonte de infecção, uma vez que não há relatos precisos do local ou do momento em que os pacientes foram contaminados pelo fungo.

FRANZOT et al. (1997) estudaram a epidemiologia molecular de 15 cepas ambientais de *C. neoformans* var. *neoformans* isoladas de excretas de pombos, sendo 14 cepas isoladas na cidade de Belo Horizonte e 1 cepa isolada da cidade do Rio de Janeiro e ambas apresentaram similaridade entre os perfis moleculares analisados.

MONTENEGRO & PAULA (2000) isolaram *C. neoformans* var. *neoformans* sorotipo A e AD em excretas de pombos e *C. neoformans* var. *gattii* sorotipo C em materiais de eucaliptos dos parques municipais da cidade de

São Paulo. Os autores verificaram uma positividade para a variedade *neoformans* de 21% entre 38 locais com acúmulos de fezes de pombos, no período de um ano. A variedade *gattii* foi isolada no período de dois anos, em duas ocasiões diferentes, ambas no mês de novembro.

BARONI (2001) avaliou a contaminação por *C. neoformans* na cidade do Rio de Janeiro, a partir de excretas de pombos coletadas interna e externamente em igrejas. O estudo permitiu detectar a presença de *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipos A e D) em 18,75% das áreas externas e em 34,24% das áreas internas dos locais estudados.

Estudos realizados na África, Ásia, Austrália, Europa, América do Norte, América do Sul, Caribe e nas Ilhas do Pacífico reportaram também o isolamento ocasional de *C. neoformans* var. *neoformans* em solo, árvores, frutas, vegetais, ar, ar condicionado, poeira doméstica, leite, fezes de morcegos, conteúdo digestivo de baratas e fezes de outras espécies de aves, ambas relacionadas a áreas potencialmente contaminadas por excretas de pombos (CASADEVALL & PERFECT, 1998).

O mecanismo de contaminação das excretas é incerto. ELLIS & PFEIFFER (1990) sugerem que *C. neoformans* var. *neoformans* tem como habitat natural plantas específicas, como cereais, que especialmente os pombos utilizam como alimento. De acordo com CASADEVALL & PERFECT (1998) não está esclarecido se os isolados do solo originam-se do solo ou se são um reflexo da contaminação com excretas de aves positivas.

No Brasil, existem relatos de *C. neoformans* var. *neoformans* isolados de madeira em decomposição de ocos de árvores tropicais. Recente estudo, mostrou o isolamento da variedade *neoformans* em quatro tipos de árvores na cidade do Rio de Janeiro, dentre elas: *Syzygium jambolana*, *Cassia grandis*, *Senna multijuga* e *Ficus microcarpa* (LAZÉRA et al., 1998). No entanto, estudos futuros são necessários para esclarecer a relação da var. *neoformans* com fontes arbóreas em decomposição, uma vez que não foi provada, até o presente, a

ligação direta entre ambas, até porque é comum a permanência de pássaros em árvores e conseqüentemente a contaminação destas com as excretas de pombos, podendo haver discordância quanto a variedade.

MACEDO et al. (2001) demonstraram a relação de *C. neoformans* var. *neoformans* sorotipos A e D em *habitat* de tatu no estado do Piauí, área endêmica para coccidioidomicose e criptococose, da qual foram isoladas 4 cepas de *C. neoformans*, sendo que 2 apresentaram sorotipo A e duas sorotipo D. A presença de *C. neoformans* var. *neoformans* sorotipo D no semi-árido brasileiro sugere estudos mais profundos, uma vez que este sorotipo tem sido relacionado a casos clínicos em regiões de clima temperado, principalmente na Europa, sendo pouco descrito em regiões tropicais.

1.3. CRIPTOCOCOSE E EPIDEMIOLOGIA

Acredita-se que a criptococose é adquirida pela inalação dos basidiosporos produzidos pelo *C. neoformans* (forma sexuada), freqüentemente encontrados na natureza (LACAZ, 1991). *C. neoformans* presentes nas excretas de pombos dessecadas medem não mais que 1 µm de diâmetro, sendo portanto compatíveis ao tamanho dos alvéolos pulmonares humanos.

Segundo CASADEVALL & PERFCT (1998) as evidências de que os pulmões sejam a primeira via de infecção são poucas. Os autores sustentam a teoria de infecção pelas vias respiratórias, o isolamento do agente a partir do ar e o tamanho apropriado das partículas para adentrar aos alvéolos. Portanto a presença do agente no ar não implica que estes adentrem ou estabeleçam infecção alveolar. Tampouco as lesões pulmonares em pacientes com criptococose disseminada podem significar o resultado de uma infecção pela via respiratória, porém existem cepas clínicas de *C. neoformans* var. *neoformans* geneticamente relacionadas às cepas isoladas de excretas de pombos que sustentam a idéia de infecção pelas vias aéreas.

GARCIA-HERMOSO et al. (1999) acreditam que no organismo possa ocorrer uma forma latente culminante em infecção quando alterado o sistema imunológico.

A população mais atingida é representada pelos pacientes imunossuprimidos por doenças linfoproliferativas, transplantados, submetidos a esquemas de drogas imunossupressoras e, mais recentemente, pelos pacientes com infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) (LACAZ et al., 1991).

A criptococose ocupa o terceiro lugar entre as infecções causadas por fungos em doentes com síndrome da imunodeficiência adquirida (Aids). A sua prevalência varia de 3 a 6% na Europa, 6 a 10% nos Estados Unidos e 10 a 30% em países tropicais, particularmente na África (DUPONT et al., 1992). No Brasil, a criptococose representa 4,5% das infecções oportunistas que acometem os pacientes com Aids (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1999). No entanto, esse número está subestimado, uma vez que a criptococose não é de notificação obrigatória.

Estudos realizados no Brasil mostraram que 53 a 90% das amostras isoladas de *C. neoformans* eram provenientes de pacientes com Aids e destas 50 a 96% eram *C. neoformans* var. *neoformans* (ROZENBAUM & GONÇALVES, 1994; SANTANA et al., 1997) .

Diferenças epidemiológicas entre as variedades despertam a atenção no meio médico, já que *C. neoformans* var. *neoformans* é mais freqüente em pacientes imunodeprimidos, cujo grupo apresenta alta mortalidade, enquanto a variedade *gattii* afeta principalmente pacientes imunocompetentes (LEVITZ, 1991).

As causas da variação geográfica na prevalência da infecção não foram ainda elucidadas, mas podem refletir um histórico de recentes ou remotas exposições a fontes de infecção ou refletir, para CASADEVALL & PERFECT (1998) a suscetibilidade de uma população particular, exposição geográfica ou mesmo a metodologia micológica empregada.

1.4. IDENTIFICAÇÃO LABORATORIAL

1.4.1. Micromorfologia e Macromorfologia

Estudos quanto a morfologia de *C. neoformans* têm descrito o fungo como levedura esférica ou ovóide, medindo 3 a 8 μm , isolada ou em pequenos grupos, podendo apresentar brotamento único ou duplo em qualquer ponto da célula mãe (LACAZ et al., 1991).

Sua parede apresenta uma camada externa, formada por complexos monoprotéicos; uma camada intermediária, constituída de glucana e uma camada interna, de natureza protéica ou glicoprotéica. A membrana, de natureza lipídica, encontra-se aderida à parede e pode apresentar invaginações citoplasmáticas. O citoplasma contém o núcleo, além de mitocôndrias, ribossomos, retículo endoplasmático, vacúolos e granulações lipídicas refringentes ao microscópio óptico (AL-DOORY, 1971; BASTIDE & MALLIE, 1986).

A cápsula é melhor observada em preparações com tinta nanquim “Tinta da China” e é formada por polissacarídeos que têm como componente principal uma glicuronoxilomanana (GMX) (CHERNIAK et al., 1980) e, em menores concentrações uma galactoxilomanana (GalMAX) (CHERNIAK et al., 1982) e uma manoproteína (MP) (TURNER et al., 1984). Dos três componentes da cápsula, a GXM e a MP têm efeitos no sistema imune.

O cultivo do gênero *Cryptococcus* é feito em ágar Sabouraud dextrose e/ou extrato de malte a 25°C, durante 48 a 72 horas, e suas colônias apresentam-se brilhantes, viscosas e úmidas com tonalidade creme (LACAZ et al., 1991).

Para identificar a espécie *neoformans* do gênero *Cryptococcus* é utilizado meio de *Guizotia abyssinica*, no qual as colônias de *C. neoformans* produzem pigmento escuro em contraste com outras leveduras (STAIB, 1962). Trabalhos subseqüentes demonstraram que *C. neoformans* pode produzir grandes quantidades de pigmentos solúveis em meios contendo para-difenóis como substrato, embora outras espécies do gênero possam ocasionalmente produzir melanina a partir de difenóis específicos (SHAW & KAPICA, 1972; WILLIAMSON, 1994, WILLIAMSON et al., 1998).

1.4.2. Bioquímica

C. neoformans apresenta as seguintes características fisiológicas: crescimento a 37°C, sensibilidade a cicloheximida, produção de urease, formação de pigmento marrom em meio de Staib, não utilização de nitrato de potássio, assimilação de açúcares, não fermentação de carboidratos e patogenicidade para animais (COOPER & SILVA-HUNTER, 1985).

A virulência de *C. neoformans* tem sido associada ao seu crescimento a 37°C, à presença de cápsula e à produção de melanina (BULMER et al., 1967; RHODES et al., 1982; KWON-CHUNG & RHODES, 1986; WANG & CASADEVALL, 1994; WANG et al., 1995). Outras pesquisas têm demonstrado também fatores relacionados à virulência como “*mating type*”, produção de manitol, superóxido desmutase, proteases, fosfolipase, ácido N-acetil neuramínico e presença do gene de calcineurina (BRUESKE, 1986; WONG et al., 1990; KWON-CHUNG et al., 1992; JACOBSON et al., 1994; CHATUVERDI et al., 1996; CHEN et al., 1997; ODOM et al., 1997; RODRIGUES et al., 1997)

1.4.3. Identificação das variedades e sorotipos

KAPLAN et al. (1981) utilizaram a prova de aglutinação para realizar a sorotipagem de *C. neoformans* em cultivos e a técnica de anticorpos fluorescentes em tecidos fixados.

KWON-CHUNG et al. (1982) descreveram um meio de cultivo à base de L-canavanina, glicina e azul de bromotimol (CGB) e verificaram que todas as amostras de *C. neoformans* var. *gattii* utilizavam a glicina como fonte de carbono e nitrogênio, resistindo à L-canavanina (análogo da arginina). Uma glicina Descarboxilase foi detectada nos extratos celulares. A amônia liberada durante a clivagem da glicina é a responsável pela reação positiva e o indicador torna o meio azul-cobalto em *C. neoformans* var. *gattii* (sorotipos B e C), o que não ocorre com *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipos A e D). Este meio de

cultura mostrou-se superior a outros dois (GCP e CDB) estudados, respectivamente, por KWON-CHUNG et al. (1978) e SALKIN & HURD (1982), pois em mais de 500 amostras examinadas de *C. neoformans* nenhum falso resultado foi obtido, diferenciando nitidamente as duas variedades.

A eletroforese isoenzimática em gel de amido também foi utilizada para diferenciar os sorotipos de *C. neoformans* (SAFRIN et al., 1986).

DUFAIT et al. (1987) reportaram que as duas variedades de *C. neoformans* podem ser diferenciadas pela capacidade de *C. neoformans* var. *gattii* utilizar a D-prolina como única fonte de carbono.

DROMER et al. (1993) determinaram as variedades de isolados clínicos de *C. neoformans* usando o meio de CGB e os sorotipos por imunofluorescência direta, usando anticorpo monoclonal específico para o polissacarídeo capsular (E1) e concluíram que o método é rápido e confiável, uma vez que cepas sorotipadas previamente como AD foram facilmente classificadas como A ou D. Contudo o significado epidemiológico do sorotipo AD ainda não foi estabelecido.

BELAY et al. (1996) descreveram um método de sorotipagem de *C. neoformans* baseado na análise direta do sobrenadante de cultivos, utilizando anticorpos monoclonais específicos anti *C. neoformans* e fatores séricos policlonais, para detectar o principal antígeno capsular tipo-específico, GMX, e verificaram que o primeiro foi mais uniforme, permitindo dados mais fáceis de interpretar, do que os obtidos com os fatores séricos. Desse fato, conclui-se que isolados de *C. neoformans* podem ser identificados e diferenciados quanto à variedade e ao sorotipo sem purificação de antígenos.

Recente estudo molecular reportou uma significativa diferença genética entre os sorotipos A e D, descrevendo como nova variedade *C. neoformans* var. *grubii*, para isolados sorotipo A (FRANZOT et al., 1999).

BOEKHOUT et al. (2001) analisaram a estrutura genética e epidemiológica de *C. neoformans* e propuseram a existência de duas espécies biológicas distintas para a levedura: *C. neoformans* var. *neoformans* e *C. neoformans* var. *grubii* com o estado sexual *F. neoformans* e *C. bacillisporus*, sinônimo da variedade *gattii*, com o estado sexual *F. bacillispora*.

1.5. TIPAGEM MOLECULAR

Vários sistemas de tipagem molecular têm sido aplicados, de modo isolado ou combinado, ao estudo da epidemiologia molecular de *C. neoformans*, a fim de identificar cepas únicas de *C. neoformans* para ambas as fontes clínicas e ambientais e, em algumas circunstâncias, para determinar recaídas de verdadeiras infecções.

Estes sistemas incluem a análise de DNA cromossômico em gel através da eletroforese em campo pulsátil ("Pulsed Field Gel Electrophoresis" - PFGE); análise de DNA por polimorfismo do tamanho dos fragmentos gerados por enzimas de restrição ("Restriction Fragment Length Polymorphism" - RFLP); análise de DNA por técnicas baseadas em PCR ("Polymerase Chain Reaction"), sendo a mais usada a ampliação polimórfica aleatória ("Random Amplified Polymorphic DNA" - RAPD); tipagem eletroforética determinada pelo padrão de isoenzimas; variação alélica do locus URA 5; "fingerprinting" de DNA com sondas de DNA genômico, sondas de DNA mitocondrial e sondas de oligonucleotídeos homólogos a seqüências microsatélites; e mais recentemente a técnica de amplificação seletiva de fragmentos de DNA gerados por enzima de restrição ("Amplification Fragment Length Polymorphism" - AFLP).

Dentre os métodos de tipagem molecular mais utilizados, encontra-se a PFGE, que consiste em submeter o gel contendo DNA extraído do microrganismo à corrente elétrica que se alterna periodicamente, de acordo com a programação previamente estipulada, proporcionando a separação de moléculas de DNA maiores que 2.000 Kb, com excelente resolução (SCHWARTZ & CANTOR, 1984).

Existem diferentes sistemas de PFGE e todos possibilitando a resolução de moléculas de alto peso molecular. Dentre eles, o mais utilizado é o sistema "Contour-Clamped Homogeneous Electric Field Electrophoresis" (CHEF) (CHU et al., 1986).

Vários estudos sobre cariotipagem eletroforética (CE) usando PFGE tem demonstrado ser este um método útil e tecnicamente simples para distinguir cepas de leveduras, inclusive *C. neoformans* (PERFECT et al., 1989; PERFECT et al., 1993; SPITZER et al., 1993; BARCHIESE et al., 1995; FRIES et al., 1996; FRANZOT et al., 1997; CALVO et al., 2001).

O primeiro estudo da cariotipagem em *C. neoformans* foi desenvolvido por POLACHEK & LEBENS (1989). Estes autores fizeram uso do “Orthogonal Field Alternating Gel Electrophoresis” (OFAGE) e demonstraram a presença de 9 bandas de cromossomos em *C. neoformans* var. *gattii* e 8 bandas em *C. neoformans* var. *neoformans*, além de observarem que entre amostras do sorotipo D, existiam vários padrões de bandejamento.

PERFECT et al. (1989) utilizando o sistema CHEF de eletroforese, referiram que o tamanho dos cromossomos de 7 cepas de *C. neoformans*, cuja fonte de isolamento não foi referida, foi similar aos cromossomos de *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans*. Do total das cepas analisadas verificou-se que o número de bandas cromossômicas variou de 10 a 12 e que cada cepa apresentou um padrão único e reprodutível de bandas.

PERFECT et al. (1993) investigaram o perfil de CE de *C. neoformans* var. *neoformans*, utilizando o sistema CHEF, na epidemiologia das infecções por *C. neoformans*. As cepas clínicas foram isoladas de pacientes com e sem infecção pelo HIV, incluindo-se entre os infectados os casos da Tanzânia (África) e as cepas ambientais foram isoladas de solo, excretas de pombos e morcegos da Carolina do Norte e Ohio (EUA). Cerca de 90% das cepas clínicas e ambientais mostraram um padrão único por PFGE, porém não foi verificado um padrão associado à localização da infecção, área geográfica ou presença de infecção por HIV. Os perfis de CE de cepas individuais se mantiveram estáveis durante a infecção “*in vivo*” e a passagem “*in vitro*”.

A combinação de análise por RFLP e CE foi utilizada por SPITZER et al. (1993) para determinar a causa de recorrências de meningites criptocócicas. O estudo verificou que a CE foi mais sensível que o método de RFLP para discriminar isolados clínicos de *C. neoformans*.

CURRIE et al. (1994) realizaram estudo comparativo entre isolados ambientais e clínicos de *C. neoformans*, da cidade de Nova York, utilizando a técnica de RFLP. Os autores observaram uma diversidade genética dos isolados coletados de uma área restrita, além de observarem em uma amostra de excretas de pombo, dois diferentes padrões de RFLP. Entre as amostras clínicas isoladas de pacientes com Aids cada paciente foi infectado por uma única amostra, cada uma delas exibindo diferentes padrões de RFLP, embora apenas duas dessas amostras tiveram padrões compatíveis com os modelos isolados do ambiente.

BARCIESE et al. (1995) estudou 13 isolados clínicos de *C. neoformans* de oito pacientes com Aids, na Itália, utilizando CE pelo sistema CHEF. Do total dos pacientes estudados, três foram selecionados para realizar a análise seqüencial. A CE permitiu a separação de 9 a 12 bandas de cromossomos, os quais apresentaram tamanhos menores e maiores de 750 Kb e 1,900 Kb, respectivamente, demonstrando ampla variação genética. Em um dos isolados estudados seqüencialmente, a segunda amostra revelou perfil eletroforético diferente do perfil da primeira e da terceira amostra que foram idênticas. Esse achado poderia ser explicado por uma infecção mista no início.

FRIES et al. (1996) estudaram os cariótipos de 32 isolados clínicos e 3 ambientais de *C. neoformans* da cidade de Nova York pelo sistema CHEF e observaram pequenas diferenças nos cariótipos entre isolamentos seqüenciais de 50% dos pacientes estudados, sugerindo a reorganização "*in vivo*". Esta hipótese foi testada por meio de estudo antes e depois da passagem em camundongos de 3 isolados clínicos e 3 ambientais, dos quais um dos isolados clínicos e dois dos ambientais apresentaram cariótipos eletroforéticos diferentes depois da passagem em camundongos. Esses autores concluíram que havia alta freqüência de diferenças do cariótipo eletroforético entre isolamentos seqüenciais de pacientes individuais, sugerindo que alguns padrões predominam em estágios tardios, possivelmente como resultado da seleção durante a infecção humana e ocorrência de mudanças no cariótipo eletroforético durante a infecção experimental em camundongos.

Isso sugere que este fato pode ter ocorrido devido à inclusão de cepas ambientais, ao uso de vários camundongos e à análise do cariótipo de múltiplas colônias recuperadas de animais infectados. Esse achados indicam que modificações dos cromossomos podem ocorrer durante a infecção, o que contrasta com o fato de que cariótipos eletroforéticos de *C. neoformans* têm se mantido estáveis durante passagens “*in vitro*”.

FRANZOT et al (1997) estudaram 51 isolados clínicos e ambientais de duas cidades brasileiras, Belo Horizonte e Rio de Janeiro, utilizando CE pelo sistema CHEF, polimorfismo do tamanho dos fragmentos gerados por enzimas de restrição de endonucleases (RFLPs) com elemento 1 repetitivo de *C. neoformans* (CNRE-1) e seqüências de URA-5. Os resultados foram comparados com iguais estudos realizados com isolados da cidade de Nova York, pelos mesmos métodos moleculares. Verificou-se que a análise da CE diferenciou 14 perfis e o número de cromossomos variou de 10 a 13. Alguns dos isolados brasileiros mostraram alto grau de similaridade com aqueles de Nova York, provavelmente, pela dispersão global de cepas patogênicas.

Recente estudo nacional, realizado por CALVO et al. (2001), utilizou o sistema CHEF para investigar o perfil de CE de 51 cepas de *C. neoformans* isoladas de pacientes com e sem infecção pelo HIV, na América Latina. Sendo 40 cepas *C. neoformans* var. *neoformans* isoladas no Brasil (25) , Venezuela (10) e Chile (5) e 11 cepas *C. neoformans* var. *gattii* isoladas no Brasil (8) e Venezuela (3). Foram relatados 18 perfis moleculares diferentes entre as 40 cepas de *C. neoformans* var. *neoformans*, sendo 9 observados entre as 25 cepas do Brasil, das quais dois perfis predominantes foram identificados também na Venezuela, que apresentou 4 perfis moleculares diferentes. As cepas *C. neoformans* var. *neoformans* isoladas no Chile apresentaram 5 perfis moleculares diferentes e únicos. Foram relatados 3 perfis moleculares diferentes de *C. neoformans* var. *gattii*, sendo que apenas um único perfil foi identificado entre as cepas isoladas no Brasil. Esses autores concluíram que isolados de *C. neoformans* var. *neoformans* apresentaram uma alta diversidade genômica em relação aos isolados de

C. neoformans var. *gattii* e que estudos futuros são necessários para avaliar a distribuição geográfica na epidemiologia molecular de *C. neoformans* na América Latina.

1.6. SUSCETIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS

Com o aumento das micoses sistêmicas e oportunistas nos últimos anos, incluindo a criptococose, torna-se necessário o estudo da suscetibilidade dos fungos a drogas antifúngicas, para uma terapêutica adequada.

As drogas de primeira escolha para o tratamento das infecções fúngicas graves, em especial a criptococose, são a anfotericina B (AMB), a 5-fluorocitosina (5-FC) e os derivados azólicos, como fluconazol (FLCZ) e itraconazol (ITCZ).

Em 1982, o NCCLS ("National Committee for Clinical Laboratories Standards"), comitê responsável pela padronização de todos os métodos utilizados em laboratórios clínicos, incluindo a área de microbiologia, nos Estados Unidos, criou um sub-comitê para discutir os testes de suscetibilidade de fungos a drogas antifúngicas. O objetivo foi desenvolver um método referência ou "*gold standard*" inicialmente para leveduras, devido a sua menor complexidade morfológica e também o seu predomínio como agentes de micoses.

Em 1985, o subcomitê publicou os primeiros resultados dos estudos colaborativos e constatou que os principais fatores responsáveis pela variabilidade nos resultados obtidos em diferentes laboratórios foi a composição do meio de cultivo, pH do meio, tempo e temperatura de incubação, tamanho do inóculo e critério de leitura.

Em 1992, o NCCLS divulgou o documento M27-P contendo uma proposta de padronização do teste de suscetibilidade de leveduras a drogas antifúngicas, segundo a metodologia da macrodiluição, método mais comumente utilizado, naquela ocasião, pelos Laboratórios de Referência em Micologia, nos

E.U.A. As principais características metodológicas deste teste referência são: meio RPMI-1640 com L-gutamina, tamponado com MOPS (ácido morfolinopropanosulfônico) a pH 7,0; inóculo contendo 0,5 a $2,5 \times 10^3$ células/mL padronizado por espectrofotometria e leitura após 48 horas (*Candida sp.*) e 72 horas (*Cryptococcus sp.*) de incubação à 35°C. O critério de leitura para AMB é a concentração inibitória mínima (CIM) capaz de inibir completamente o crescimento do fungo. Com relação aos azóis e 5-FC, a CIM da droga é aquela capaz de inibir ao menos 80% do crescimento do fungo.

A macrodiluição representou importante avanço na credibilidade dos testes de avaliação “*in vitro*” das drogas antifúngicas, tanto pelas suas características de reprodutibilidade, quanto pela sua boa correlação clínica observada, no entanto é um método bastante trabalhoso e de difícil execução na rotina dos laboratórios clínicos.

Em 1997, o NCCLS aprovou o documento M27-A para teste de sensibilidade para antifúngicos, apresentando o método de microdiluição.

Desde então têm sido testadas metodologias mais adequadas para a rotina de laboratórios clínicos, como a microdiluição em caldo e o Etest®, ambos de fácil realização, além de permitirem a análise de grande número de amostras, com economia razoável de material.

Vários pesquisadores têm realizado ensaios para avaliar a correspondência dos resultados reproduzidos entre os métodos de macrodiluição, microdiluição e Etest®, e concluíram que os resultados obtidos são concordantes, inclusive quando são analisadas cepas de *C. neoformans* (ESPINEL-INGROFF et al., 1992; BARCHIESE et al., 1994; PFALLER et al., 1994; COLOMBO, 1994; COLOMBO et al., 1995; SHARON et al., 1996; WARNOCK et al., 1998; PFALLER et al., 1998, LOZANO-CHIU et al., 1998), exceto para CIMs de FLCZ frente ao método de Etest®, o qual mostrou diluições maiores que os valores encontrados para a microdiluição em caldo (CHEN et al., 1997; SIMOR et al., 1997) .

A criptococose representa importante micose oportunista de ocorrência grave, em especial em pacientes com Aids atendidos no HC-UNICAMP. Sendo assim, o presente estudo foi proposto com a finalidade de estudar o perfil genômico e de sensibilidade aos antifúngicos de espécimes clínicos e de isolados ambientais de *C. neoformans* na cidade e região de Campinas.



2. OBJETIVOS

- Estudar as variedades e os sorotipos de *C. neoformans* isolados de excretas de pombos e de espécimes clínicos da cidade e região de Campinas, São Paulo.
- Identificar e correlacionar os perfis moleculares de cepas clínicas e ambientais de *C. neoformans* da cidade e região de Campinas, São Paulo, através do estudo da tipagem molecular por cariotipagem eletroforética.
- Avaliar a suscetibilidade aos antifúngicos das cepas clínicas e ambientais de *C. neoformans* da cidade e região de Campinas, São Paulo.



3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. CEPAS DE *C. NEOFORMANS*

3.1.1. Isolamento e identificação de cepas ambientais de *C. neoformans*

Utilizando-se máscaras e luvas de proteção e portando espátulas e frascos plásticos, estéreis, de fácil vedação, foram realizadas 96 coletas de excretas secas de pombos, no período de agosto de 1999 a agosto de 2000, em 8 localidades públicas da cidade de Campinas, a saber: Hospital de Clínicas da UNICAMP (HC/UNICAMP), Igreja do Carmo, Mercado Central, Pontifícia Universidade Católica de Campinas / Campus II (PUCC II), Largo do Rosário, Parque Taquaral, Teatro Castro Mendes e Hospital Mario Gatti.

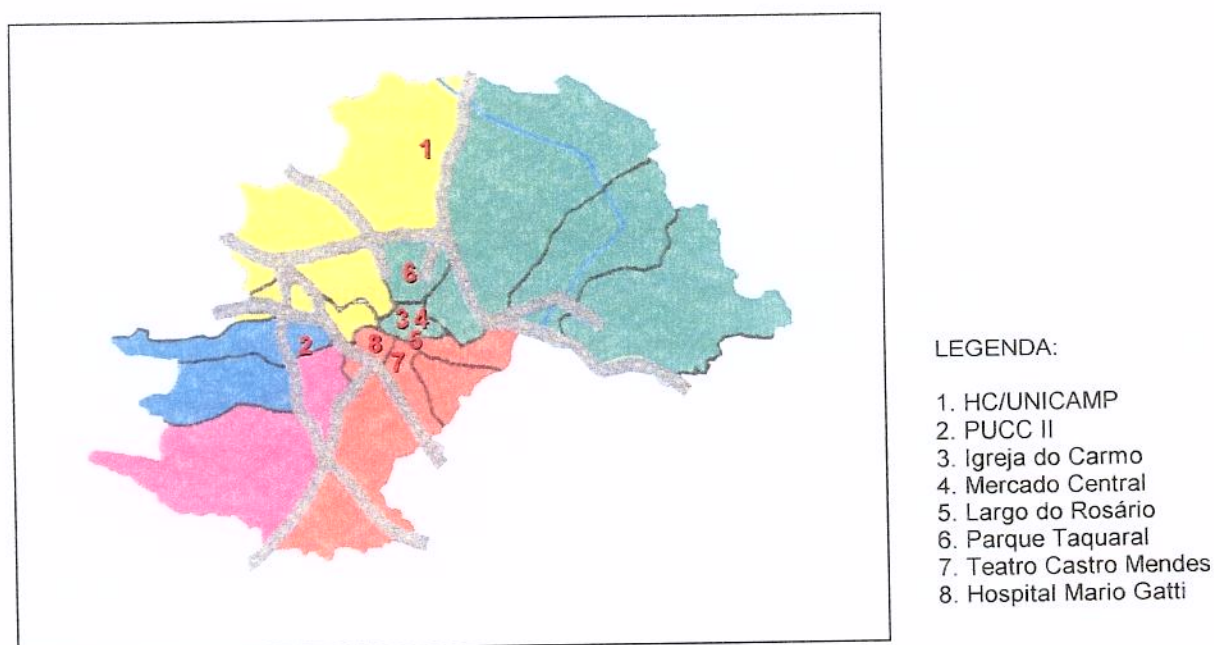


Figura 1: Locais de coletas ambientais de *C. neoformans* na cidade de Campinas.

Foi pesado 1 g de excretas de pombos de cada localidade pública. Em seguida, foi acrescentado 9 mL de salina estéril suplementada com penicilina (Sigma 10k0543) e estreptomicina (Sigma 58H0442), em uma concentração final

de 200 µg/mL. Após vigorosa agitação mecânica, 100 µL do sobrenadante foi semeado por esgotamento em placas de Petri contendo ágar “cornmeal” com ácido cafeico e incubadas a 30°C durante 3 a 15 dias (LI et al., 1993). O isolamento de *C. neoformans* foi realizado pelo crescimento de colônias de coloração marrom em meio “cornmeal” ágar com ácido cafeico. Posteriormente, cada colônia isolada foi repicada em ágar Sabouraud dextrose (ASD) e incubadas a 30°C por 48 a 72 horas (Anexo 6 e 8).

A confirmação da identificação de *C. neoformans* foi realizada através da observação da cápsula com Tinta da China e da prova da uréia, segundo LACAZ et al., 1991 (Anexo 6).

3.1.2. Confirmação da viabilidade, pureza e identificação das cepas clínicas de *C. neoformans*

Foram repicadas 145 isolados de *C. neoformans* que estavam estocados em água destilada estéril a temperatura ambiente, no período de 1996 a 2000, na Micoteca do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas da UNICAMP. Os isolados foram inoculados em ASD e incubados a 30°C durante 48 a 72 horas, para a confirmação da viabilidade e pureza.

Deste total, foram estudados 52 cepas de *C. neoformans* obtidas a partir da primeira amostra isolada de 52 pacientes de ambos os sexos, com ou sem infecção pelo HIV, procedentes da cidade e região de Campinas (SP). As amostras foram obtidas a partir de: líquido cefalorraquidiano (41), sangue (2), urina (2), biópsia pulmonar (2), lavado bronco alveolar (3), pele (1) e líquido ascítico (1) (Anexo 2 e 3).

Para a confirmação da identificação de *C. neoformans* as cepas foram repicadas em ágar “cornmeal” e incubadas a 30°C durante 3 a 6 dias, seguido da observação da cápsula com Tinta da China e da prova da uréia, segundo LACAZ et al., 1991.

Foram realizadas provas bioquímicas pelo sistema comercial API 20C AUX[®], para os isolados ambientais e clínicos, em casos de dúvida quanto a identificação do *C. neoformans*.

3.2. IDENTIFICAÇÃO DAS VARIEDADES DE *C. NEOFORMANS*

A identificação das variedades das cepas ambientais e clínicas de *C. neoformans* foi realizada empregando-se o meio de canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB). O inóculo correspondente a uma alça microbiológica (10 µL) foi semeado em meio CGB e incubado a temperatura de 25°C por 5 dias, para confirmação do seu crescimento e alteração da cor do meio amarelo-esverdeado para verde na variedade *neoformans* e azul cobalto na variedade *gattii* (KWON-CHUNG et al., 1982) (Anexo 6 e 8).

3.3. SOROTIPAGEM DE *C. NEOFORMANS*

A identificação dos sorotipos de *C. neoformans* foi feita através do teste comercial de aglutinação em lâmina ("Crypto Check" latron Co. Japão). Para cada cepa, foi realizado uma suspensão das células de *C. neoformans* de culturas 24 a 48 horas em ASD em 1 mL de água destilada estéril de acordo com a turbidez padronizada do tubo 3 da escala de Mc Farland. A seguir, uma gota de cada anti-soro foi colocado na placa de vidro apropriada para o teste. Posteriormente foi adicionado 30 µL da suspensão a cada um dos cinco anti-soros (controle positivo, A, D, B e C). Em seguida, a placa foi movimentada gentilmente de modo circular por 1 a 2 minutos. A leitura foi realizada através da visualização de aglutinação.

3.4. TIPAGEM MOLECULAR DE *C. NEOFORMANS*

O estudo do perfil de cariotipagem eletroforética das cepas ambientais e clínicas de *C. neoformans* foi realizado pela eletroforese em campo pulsado (PFGE), usando o sistema CHEF, segundo modificação do protocolo utilizado por FRANZOT et al., 1997:

3.4.1. Preparação do inóculo

Cinco a dez colônias de *C. neoformans* cultivadas em ASD a 30°C por 48 horas foram inoculadas em 20 mL do meio contendo extrato de levedura 1%, bactopectona 2% e dextrose 2%, e mantidas sob agitação a 30°C durante 18 horas (Anexo 6).

3.4.2. Preparação do DNA genômico

Após a preparação do inóculo as leveduras foram submetidas a 3 lavagens consecutivas com 5 mL de água destilada estéril a 4°C a 3.000 rpm por 15 minutos. Em seguida, 1 mL de água destilada estéril foi acrescentada às leveduras e após vigorosa homogeneização foram transferidas para um tubo eppendorf pré-pesado em balanças de alta precisão, o qual foi centrifugado a 12.000 rpm por 3 minutos. Após aspirar o sobrenadante, cuidadosamente, o tubo eppendorf com as leveduras sedimentadas foi pesado. Valor igual ao da diferença entre o tubo eppendorf pré-pesado e o tubo eppendorf com as leveduras, dado em μL , foi acrescentado de tampão 20 mM Citrato de Sódio, pH 5,6; 50 mM EDTA, pH 8,0 e 0,9 M Sorbitol. Em seguida, uma alíquota de 200 μL desta mistura foi transferida para outro tubo eppendorf, acrescido de 100 μL do mesmo tampão e 1 mg da enzima *Trichoderma harzianum* (Sigma L 2265), o qual foi incubado em banho-Maria a 37°C por 2 a 3 horas. Posteriormente, adicionou-se 240 μL de agarose "low melt" 2% e transferiu-se para moldes Bio-Rad®, refrigerados a 4°C durante 40 minutos. Os blocos contendo DNA foram removidos dos moldes e mantidos a 50°C durante 18 horas em 2 mL de tampão Tris 0.01 M, pH 7,5; EDTA 0.45 M, pH 8,0, Lauroylsarcosine 1% e 0,25 mg/mL de Proteínase K. Posteriormente, foram submetidos a 4 lavagens consecutivas com 3 mL de 50 mM EDTA, pH 8,0 durante 15 a 60 minutos (Anexo 6).

3.4.3. Cariotipagem eletroforética (CE)

Foi realizada pelo sistema CHEF DR-III em 2.200 mL de tampão TBE 0.5X, com intervalos de incidência da corrente elétrica no gel de agarose 1% de 60 a 120 segundos por 24 horas, em um ângulo de 120°, voltagem de 6.0V e 14°C. Finalizada a corrida, o gel foi corado com solução de brometo de etídio, durante 30 minutos e fotografado com filme Polaroid em luz ultravioleta.

3.4.4. Análise dos resultados da CE

A determinação dos perfis moleculares foi realizada pela comparação visual das bandas de DNA genômico de *C. neoformans*, coradas com brometo de etídio, com o padrão de peso molecular *Saccharomyces cerevisiae* (Anexo 8).

A similaridade entre os perfis moleculares das cepas clínicas e ambientais de *C. neoformans* foi demonstrada pelo coeficiente de DICE (com intervalo de confiança de 95%), através dos programas Bio-1D e BioGene V (Vilber Lourmat, Marnes la Valle, França).

3.5. AVALIAÇÃO DA PADRÃO DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS DE *C. NEOFORMANS*

3.5.1. Microdiluição em Caldo

O estudo do padrão de suscetibilidade aos antifúngicos das cepas ambientais e clínicas de *C. neoformans* foi realizado através da técnica de microdiluição em caldo, segundo o documento M27-A do NCCLS.

3.5.1.1. Cepa-controle

Para cada ensaio foi testado *Candida parapsilosis* ATCC 22019, tendo seus resultados de CIM comparados com os valores estabelecidos pelo NCCLS. Não havendo concordância com estes dados, todo o lote foi desprezado.

3.5.1.2. Microrganismos

Foram submetidas ao teste de suscetibilidade pelo método da microdiluição em caldo, segundo o NCCLS, 107 cepas ambientais e clínicas isoladas na cidade de Campinas e região.

3.5.1.3. Meio de Cultivo

Foi utilizado o meio RPMI-1640 com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio, tamponado com MOPS (ácido morfolinopropanosulfônico) a pH 7,0 e dextrose a 2%, o qual foi esterilizado em filtro biológico e conservado sob refrigeração a 4°C (Anexo 6).

3.5.1.4. Antifúngicos avaliados

Foram estudados os perfis de suscetibilidade a AMB (Sigma, 11K4031), 5-FC (Pfizer Pharmaceutica Incorporation, 51K4021), FLCZ (Pfizer Pharmaceutica Incorporation, F003025) e ITCZ (Jansen Pharmaceutica, Japão).

3.5.1.5. Preparação das soluções estoque e trabalho

A solução estoque de cada antifúngico foi preparada na concentração de 12,8 mg/mL em DMSO (dimetil sulfóxido) e armazenada em alíquotas de 100 mL a -70°C. A solução trabalho foi preparada a partir da diluição 1:10 da solução estoque em meio RPMI-1640 e posterior diluição de 1:5 no meio RPMI-1640, a fim de se obter dez diluições que variaram de 0,06 a 32 µg/mL para a AMB; 0,25 a 128 µg/mL para a 5-FC; 0,25 a 128 µg/mL para o FLCZ; e 0,03 a 16 µg/mL para o ITCZ. Posteriormente, alíquotas de 100 µL foram dispensadas, com auxílio de uma pipeta multicanal, nas placas de microtitulação, as quais foram armazenadas a -70°C até sua utilização (Anexo 7).

A suspensão trabalho do antifúngico foi preparada com a finalidade de obter o dobro da concentração final desejada, uma vez que será posteriormente adicionada a igual volume de solução contendo o inóculo na placa de microtitulação.

3.5.1.6. Inóculo

A suspensão inicial do inóculo foi preparada a partir de dois repiques consecutivos em ASD a 35°C por 48 horas, do qual cinco colônias maiores ou iguais a 1 mm de diâmetro foram suspensas em 5 mL de solução salina estéril (0,85%) e agitadas por 15 segundos em agitador mecânico.

A partir da suspensão inicial do inóculo foi feita uma diluição 1:50 em solução salina estéril (0,85%) e posterior diluição de 1:20 em meio RPMI-1640, da qual realizou-se a contagem do número de células em câmara de Thoma, a fim de obter 1 a 5×10^3 colônias/mL, denominada suspensão trabalho do inóculo (Anexo 7). A suspensão trabalho do inóculo foi preparada com a finalidade de obter o dobro da concentração final desejada, uma vez que será posteriormente adicionada a igual volume de solução contendo droga antifúngica na placa de microtitulação.

3.5.1.7. Procedimento do teste de microdiluição em caldo

Foi realizado em placas de microtitulação estéril, com fundo em U, contendo 8 séries identificadas de A a H, cada qual com 12 poços (total de 96 poços) (CELLSTAR® 650180). Em cada fileira, além das 10 diferentes concentrações de cada antifúngico testado, em duplicata, foi adicionado um controle negativo e um controle positivo. As placas de microtitulação contendo os antifúngicos foram retiradas da temperatura de - 70°C e mantidas a 35°C por 30 minutos. Posteriormente alíquotas de 100 µL da suspensão trabalho do inóculo

foram dispensadas em seqüência na placa de microtitulação, com auxílio de uma pipeta multicanal, com exceção do controle negativo. As placas de microtitulação foram incubadas a 35°C por 72 horas.

3.5.1.8. Leitura

Antes da leitura, as placas foram colocadas por cinco minutos em agitador orbital. Para a leitura do teste, as placas de microtitulação foram colocadas em suporte contendo espelho, o qual permitiu a observação clara do reverso das mesmas, possibilitando assim comparar o crescimento das diferentes concentrações testadas com o obtido no controle positivo. A determinação das CIM para AMB foi feita pela total inibição do crescimento, enquanto para a 5-FC e derivados azólicos pela menor concentração da droga capaz de inibir 80% do crescimento das amostras testadas (Anexo 8).

3.5.2. Análise dos resultados

Os resultados de CIMs obtidas pela microdiluição em caldo foram analisadas, segundo 3 características de distribuição:

- Variação dos valores: representando os limites inferior e superior das CIMs de cada droga;
- CIM₅₀: definida como a concentração inibitória mínima da droga capaz de inibir o crescimento de 50% das amostras testadas;
- CIM₉₀: definida como a concentração inibitória mínima da droga capaz de inibir o crescimento de 90% das amostras testadas.



4. RESULTADOS

4.1. VARIEDADES E SOROTIPOS

4.1.1. Cepas ambientais de *C. neoformans*

Foram isoladas 55 cepas de *C. neoformans* var. *neoformans* sorotipo A de excretas de pombos na cidade de Campinas. Deste total, 28 cepas (51%) foram isoladas do HC-UNICAMP, 18 cepas (33%) da Igreja do Carmo, 5 cepas (9%) da PUCC II e 4 cepas (7%) do Mercado Central (Anexo 1).

4.1.2. Cepas clínicas de *C. neoformans*

Das 52 cepas clínicas de *C. neoformans* estudadas, 45 (86%) cepas foram identificadas como *C. neoformans* var. *neoformans* sorotipo A e 7 (14%) cepas como *C. neoformans* var. *gattii* sorotipo B.

Verificou-se que, das 45 (86%) cepas de *C. neoformans* var. *neoformans* sorotipo A, 33 (63%) foram isoladas de pacientes do sexo masculino e 12 (23%) de pacientes do sexo feminino, sendo 35 (67%) de pacientes com infecção pelo HIV e 10 (19%) de pacientes sem infecção pelo HIV. Das 7 (14%) cepas de *C. neoformans* var. *gattii* sorotipo B, 6 (12%) foram isoladas de pacientes do sexo masculino e 1 (2%) de pacientes do sexo feminino, sendo 2 (4%) de pacientes com infecção pelo HIV e 5 (10%) de pacientes sem infecção pelo HIV (Tabela 1).

Tabela 1: Distribuição das variedades e sorotipos de cepas clínicas de *C. neoformans*, isoladas de 52 pacientes internados no HC-UNICAMP, segundo sexo e presença ou ausência de infecção pelo HIV.

	masculino		feminino		Total
	HIV+ (%)	HIV - (%)	HIV+ (%)	HIV - (%)	
var. <i>neoformans</i> sorotipo A	27 (52)	6 (11)	8 (15)	4 (8)	45 (86)
var. <i>gattii</i> sorotipo B	1 (2)	5 (10)	1 (2)	-	7 (14)
Total	28 (54)	21 (21)	9 (17)	4 (8)	52 (100)

4.2. TIPAGEM MOLECULAR

4.2.1. Cepas ambientais de *C. neoformans*

Foram identificados 5 perfis genômicos entre as 55 cepas ambientais de *C. neoformans* var. *neoformans* sorotipo A. Trinta e cinco cepas (64%) apresentaram perfil I, sendo que 19 cepas (35%) foram isolados no HC-UNICAMP e 16 cepas (29%) na Igreja do Carmo. O perfil II foi encontrado em 9 cepas (16%) isoladas do HC-UNICAMP, o perfil III em 2 cepas (4%) isoladas da Igreja do Carmo, o perfil IV em 5 cepas (9%) isoladas da PUCC II e o perfil V em 4 cepas (7%) isoladas do Mercado Central (Tabela 2).

A CE dos 5 perfis ambientais de *C. neoformans* var. *neoformans* sorotipo A permitiu a separação de 6 a 8 bandas de cromossomos, sendo que a menor e a maior apresentam 680 e 2,200 Kb, respectivamente (Figura 2). Verificou-se uma similaridade de 98% entre os perfis IV, III e II; 90% entre os perfis V, IV, III e II; 71% entre os perfis V, IV, III, II e I (Figura 3).

Tabela 2: Diversidade genômica dos 5 perfis de *C. neoformans* var. *neoformans* sorotipo A, isoladas de excretas de pombos, de acordo com a localização na cidade de Campinas.

Perfil	Local	n ° cepas	(%)
I	Hospital de Clínicas - UNICAMP	19	(35)
	Igreja do Carmo	16	(29)
II	Hospital de Clínicas - UNICAMP	9	(16)
III	Igreja do Carmo	2	(04)
IV	Pontifícia Universidade Católica - Campus II	5	(09)
V	Mercado Central	4	(07)
Total		55	(100)

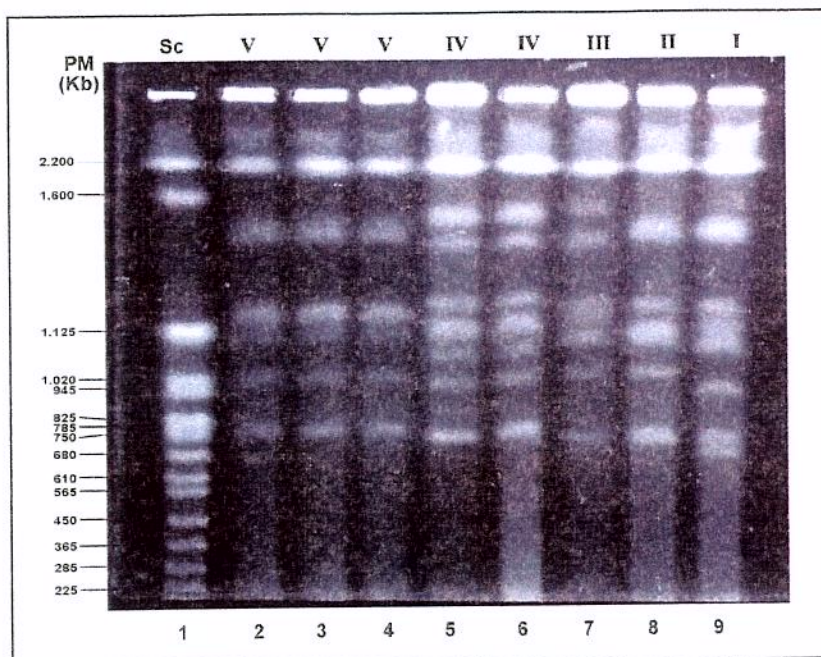


Figura 2: CE de *C. neoformans* var. *neoformans* sorotipo A isolados de excretas de pombos, na cidade de Campinas.

Canaleta 1: Sc - marcador de peso molecular *S. cerevisiae* (Bio-Rad laboratories)

Canaletas 2,3 e 4: perfil V isolados do Mercado Central de Campinas

Canaletas 5 e 6: perfil IV isolados da Pontifícia Universidade Católica de Campinas - Campus II

Canaleta 7: perfil III isolados da Igreja do Carmo

Canaleta 8: perfil II isolados do Hospital das Clínicas - UNICAMP

Canaleta 9: perfil I isolados do Hospital das Clínicas - UNICAMP e da Igreja do Carmo.

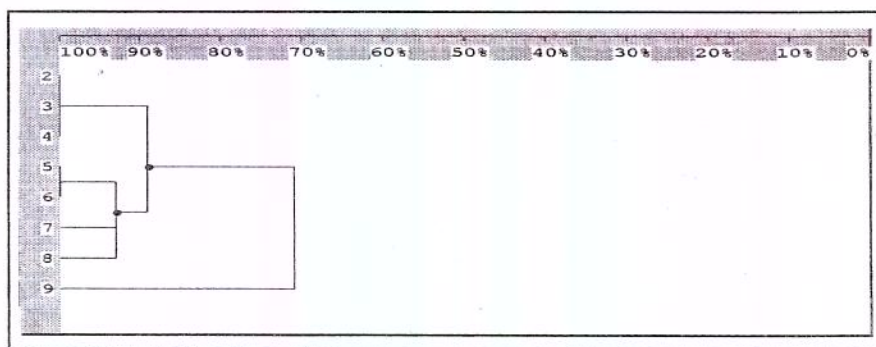


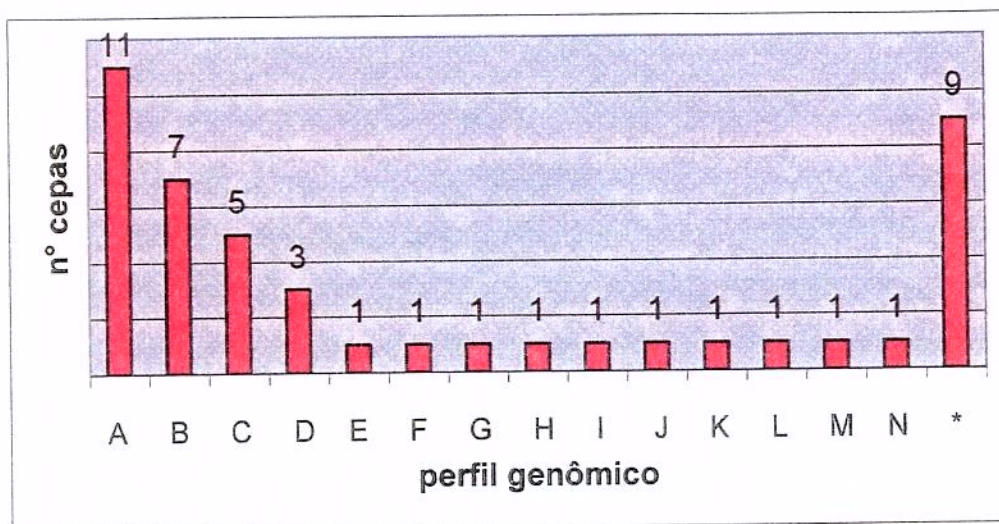
Figura 3: Dendrograma da figura 2. Os valores foram calculados pelo coeficiente de DICE (intervalo de confiança de 95%) e ilustra a similaridade entre os 5 perfis genômicos de *C. neoformans* var. *neoformans* sorotipo A, isolados de excretas de pombos, na cidade de Campinas.

4.2.2. Cepas clínicas de *C. neoformans*

4.2.2.1. Cepas clínicas de *C. neoformans* var. *neoformans* sorotipo A

Foram identificados 14 perfis genômicos entre 36 (80%) cepas clínicas de *C. neoformans* var. *neoformans* sorotipo A (Figura 5). Em 9 (20%) cepas não foi possível identificar o perfil genômico.

O perfil clínico predominante (A) foi identificado em 11 cepas, seguida dos perfis B, C e D identificados em 7, 5 e 3 cepas, respectivamente. Os demais perfis foram identificados em apenas uma única amostra. As frequências da distribuição dos 14 perfis genômicos de *C. neoformans* var. *neoformans* sorotipo A estão dispostas na figura 4.



Legenda:

* perfis moleculares não identificados

Figura 4: Frequência da distribuição de 45 cepas clínicas de *C. neoformans* var. *neoformans* sorotipo A, de acordo com os perfis genômicos.

A CE dos 14 perfis clínicos de *C. neoformans* var. *neoformans* sorotipo A permitiu a separação de 6 a 9 bandas de cromossomos, sendo que a menor e a maior apresentaram 610 e 3,500 Kb, respectivamente, com exceção do perfil K (cepa 45) que apresentou uma banda de cromossomo de 295 Kb (Figura 5).

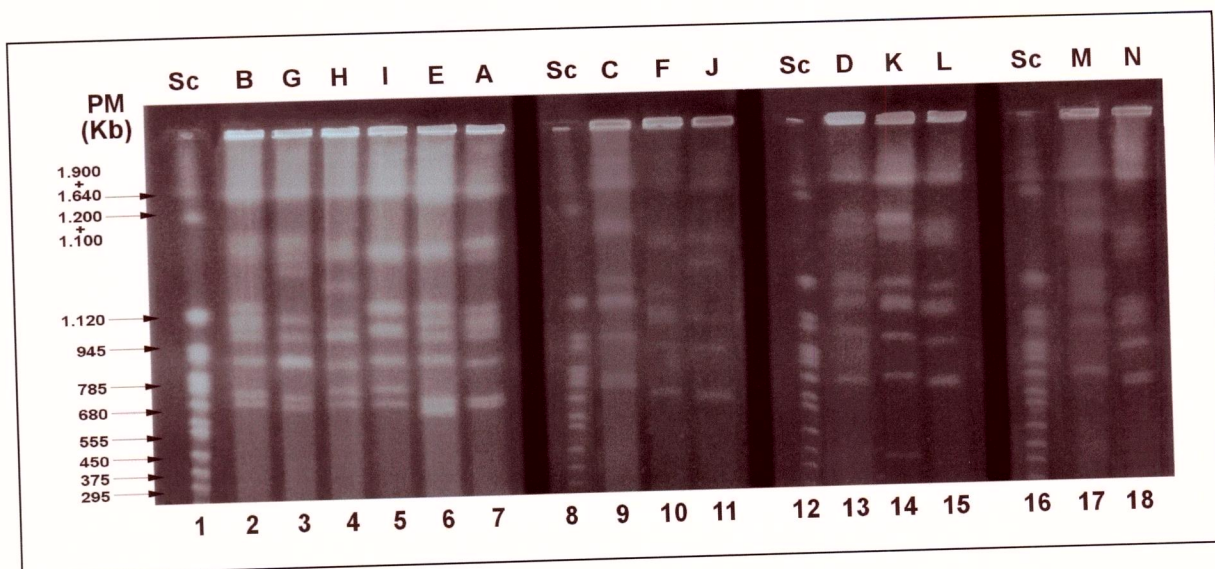


Figura 5: CE de *C. neoformans* var. *neoformans* sorotipo A, isolados de espécimes clínicos, da cidade e região de Campinas.

Canaletas 1, 8, 12, 16: Sc - marcador de peso molecular *S. cerevisiae* (New England Biolabs laboratories)

- Canaleta 2: perfil B isolado de pacientes HIV positivo e negativo
- Canaleta 3: perfil G isolado de paciente HIV positivo
- Canaleta 4: perfil H isolado de paciente HIV negativo
- Canaleta 5: perfil I isolado de paciente HIV positivo
- Canaleta 6: perfil E isolado de paciente HIV negativo
- Canaleta 7: perfil A isolados de pacientes HIV positivo e negativo
- Canaleta 9: perfil C isolados de pacientes HIV positivo e negativo
- Canaleta 10: perfil F isolado de paciente HIV positivo
- Canaleta 11: perfil J isolado de paciente HIV positivo
- Canaleta 13: perfil D isolado de paciente HIV positivo e negativo
- Canaleta 14: perfil K isolado de paciente HIV positivo
- Canaleta 15: perfil L isolado de paciente HIV positivo
- Canaleta 17: perfil M isolado de paciente HIV positivo
- Canaleta 18: perfil N isolado de paciente HIV positivo

A similaridade entre os 14 perfis genômicos das cepas clínicas de *C. neoformans* var. *neoformans* sorotipo A está disposta na figura 6. É importante relatar que os perfis clínicos C, F e J são diferentes, no entanto a análise computacional mostrou uma similaridade de 100% entre eles, o que nos permite concluir que o programa não consegue captar esta diferença.

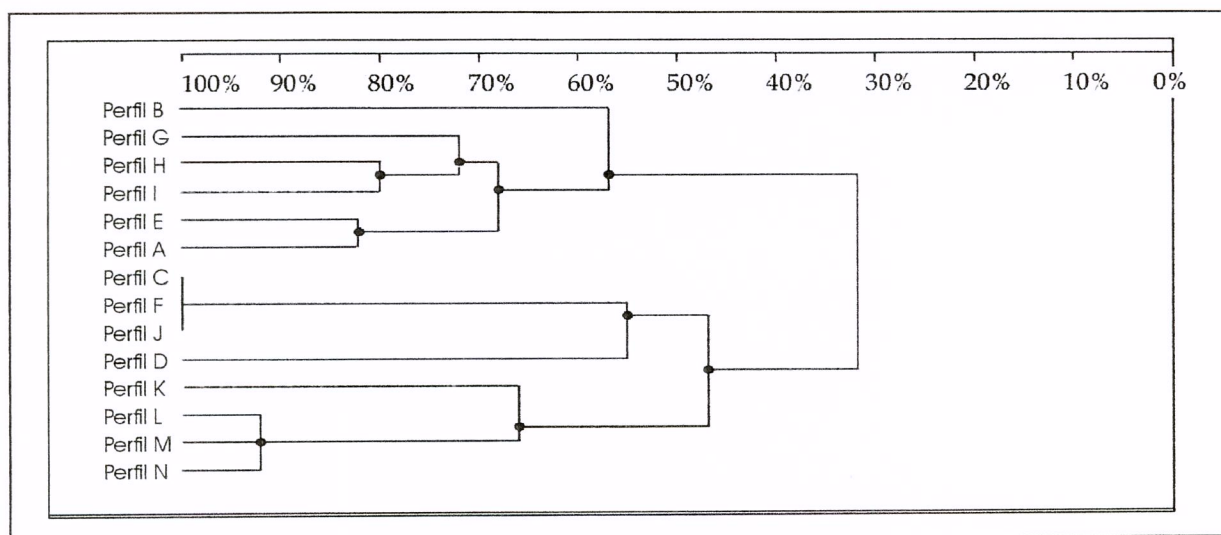


Figura 6: Dendrograma da figura 5. Os valores foram calculados pelo coeficiente de DICE (intervalo de confiança de 95%) e ilustra a similaridade entre os 14 perfis genômicos de *C. neoformans* var. *neoformans* sorotipo A, isolados de espécimes clínicos, da cidade e região de Campinas.

4.2.2.2. Cepas clínicas de *C. neoformans* var. *gattii* sorotipo B

As 7 cepas clínicas de *C. neoformans* var. *gattii* sorotipo B apresentaram perfil genômico (α) idêntico com 8 bandas de cromossomos, sendo que a menor e a maior apresentaram 565 e 2,200 Kb, respectivamente (Figura 7).

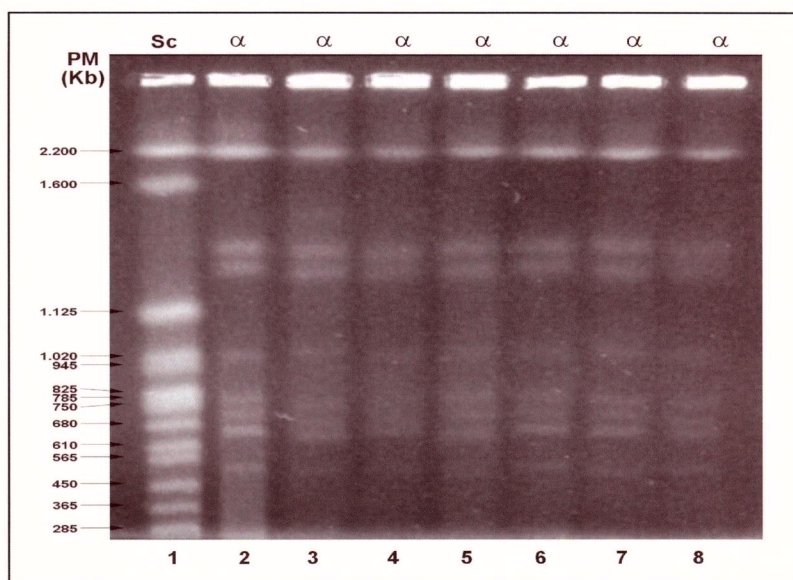


Figura 7: CE de *C. neoformans* var. *gattii* sorotipo B, isolados de espécimes clínicos, da cidade e região de Campinas.

Canaleta 1: Sc - marcador de peso molecular *S. cerevisiae* (Bio-Rad laboratories)

Canaletas 2 e 3: perfil α isolados de pacientes HIV positivo

Canaletas 4, 5, 6, 7 e 8: perfil α isolados de pacientes HIV negativo

4.2.3. Correlação entre os perfis moleculares clínicos e ambientais de *C. neoformans* var. *neoformans* sorotipo A

Do total de 14 perfis clínicos estudados, 6 mostraram-se similares aos 5 perfis ambientais (Figura 8). A CE verificou uma similaridade, de acordo com o coeficiente de DICE (intervalo de confiança de 95%), de 100% entre o perfil ambiental I e o perfil clínico E isolado de um único paciente HIV negativo, e entre o perfil ambiental II e o perfil clínico F isolado de um único paciente HIV positivo. Embora, o perfil ambiental III apresente visualmente uma pequena diferença entre o perfil clínico M, a análise computacional os classificou como idênticos. O perfil ambiental V mostrou similaridade de 92% entre os perfis II e F. O perfil clínico predominante (A) mostrou similaridade de 88% com os perfis I e E, enquanto o perfil ambiental IV mostrou-se diferente em relação a todos os perfis clínicos estudados, exceto para com o perfil D, no qual foi similar em 93% (Figura 9).

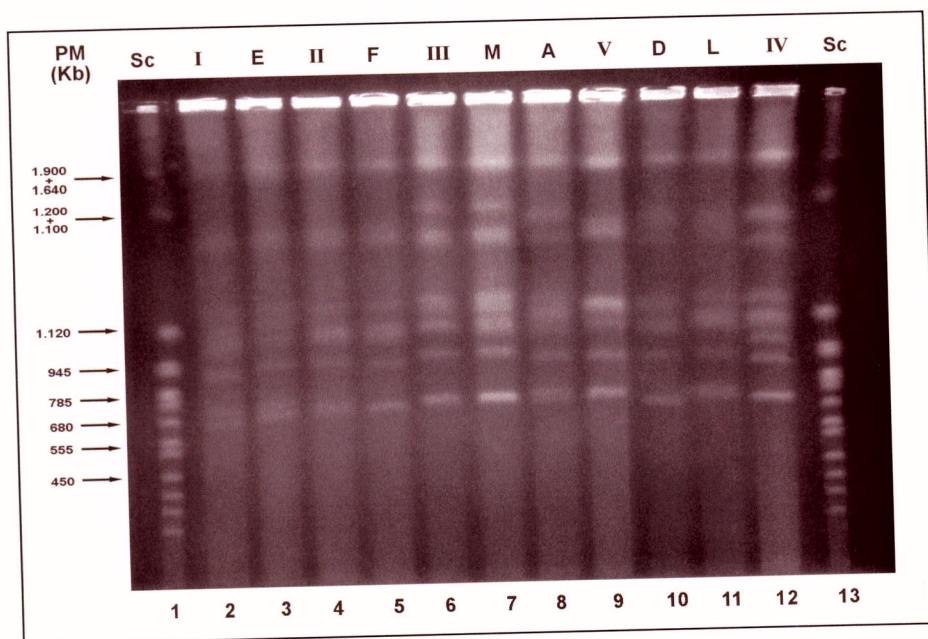


Figura 8: CE de *C. neoformans* var. *neoformans* sorotipo A, isolados de excretas de pombos e de espécimes clínicos, na cidade e região de Campinas.

Canaletas 1 e 13: Sc - marcador de peso molecular *S. cerevisiae* (New England Biolabs laboratories)

Canaletas 2, 4, 6, 9 e 12: perfis ambientais I, II, III, V e IV, respectivamente.

Canaletas 3, 5, 7, 8, 10 e 11: perfis clínicos E, F, M, A,, D e L, respectivamente

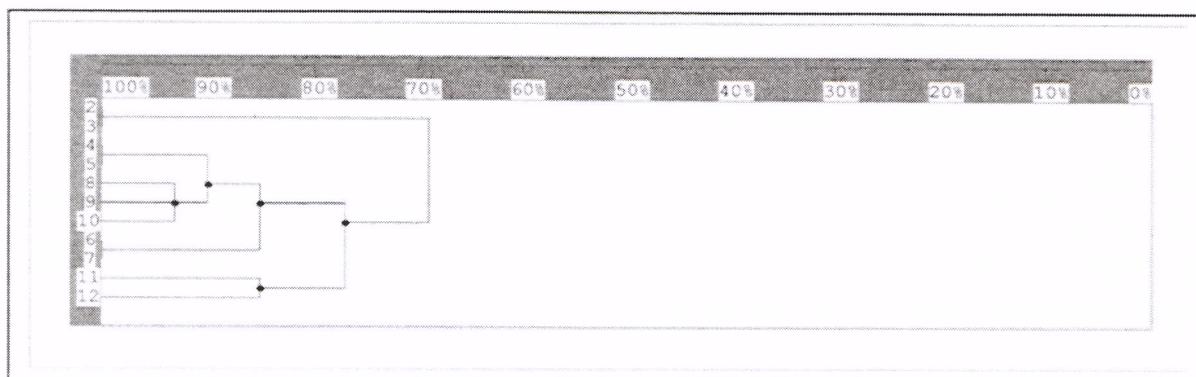


Figura 9: Dendrograma da figura 8. Os valores foram calculados pelo coeficiente de DICE (intervalo de confiança de 95%) e ilustra a similaridade entre os perfis genômicos de *C. neoformans* var. *neoformans* sorotipo A, isolados de excretas de pombos e de espécimes clínicos, na cidade e região de Campinas.

4.3. PERFIL DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS

4.3.1. Microdiluição em Caldo

Os resultados dos testes de suscetibilidade a antifúngicos para as 55 cepas ambientais e 52 cepas clínicas de *C. neoformans* estão, respectivamente, detalhadas nos Anexos 4 e 5.

Os valores de CIM obtidos pela cepa - controle *C. parapsilosis* ATCC 22019 estão representados na tabela 3, que segue abaixo:

Tabela 3: Variação das CIMs ($\mu\text{g/mL}$) de AMB, 5-FC, FLCZ e ITCZ, obtidas de cepa - controle *C. parapsilosis* ATCC 22019 e seus valores de referência.

Antifúngico	CIMs ($\mu\text{g/mL}$)	CIMs($\mu\text{g/mL}$)
	referência*	obtidas
	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019
AMB	0,25 - 1	1
5FC	0,125 - 0,5	0,125 - 0,25
FLCZ	2 - 8	2 - 4
ITCZ	0,06 - 0,25	0,125 - 0,25

* Definição segundo NCCLS documento M27-A

A variação dos valores de CIM para AMB foi de 0,5 a 1 µg/mL e para o ITCZ de 0,125 a 0,25 µg/mL, para ambas as cepas de *C. neoformans* estudadas. As cepas ambientais apresentaram CIM variando de 1 a 16 µg/mL para 5-FC e 2 a 8 µg/mL para FLCZ. As cepas clínicas de *C. neoformans* apresentaram CIM variando de 0,25 a 8 µg/mL para 5-FC e 0,25 a 16 µg/mL para FLCZ (Tabela 4).

A variação dos valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ para AMB foi de 1 µg/mL e para o ITCZ de 0,25 µg/mL, para ambas as cepas de *C. neoformans* estudadas. 5-FC apresentou CIM₅₀ de 1 µg/mL e CIM₉₀ de 2 µg/mL, para as cepas clínicas, e CIM₅₀ e CIM₉₀ de 2 µg/mL para as cepas ambientais. FLCZ apresentou CIM₅₀ e CIM₉₀ de 4 µg/mL para as cepas ambientais, e CIM₅₀ de 2 µg/mL e CIM₉₀ de 8 µg/mL para as cepas clínicas (Tabela 4).

Tabela 4: Atividade “*in vitro*” de 4 antifúngicos de 55 cepas ambientais e 52 cepas clínicas de *C. neoformans*, isoladas na cidade e região de Campinas.

Grupos de antifúngicos e cepas	n° cepa	CIM (µg/ mL)		
		variação	50%	90%
AMB				
Ambiental	55	0,5 - 1	1	1
Clínica	52	0,5 - 1	1	1
5FC				
Ambiental	55	1 - 16	2	2
Clínica	52	0,25 - 8	1	2
FLCZ				
Ambiental	55	2 - 8	4	4
Clínica	52	0,25 - 16	2	8
ITCZ				
Ambiental	55	0,125 - 0,25	0,25	0,25
Clínica	52	0,125 - 0,25	0,25	0,25

variação de CIM: relação de maior e menor valores de CIM

50%: valor de CIM da droga capaz de inibir 50% das cepas

90%: valor da CIM da droga capaz de inibir 90% das cepas

A variação dos valores de CIMs de AMB, 5-FC, FLCZ e ITCZ, segundo o número e a porcentagem de cepas ambientais e clínicas de *C. neoformans*, obtidas no presente estudo, estão detalhadas nas tabelas 5, 6, 7 e 8, respectivamente.

Tabela 5: Variação dos valores de CIM ($\mu\text{g/mL}$) para AMB, segundo o número de cepas ambientais e clínicas de *C. neoformans*.

CIM ($\mu\text{g/mL}$)	Ambiental		Clínico	
	n	%	n	%
AMB				
0,5	15	27	09	17
1	40	73	43	83
Total	55	100	52	100

n: número de cepas isoladas de *C. neoformans*

(%): porcentagem de cepas isoladas de *C. neoformans*

Tabela 6: Variação dos valores de CIM ($\mu\text{g/mL}$) para 5-FC, segundo o número de cepas ambientais e clínicas de *C. neoformans*.

CIM ($\mu\text{g/mL}$)	Ambiental		Clínico	
	n	%	n	%
5-FC				
0,25	-	-	01	02
0,5	-	-	07	13
1	20	36	30	58
2	31	56	10	19
4	03	06	03	06
8	-	-	01	02
16	01	02	-	-
Total	55	100	52	100

n: número de cepas isoladas de *C. neoformans*

(%): porcentagem de cepas isoladas de *C. neoformans*

Tabela 7: Variação dos valores de CIM ($\mu\text{g/mL}$) para FLCZ, segundo o número de cepas ambientais e clínicas de *C. neoformans*.

CIM ($\mu\text{g/mL}$) FLCZ	Ambiental		Clínico	
	n	%	n	%
0,25	-	-	01	02
0,5	-	-	-	-
1	-	-	02	04
2	18	33	22	42
4	33	60	18	35
8	04	07	07	13
16	-	-	02	04
Total	55	100	52	100

n: número de cepas isoladas de *C. neoformans* (%): porcentagem de cepas isoladas de *C. neoformans*

Tabela 8: Variação dos valores de CIM ($\mu\text{g/mL}$) para ITCZ, segundo o número de cepas ambientais e clínicas de *C. neoformans*.

CIM ($\mu\text{g/mL}$) ITCZ	Ambiental		Clínico	
	n	%	n	%
0,06	-	-	-	-
0,125	08	15	10	19
0,25	47	85	42	81
Total	55	100	52	100

n: número de cepas isoladas de *C. neoformans* (%): porcentagem de cepas isoladas de *C. neoformans*

A variação dos valores de CIMs ($\mu\text{g/mL}$) dos quatro antifúngicos avaliados, para as cepas de *C. neoformans* isolados de espécimes clínicos, segundo variedade e sorotipo e presença ou ausência de infecção pelo HIV, estão representados na tabela 9.

A variação dos valores de CIMs ($\mu\text{g/mL}$) de AMB, 5-FC, FLCZ e ITCZ, para as cepas de *C. neoformans*, isolados de excretas de pombos e de espécimes clínicos, segundo o perfil genômico e o número de cepas, estão respectivamente representados nas tabelas 10 e 11.

Tabela 9: Variação dos valores de CIM ($\mu\text{g/mL}$) de AMB, 5-FC, FLCZ e ITCZ, para *C. neoformans* isolados de espécimes clínicos, segundo variedade e sorotipo e presença ou ausência de infecção pelo HIV.

	<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>		<i>C. neoformans</i> var. <i>gattii</i>	
	HIV +	HIV -	HIV +	HIV -
Variação AMB	0,5 - 1	0,5 - 1	1	1
Variação 5-FC	0,25 - 4	0,5 - 2	1	1 - 8
Variação FLCZ	0,25 - 8	2 - 8	4 - 8	4 - 16
Variação ITCZ	0,125 - 0,25	0,125 - 0,25	0,25	0,125 - 0,25

HIV +: presença de infecção por HIV

HIV -: ausência de infecção por HIV

variação : relação de maior e menor valores de CIM

Tabela 10: Variação dos valores de CIM ($\mu\text{g/mL}$) de AMB, 5-FC, FLCZ e ITCZ, para *C. neoformans*, isolados de excretas de pombos, segundo o perfil genômico e o número de cepas.

Perfil ambiental	CIM ($\mu\text{g/mL}$)				n
	AMB	5-FC	FLCZ	ITCZ	
I	0,5 - 1	1 - 2	2 - 8	0,125 - 0,25	35
II	0,5 - 1	1 - 2	2 - 8	0,125 - 0,25	9
III	1	1	4	0,125 - 0,25	2
IV	0,5 - 1	1 - 16	2 - 4	0,25	5
V	1	1	2 - 4	0,25	4

n: número de cepas ambientais de *C. neoformans*

Tabela 11: Variação dos valores de CIM ($\mu\text{g/mL}$) de AMB, 5-FC, FLCZ e ITCZ, para *C. neoformans*, isolados de espécimes clínicos, segundo o perfil genômico e o número de cepas.

Perfil Clínico	CIM ($\mu\text{g/mL}$)				n
	AMB	5-FC	FLCZ	ITCZ	
A	0,5 - 1	0,5 - 4	2 - 8	0,125 - 0,25	11
B	0,5 - 1	0,5 - 4	1 - 4	0,125 - 0,25	7
C	0,5 - 1	1	2 - 8	0,125 - 0,25	5
D	0,5 - 1	1 - 2	2 - 4	0,125 - 0,25	3
E	1	1	2	0,25	1
F	0,5	1	2	0,125	1
G	1	1	2	0,25	1
H	0,5	2	2	0,25	1
I	1	1	2	0,125	1
J	1	1	2	0,25	1
K	1	1	4	0,25	1
L	0,5	1	4	0,25	1
M	0,5	1	2	0,25	1
N	1	2	4	0,25	1
**	0,5 - 1	0,25 - 2	0,25 - 8	0,125 - 0,25	9
α	1	1 - 8	4 - 16	0,125 - 0,25	7

n: número de cepas ambientais de *C. neoformans*

** : perfis clínicos de *C. neoformans* var. *neoformans* sorotipo A não identificados

α : *C. neoformans* var. *gattii*



5. DISCUSSÃO

Com o advento da Aids, nas décadas de 80 e 90, conferiu-se a importância do estudo do *C. neoformans*, levedura patogênica encontrada freqüentemente na natureza, caracterizada por promover a infecção fúngica oportunista denominada criptococose.

Estudos sobre a epidemiologia de *C. neoformans*, em vários países do mundo, têm assinalado o predomínio da variedade *neoformans* e o isolamento da variedade *gattii* em áreas tropicais e subtropicais.

Diferenças epidemiológicas entre sorotipos de *C. neoformans* ocorrem no mundo inteiro (KWON-CHUNG & BENNETT, 1984). Na América do Sul e América do Norte foram estudadas 442 cepas clínicas, das quais 72,9%, 10,9%, 3,6%, 6,3% e 4,3% pertenciam, respectivamente, aos sorotipos A, B, C, D e AD e 1,9% não foram sorotipáveis. Na Europa foram estudadas 152 cepas clínicas, das quais 56,5%, 23,7%, 15,8%, 2,6% e 0,7% pertenciam, respectivamente, aos sorotipos A, D, AD, B e C e 0,7% não foram sorotipáveis. No Hawaii, Austrália e Nova Zelândia foram estudadas 45 cepas clínicas, das quais 71,1%, 22,2%, 4,4% e 2,2% pertenciam, respectivamente, aos sorotipos A, B, AD e D. Na Ásia foram estudadas 80 cepas clínicas, das quais 83,8%, 11,3%, 3,8% e 1,3% pertenciam, respectivamente, aos sorotipos A, B, AD e D. Na África foram sorotipadas 6 cepas clínicas, todas pertencentes ao sorotipo B.

No Brasil, são poucos os estudos clínicos relacionados às variedades e aos sorotipos de *C. neoformans*. CALVO (1999) realizou a sorotipagem de 69 cepas clínicas de *C. neoformans* distribuídas nas regiões norte, nordeste, sul e sudeste do Brasil e verificou que 84%, 14% e 2% pertenciam, respectivamente, aos sorotipos A, B e C. Outros autores têm reportado porcentagens de sorotipos, no Brasil, compreendidas entre: 56 a 96% de sorotipo A, de 4 a 36% de sorotipo B e 8% do sorotipo C (LACAZ et al., 1991; ROZENBAUM & GONÇALVES, 1994, AOKI et al., 1998).

Em nosso estudo, foi confirmado o predomínio de *C. neoformans* var. *neoformans* sorotipo A em 86% das cepas clínicas analisadas, e de 14% de *C. neoformans* var. *gattii* sorotipo B.

Estudos realizados em várias regiões do Brasil, mostraram que 53 a 90% das amostras isoladas de *C. neoformans* eram provenientes de pacientes com Aids e que 50 a 96% eram *C. neoformans* var. *neoformans* sorotipo A. (ROZENBAUM & GONÇALVES, 1994, SANTANA et al., 1997) .

Recente estudo nacional verificou que de 69 cepas clínicas de *C. neoformans* estudadas, 41 foram isoladas de pacientes com presença de infecção pelo HIV, 12 de pacientes não HIV e em 16 cepas, essa informação não foi possível (CALVO,1999). Neste estudo, todas as 12 cepas da *C. neoformans* var. *gattii*, ocorreram em pacientes sem infecção pelo HIV.

Os nossos resultados são concordantes com a literatura, uma vez que 35 (67%) das 45 cepas de *C. neoformans* var. *neoformans* sorotipo A foram isoladas de pacientes com infecção pelo HIV e 10 (19%) de pacientes sem infecção pelo HIV, enquanto as 7 (14%) cepas de *C. neoformans* var. *gattii* sorotipo B, 2 (4%) foram isoladas de pacientes com infecção pelo HIV e 5 (10%) de pacientes sem infecção pelo HIV.

A infecção pelo *C. neoformans* é comprovadamente mais comum em adultos. A média de idade na literatura mundial varia entre 28 e 38 anos de idade, sendo o sexo masculino acometido em 63 a 93% dos casos (OLIVEIRA et al., 2000).

Em nosso estudo, a idade média dos pacientes foi de 32 anos, sendo que 82,7% destes encontraram-se entre 20 e 49 anos. O sexo predominante foi o masculino, em ambas as variedades, verificado em 75% do total das cepas clínicas estudadas.

Estudos verificaram que a epidemiologia da infecção criptocócica e a ecologia do *C. neoformans* estão relacionadas, uma vez que o *C. neoformans* var. *neoformans* sorotipo A é encontrado na maioria das infecções pelo *C. neoformans* no mundo inteiro, principalmente em pacientes com Aids e apresenta as excretas

de pombos como principal reservatório. Com base na importância desta potencial fonte de infecção, vários estudos têm relatado o isolamento de *C. neoformans* var. *neoformans* sorotipo A em excretas de pombos, no mundo inteiro.

ANSHENG et al. (1993) reportou 69% de positividade no isolamento de 51 cepas de *C. neoformans* de excretas de pombos na China e verificou que 78% apresentaram sorotipo A e 22% sorotipo AD. CASTANÓN-OLIVARES & LOPEZ-MARTÍNEZ (1994) isolaram 52 (20,7%) cepas de *C. neoformans* var. *neoformans* de 251 amostras de excretas de pombos coletadas em várias localidades públicas na cidade do México. Os autores compararam estudos similares realizados na Bélgica, Estados Unidos, Dinamarca, Costa Rica, Índia, Egito e Inglaterra, e verificaram que as frequências de isolamento de cepas de *C. neoformans* em excretas de pombos variaram entre 6 a 87,5%, sendo os valores mais frequentes compreendidos entre 14,7 a 22,2 %. Estudo realizado, no norte do Irã, isolou 175 (17,8%) cepas de *C. neoformans* var. *neoformans* a partir de 983 coletas de excretas de pombos em vários lugares habitados por pombos (KHOSRAVI, 1997).

Estudos bibliográficos realizados em três conceituadas fontes de pesquisa, “Medline, Pub Med e Scielo”, nos permitiram verificar que apesar do número crescente de publicações na literatura mundial sobre isolamento ambiental de *C. neoformans* em excretas de pombos, ainda são poucos os dados da literatura nacional sobre esse assunto.

MONTENEGRO & PAULA (2000), realizaram estudo da ocorrência das duas variedades de *C. neoformans* na cidade de São Paulo. Os autores verificaram que de 38 locais com acúmulo de fezes de pombos secas na região central da cidade, 8 (21%) foram positivos para *C. neoformans* var. *neoformans* sorotipo A e AD. Durante 1 ano realizou-se o acompanhamento de 5 locais positivos e 4 negativos e a positividade ou não dos locais estudados foi constante. Amostras vegetais derivadas de eucaliptos foram coletadas mensalmente, no período de 2 anos, em 45 parques municipais, dos quais um apresentou positividade para *C. neoformans* var. *gattii* sorotipo C, em duas ocasiões diferentes, ambas no mês de novembro (1996 e 1997).

BARONI (2001) avaliou o nível de contaminação por *C. neoformans* em excretas de pombos, na cidade do Rio de Janeiro em 10 igrejas e 16 praças e logradouros. O autor isolou *C. neoformans* em todas as igrejas estudadas no período de 1 ano (1998) e verificou uma positividade de 34,24% (83 cepas) de um total de 219 amostras coletadas no interior das igrejas. *C. neoformans* foi detectado em 18,74% (4 cepas) das áreas externas, no período de abril a outubro de 1997). Os meses de agosto, outubro e novembro apresentaram o maior número de isolamentos.

Na presente casuística, verificou-se que das 96 amostras de excretas de pombos, coletadas no período de 1 ano, em 8 localidades públicas da cidade de Campinas, 5 apresentaram positividade de 57,3% (55 cepas) para *C. neoformans* var. *neoformans* sorotipo A. No entanto, não houve positividade nas outras 4 localidades estudadas.

Praticamente não existem alusões à sazonalidade nos isolamentos de *C. neoformans*. Em nosso estudo, o mês de maio compreendeu o período de maior isolamento das cepas ambientais tanto no ano de 1999 e 2000, nos quais foram isoladas um total de 20 cepas em três localidades diferentes na cidade de Campinas, portanto diferindo com os períodos de isolamento de MONTENEGRO & PAULA (2000) na cidade de São Paulo e BARONI (2001) na cidade do Rio de Janeiro.

As diferenças geográficas e climáticas, como: pH ácido; alta umidade; temperatura baixa (4 a 26°C); pouca exposição ao sol; presença de creatinina, ácido úrico e purinas, assimiladas como fonte de nitrogênio podem influenciar na sobrevivência de *C. neoformans* var. *neoformans* em excretas de pombos e a ampla distribuição global de cepas patogênicas de *C. neoformans* em todo mundo pode ser resultado do transporte ou migração das aves (CASADEVALL & PERFECT, 1998).

Novas técnicas moleculares estão sendo empregadas para auxiliar a tipagem molecular dos fungos de um modo geral. A CE usando o sistema CHEF de PFGE tem resultado em método útil e tecnicamente simples para distinguir

diferenças genéticas entre as cepas de leveduras, incluindo *C. neoformans* (PERFECT et al., 1989; PERFECT et al., 1993; SPITZER et al., 1993; BARCHIESE et al., 1995; FRIES et al., 1996; FRANZOT et al., 1997; CALVO et al., 2001).

Apesar das várias metodologias para extração de DNA, as diferentes condições de corrida utilizadas, determinam diferentes padrões de CE e número de cromossomos para *C. neoformans*. Segundo WICKES et al. (1994), os fatores que influenciam na incompleta resolução do cariótipo dessa levedura são: a presença de cápsula de polissacarídeo, que interfere com a produção de esferoplastos ou extração de DNA e a produção de nucleases, que podem degradar DNA.

PERFECT et al. (1898), observaram 9 cromossomos no sorotipo A e entre 10 a 12, nos sorotipos B, C e D. Os autores descreveram cepas, sorotipo B, com cromossomos menores (520 Kb) quando comparados com os outros sorotipos. Estudo realizado por BARCHIESE et al. (1995), com cepas clínicas de *C. neoformans*, revelou 9 a 12 cromossomos, os quais apresentaram 750 e 1,900 Kb, respectivamente. FRIES et al. (1996), estudaram cepas clínicas de *C. neoformans* da cidade de Nova York e observaram 6 a 11 cromossomos de aproximadamente 320 Kb a 2,200 Kb.

Recente estudo nacional, realizado por CALVO et al. (2001), investigou o perfil de CE de cepas de *C. neoformans* isoladas de pacientes com e sem infecção pelo HIV, no Brasil, Venezuela e Chile. Os autores reportaram 18 perfis genômicos diferentes, número de cromossomos entre 6 a 11 e o peso molecular de 450/565 a 2,200 Kb.

A tipagem molecular de cepas ambientais de *C. neoformans* tem sido pouco estudada. PERFECT et al. (1993) estudaram a CE de cepas de *C. neoformans* var. *neoformans* isoladas de pacientes com Aids e cepas ambientais provenientes do solo, excretas de pombos e morcegos da Carolina do Norte e Ohio. Os autores observaram que o número de cromossomos variou de 7 a 12 e que poucas cepas apresentaram cromossomos de peso molecular menor que 745 Kb.

CURRIE et al. (1994) e YAMAMOTO et al. (1995) correlacionaram o perfil genômico entre isolados clínicos e isolados ambientais de excretas de pombos de *C. neoformans* a partir da técnica de RFLP. CURRIE et al. (1994) diferenciaram 12 perfis genômicos entre 17 cepas clínicas e 6 entre 8 cepas ambientais, isoladas da cidade de Nova York. YAMAMOTO et al. (1995) diferenciaram 6 perfis genômicos entre 21 isolados clínicos e 3 perfis genômicos entre 8 isolados ambientais, ambos provenientes da cidade de Nagasaki, Japão.

O único estudo que investigou a correlação do perfil genômico de isolados clínicos e ambientais de *C. neoformans* de cepas provenientes do Brasil foi realizado por FRANZOT et al. (1997). Os autores estudaram a CE de 15 isolados ambientais (excretas de pombos) e de 36 isolados clínicos de duas cidades brasileiras, Belo Horizonte e Rio de Janeiro, e verificaram que o número de cromossomos variou de 10 a 13. Foram diferenciados no total 14 perfis genômicos, dos quais 6 foram identificados de cepas ambientais. Os resultados foram comparados com isolados da cidade de Nova York, pelo mesmo método molecular e mostrou que os isolados brasileiros apresentaram alto grau de similaridade com os de Nova York.

No presente trabalho a CE identificou 5 perfis genômicos entre as 55 cepas ambientais de *C. neoformans* var. *neoformans* sorotipo A, com número de cromossomos variando de 6 a 8 com peso molecular de 680 e 2,200 Kb. Verificou-se a predominância de um único perfil em cada localidade pública estudada, com exceção do perfil predominante (I) que foi isolado em duas localidades diferentes (HC-UNICAMP e Igreja do Carmo) e distantes aproximadamente 12 Km. Verificou-se uma similaridade de 98% entre os perfis IV, III e II; 90% entre os perfis V, IV, III e II; e 71% entre os perfis V, IV, III, II e I.

Do total de 45 cepas clínicas de *C. neoformans* var. *neoformans* sorotipo A estudadas, 36 cepas apresentaram 14 perfis genômicos, com número de cromossomos variando de 6 a 9 com peso molecular de 610 e 3,500 Kb, com exceção do perfil K que apresentou uma banda de cromossomo de 295 Kb. Em 9 cepas não foi possível identificar o perfil genômico. A similaridade entre os perfis

clínicos mostrou-se bastante heterogêneo. As 7 cepas clínicas de *C. neoformans* var. *gattii* sorotipo B, apresentaram perfil genômico idêntico com 8 cromossomos e peso molecular de 450/565 a 2,200Kb.

Os resultados obtidos em nossa casuística estão de acordo com a maioria dos pesquisadores (PERFECT et al., 1989; PERFECT et al., 1993; SPITZER et al., 1993; BARCHIESE et al., 1995; FRIES et al., 1996; FRANZOT et al., 1997; CALVO et al., 2001), diferindo, entretanto, dos resultados de PERFECT et al., (1989) e FRANZOT et al. (1997), que referiram maior número de cromossomos, ainda que os pesos moleculares fossem similares. A diferença do número de cromossomos poderia ser explicada pelas condições de corrida.

A homogeneidade dos padrões de CE e a frequência de cromossomos menores, de aproximadamente 565 Kb na variedade *gattii* encontrada em nossa presente investigação, foi também reportada por PERFECT et al. (1989) e CALVO (2001). O presente estudo contribuiu para o fato de que esta variedade apresenta menor diversidade genética.

Segundo vários autores a heterogeneidade tem sido uma característica entre os perfis genômicos observados em *C. neoformans* (PERFECT et al., 1989; PERFECT et al., 1993; SPITZER et al., 1993; BARCHIESE et al., 1995; FRIES et al., 1996; FRANZOT et al., 1997; CALVO et al., 2001).

Em nosso estudo foram identificados 5 perfis ambientais e 14 perfis clínicos de *C. neoformans* var. *neoformans* sorotipo A. A correlação entre as cepas clínicas e ambientais de *C. neoformans* var. *neoformans* sorotipo A identificou dois perfis genômicos ambientais (I e II) idênticos a dois perfis clínicos (E e F), obtidos de dois pacientes, individualmente. O perfil ambiental III apresentou uma pequena diferença em relação ao perfil clínico M quando comparado visualmente, no entanto a análise computacional os classificou com 100% de similaridade. O perfil ambiental V mostrou similaridade de 92% entre o perfil ambiental II e o perfil ambiental F. O perfil clínico predominante (A) mostrou similaridade de 88% com os perfis I e E, enquanto o perfil ambiental IV mostrou-se diferente em relação a todos os perfis clínicos estudados, exceto para com o perfil D, no qual foi similar em 93%.

Esses dados permitiram demonstrar uma boa diversidade genômica de isolados clínicos e menor diversidade ambiental de *C. neoformans* var. *neoformans* sorotipo A, da cidade de Campinas e região. Estes achados parecem refletir a distribuição dos *C. neoformans* na cidade de Campinas, em relação ao perfil genômico, durante o período deste estudo.

A literatura consultada não explica o fato de um maior número de perfis clínicos em relação ao número de perfis ambientais, desse modo pode-se sugerir que: ocorrem rearranjos cromossômicos menores durante a infecção que poderiam variar com o “stress” do organismo devido à resposta imune do hospedeiro e a uma possível reativação de uma infecção precece do paciente adquirida anos anteriores, quando a ecologia do *C. neoformans* era diferente.

Com o aparecimento de micoses sistêmicas e oportunistas nos últimos anos, o estudo da suscetibilidade dos fungos à drogas antifúngicas tem se tornado de grande importância, principalmente na criptococose (SPITZER et al., 1993; BARCHIESE et al. 1995; CALVO et al. 2001).

O tratamento de escolha na criptococose tem sido a AMB associada ou não à 5-FC. O uso de 5-FC tem sido controverso nos pacientes com Aids devido a sua toxicidade (ESPINEL-INGROFF & PFALLER, 1985). No início da década de 90, novos antifúngicos começaram a ser usados com sucesso no tratamento desta micose, dentre eles os derivados triazólicos: fluconazol e itraconazol.

Com a disponibilidade de novas terapêuticas e a necessidade de melhores estratégias para o tratamento das micoses, incluindo a criptococose, fez-se necessário o estudo da sensibilidade dos fungos. Para tal, várias metodologias estão sendo empregadas para avaliar a atividade “*in vitro*” dos antifúngicos, dentre elas: macrodiluição, microdiluição e Etest.

Atualmente, a metodologia mais utilizada é a microdiluição em caldo, padronizada pelo NCCLS que, embora ainda em fase inicial de desenvolvimento, já têm permitido a obtenção de novos e importantes dados ao se avaliar os padrões de resistência dos fungos às drogas

BARCHIESE et al. (1994) conduziram o estudo da suscetibilidade de *C. neoformans* pelos métodos de macrodiluição e microdiluição. No estudo foram incluídas 50 amostras clínicas de *C. neoformans* var. *neoformans*, segundo as normas preconizadas pelo NCCLS. Os resultados por microdiluição mostraram CIM de 0,125 a 1 µg/mL para AMB; CIM de 1 a 64 µg/mL para 5-FC; CIM de 0,5 a 64 µg/mL para FLCZ e CIM de 0,3 a 1 µg/mL para ITCZ.

CALVO et al. (1999) estudaram a suscetibilidade de 100 cepas clínicas de *C. neoformans* provenientes do Brasil, Venezuela e Chile, pelo método da microdiluição em caldo, segundo o NCCLS. A variação de CIM para AMB foi de 0,06 a 1 µg/mL; para 5-FC de 0,5 a 64 µg/mL; para FLCZ de 1 a 16 µg/mL e para ITCZ de 0,015 a 0,25 µg/mL.

Estudo nacional, realizado por AOKI (2000), demonstrou a suscetibilidade de 31 cepas clínicas de *C. neoformans*, provenientes de 24 pacientes internados no HC-UNICAMP, pelo método da microdiluição em caldo, segundo a padronização do NCCLS. Os valores das CIMs variaram de 0,5 a 2 µg/mL para AMB, de 1 a 16 µg/mL para 5-FC, de 0,5 a 32 µg/mL para FLCZ e de 0,06 a 2 µg/mL para ITCZ. Valores de CIM₉₀ de 1 µg/mL e 2 µg/mL para AMB foram verificados em pacientes HIV negativos e HIV positivos, respectivamente.

FRANZOT & HAMDAN (1996) estudaram a suscetibilidade de 53 cepas clínicas e ambientais (excretas de pombos) de *C. neoformans* var. *neoformans*, procedentes de Minas Gerais, Brasil, pelo método da macrodiluição, segundo recomendações do NCCLS. A variação da CIM para AMB foi de 0,25 a 1 µg/mL para as cepas clínicas e de 0,125 a 1 µg/mL para as cepas ambientais, CIM₅₀ e CIM₉₀ foram iguais a 0,5 µg/mL e 1 µg/mL, para ambas as cepas estudadas. Para a 5-FC, as cepas clínicas apresentaram CIM variando de 0,25 a 8 µg/mL e as cepas ambientais de 1 a 8 µg/mL, CIM₅₀ de 2 µg/mL e CIM₉₀ de 8 µg/mL foram determinadas para ambas as cepas estudadas. Para o FLCZ, as cepas clínicas apresentaram CIM variando de 0,5 a 16 µg/mL, CIM₅₀ de 4 µg/mL e CIM₉₀ de 8 µg/mL e as cepas ambientais apresentaram CIM variando de 0,5 a 16 µg/mL,

CIM₅₀ de 2 µg/mL e CIM₉₀ de 4 µg/mL. A variação da CIM para ITCZ foi de $\leq 0,03$ a 0,25 µg/mL para as cepas clínicas e de 0,06 a 0,25 µg/mL para as cepas ambientais, CIM₅₀ e CIM₉₀ foram iguais a 0,125 µg/mL e 0,25 µg/mL, respectivamente, para ambas as cepas estudadas.

Utilizando o método do Etest® em meio YNB (yeast nitrogen base) com asparagina, MONTENEGRO (1998), realizou o estudo de suscetibilidade de *C. neoformans* isolados de excretas de pombos e eucaliptos, na cidade de São Paulo, Brasil e verificou alta suscetibilidade a AMB, algumas cepas resistentes a 5-FC e outras apresentaram padrão sensível dose dependente aos derivados azólicos.

BARONI (2001) utilizou o método do Etest® para estudar a suscetibilidade de 87 cepas ambientais isoladas de excretas de pombos na cidade do Rio de Janeiro, Brasil. O autor encontrou valores de CIM para AMB variando de 0,19 a 6,0 µg/mL, sendo que 3,45% das cepas apresentaram CIM > 2 µg/mL; 5-FC apresentou intervalo de 0,047 a 32 µg/mL, sendo que 39,08% das cepas apresentaram CIM superiores a 32 µg/mL; para o FLCZ a CIM variou de 0,38 a > 256 µg/mL, sendo que 75,86% das cepas apresentaram CIM de 8 µg/mL e 19,54% das cepas apresentaram CIM > 256 µg/mL; e o ITCZ apresentou intervalo de 0,006 a 6,0 µg/mL, com média de 0,84 µg/mL.

Recentemente, ALVES et al. (2001) compararam a suscetibilidade de 69 amostras de *C. neoformans* isoladas de pacientes com Aids com 13 amostras de *C. neoformans* isoladas de excretas de pombos, no sul do Brasil, pelo método da macrodiluição em caldo (NCCLS). Os autores verificaram CIM de 0,06 a 0,5 µg/mL para AMB e CIM de 0,125 a 16 µg/mL para FLCZ, em ambas as cepas estudadas. Todavia, frente ao FLCZ, os isolados clínicos evidenciaram menor sensibilidade do que os provenientes do meio ambiente.

O presente estudo referente a atividade “*in vitro*” de AMB, 5-FC, FLCZ e ITCZ mostrou valores de CIM para AMB de 0,5 a 1 µg/mL, CIM₅₀ e CIM₉₀ de 1 µg/mL para as cepas clínicas e ambientais de *C. neoformans*. Para 5-FC a CIM

variou de 1 a 16 µg/mL, CIM₅₀ e CIM₉₀ de 2 µg/mL, para as cepas clínicas. FLCZ apresentou CIM de 2 a 8 µg/mL, CIM₅₀ e CIM₉₀ de 4 µg/mL, para as cepas ambientais e CIM de 0,25 a 16 µg/mL, CIM₅₀ de 2 µg/mL e CIM₉₀ de 8 µg/mL, para as cepas clínicas. CIM de 0,125 a 0,25 µg/mL, CIM₅₀ e CIM₉₀ de 0,25 µg/mL para ITCZ foi verificada em ambas as cepas estudadas.

Com relação às variações de CIM, CIM₅₀ e CIM₉₀, utilizando o método da microdiluição segundo o NCCLS, nossos resultados mostraram-se similares àqueles reportados pelas pesquisas referidas anteriormente (BARCHIESE et al., 1994; FRANZOT & HAMDAN, 1996; CALVO et al., 1999), exceto por AOKI (2000), que verificou CIM₉₀ de 2 µg/mL em pacientes HIV positivos.

Embora FRANZOT & HAMDAN (1996) e ALVES et al. (2001) não tenham encontrado diferenças na sensibilidade entre cepas clínicas e ambientais de *C. neoformans*, o presente estudo verificou que as cepas ambientais apresentaram CIM mais elevada para 5-FC, quando comparada com as cepas clínicas. Este fato sugere que o paciente pode adquirir cepas ambientais, primariamente, com CIM elevada de 5-FC e que o *C. neoformans* não desenvolve necessariamente resistência ao antifúngico durante o tratamento. No entanto, estes dados devem ser melhor estudados com maior número de amostras.

Esses resultados sugerem que já no ambiente existem isolados com alta suscetibilidade a AMB e CIM mais elevadas para 5-FC e derivados azólicos, como os referido por MONTENEGRO (1998) e BARONI (2001), com os quais os humanos podem se infectar.

Os dados obtidos no presente trabalho apontam a necessidade de estudos continuados do perfil molecular e de suscetibilidade entre isolados ambientais e clínicos de *C. neoformans*, bem como a correlação entre a evolução clínica da criptococcose com dados laboratoriais moleculares e de suscetibilidade, para melhor caracterização de amostras de *C. neoformans* na cidade de Campinas.



6. CONCLUSÕES

1. Todas as cepas ambientais isoladas de excretas de pombos foram *C. neoformans* var. *neoformans* sorotipo A. *C. neoformans* var. *neoformans* sorotipo A foi isolado em 45 pacientes e *C. neoformans* var. *gattii* sorotipo B em 7 pacientes.
2. A cariotipagem eletroforética identificou 14 perfis clínicos e 5 ambientais de *C. neoformans* var. *neoformans* sorotipo A. Os isolados clínicos de *C. neoformans* var. *gattii* sorotipo B apresentaram um único perfil genômico.
3. O perfil genômico predominante entre os isolados ambientais de *C. neoformans* var. *neoformans* sorotipo A foi encontrado em duas localidades diferentes, na cidade de Campinas. Os demais perfis foram identificados, individualmente, em cada localidade pública.
4. Dois perfis ambientais foram idênticos à dois clínicos, obtidos em dois pacientes, individualmente.
5. Não foi observada diferença na suscetibilidade aos antifúngicos entre as cepas clínicas de *C. neoformans* var. *neoformans* e entre os perfis genômico de ambas as cepas estudadas. As cepas de *C. neoformans* var. *gattii* mostraram valores de CIM para 5-FC e FLCZ mais elevados do que as cepas clínicas da var. *neoformans*.



7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-DOORY, Y. – The ultrastructure of *Cryptococcus neoformans*. **Sabouraudia**, **9**: 113-8, 1971.

ALVES, S.H.; OLIVEIRA, L.T.; COSTA, J.M.; LUBECK, I.; CSALI, A.K.; VAINSTEIS, M.H. – In vitro susceptibility to antifungal agents of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* in Southern of Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **43**: 267-70, 2001.

AOKI, F.H. – Identificação de seqüências como inibidores (“primers”) específicos para caracterização em culturas dos sorotipos A e B de *Cryptococcus neoformans* pela reação em cadeia de polimerase (PCR) Campinas, 2000. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP.

AOKI, F.H.; IMAI, T.; TANAKA, R.; MIKAMI, Y.; TAGUCHI, H.; NISHIMURA, N.F.; MIYAJI, M.; SCHREIBER, A.Z.; BRANCHINI, M.L.M. – New PCR primer pairs specific for *Cryptococcus neoformans* serotypes A or B prepared based on random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprint pattern analyses. **J. Clin Microbiol.**, **37**: 315-20, 1998.

ANSHENG, L.; NISHIMURA, K.; TAGUCHI, H.; TANAKA, R.; SHAOXI, W.; MIYAJI, M. – The isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon droppings and serotyping of naturally and clinical sourced isolates in China. **Mycopathologia**, **124**: 1-5, 1993.

BARCIESE, F.; ARNALDO, C.; Mc GOUGIE, D.; RINALDI, M.G. – Comparative study of broth macrodilution and microdilution techniques for in vitro antifungal susceptibility testing of yeast by using National Commite for Clinical Laboratory Standards proposed standard. **J. Clin. Microbiol.**, **32**: 2494-2500, 1994.

BARCIESE, F.; HOLLIS, R.; MESSER, A.S.; SCALISE, G.; RINALDI, M.G.; PFALLER, M.A. – Electrophoretic kariotype and in vitro antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, **23**: 99-103, 1995.

BARONI, FA. – Ocorrência de *Cryptococcus neoformans* em excretas de pombos localizadas em torres de igrejas na cidade do Rio de Janeiro: fatores de virulência e sensibilidade aos antifúngicos. São Paulo, 2001. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

BASTIDE, J.M. & MALLIE, M. – Ultrastructure et biologie de *Cryptococcus neoformans*. **Bull. Soc. Fr. Med.**, **15**: 11-20, 1986.

BELAY, T.; CHERNIAK, R.; NEILL, E.; KOZEL, T. – Serotyping of *Cryptococcus neoformans* by dot enzyme assay. **J. Clin. Microbiol.**, **32**: 466-70, 1996.

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

BRUESKE, C. – Proteolytic activity of clinical isolate of *Cryptococcus neoformans*. **J. Clin. Microbiol.**, **23**: 631-33, 1986.

BULMER, G.S.; SANS, M.D.; GUNN, C.M. – *Cryptococcus neoformans*. I. Nonencapsulated mutants. **J. Bacteriol.**, **94**: 1475-79, 1967.

CALVO, B.M. – Avaliação dos perfis de susceptibilidade a antifúngicos e cariotipagem eletroforética de isolados clínicos de *C. neoformans*, do Brasil, Chile e Venezuela, segundo variedades e sorotipos. São Paulo, 1999. Tese de Doutorado. Escola Paulista de Medicina, UNIFESP.

CALVO, B.M.; COLOMBO, A.L.; FISCHIMAN, O.; SANTIAGO, A.; THOMPSON, L.; LAZÉRA, M.; TELLES, F.; FUKUSHIMA, K.; NISHIMURA, K.; TANAKA, R.; MYIAJY, M.; MORETTI-BRANCHINI, M.L. – Antifungal susceptibilities, varieties, and electrophoretic karyotypes of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* from Brazil, Chile and Venezuela. **J. Clin. Microbiol.**, **39**: 2348-50, 2001.

CASADEVALL, A. & PERFECT, J.R. – Ecology of *Cryptococcus neoformans*. In: ***Cryptococcus neoformans***. Washington, American Society for Microbiology, 1998. p. 41-70.

CASTANÓN-OLIVARES, L.R. & LÓPEZ-MARTÍNEZ, R. – Isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon (*Columba livia*) droppings in Mexico City. **Mycoses**, **37**:325-27, 1994.

CHATUVERDI, V.; WONG, B.; NEWMAN, S. – Oxidative killing of *Cryptococcus neoformans* by human neutrophils. **J. Immunol.**, **156**: 3836-40, 1996.

CHEN, S.C.A.; MULLER, M.; ZHOU, J.Z.; WRIGHT, L.C.; SORRELL, T. – Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*: a new virulence factor? **J. Infect. Dis.**, **175**: 414-20, 1997.

CHERNIAK, R.; REISS, E.; SIODKI, M.E.; PLATTNER, R.D.; BLUMER, S.O. – Structure and antigenic activity of the capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans* serotype A. **Mol. Immunol.**, **107**: 1025-32, 1980.

CHERNIAK, R.; REISS, E.; TURNER, S. – A galactoxylomannan antigen of *Cryptococcus neoformans* serotype A. **Carbohydr. Res.**, **103**: 239-50, 1982.

CHU, G.; VOLLRATH, D.; DAVIS, R.W. – Separation of Large DNA Molecular by Countour-Clamped Homogeneous Electric Fields. **Science**, **234**: 1582-85, 1986.

COLOMBO A.L. – Avaliação *in vitro*, por três diferentes métodos, da sensibilidade de leveduras a antifúngicos azólicos. São Paulo, 1994. Tese de Doutorado. Escola Paulista de Medicina, UNIFESP.

COLOMBO A.L.; BARCHIESE, F.; MCGOUGH, D.A.; RINALDI, M.G. – Comparison of Etest and National Committee for Clinical Laboratory Standards Broth Macrodilution Method for Azole Susceptibility testing. **J. Clin. Microbiol.**, **33**: 535-40, 1995.

COOPER, B.H. & SILVA-HUNTER, M. – Yeast of medical importance. In: **Manual of Clinical Microbiology**. 4 ed. Washington, American Society for Microbiology, 1985. p. 526-41.

- CURRIE, B.P.; FREUNDLICH, L.F. & CASADEVALL, A. – Restriction fragment length polymorphism analysis of *Cryptococcus neoformans* isolates from environmental (pigeon excreta) and clinical sources in New York City. **J. Clin. Microbiol.**, **32**: 1188-92, 1994.
- DROMER, F.; GUEHO, E.; RONIN, O.; DUPONT, B. – Serotype of *Cryptococcus neoformans* by using a monoclonal antibody specific for capsular polysaccharide. **J. Clin. Microbiol.**, **31**: 359-63, 1993.
- DUFAIT, R.; VELHO, R.; DE VROY, C. – Rapid identification of the two varieties of *Cryptococcus neoformans* by d-proline assimilation. **Mykosen**, **30**: 483, 1987.
- DUPONT, B.; GRAYBAILL, J.R.; ARMSTRONG, D.; LAROCHE, R.; TOUZÉ, J.E.; WHEAT, L.J. – Fungal infections in AIDS patients. **J. Med. Veter. Mycol.**, **30**: 19-28, 1992.
- ELLIS, D. & PFEIFFER, T. – Nature Habitat de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. **J. Clin. Microbiol.**, **28**: 1642-44, 1990.
- EMMONS, C.E. – Isolation of *Cryptococcus neoformans* from soil. **J. Bact.**, **62**: 685-90, 1951.
- EMMONS, C.E. – Prevalence of *Cryptococcus neoformans* in pigeon habitats. **Publ. Hlth. Rep. (Wash.)**, **75**: 362-64, 1961.
- EMMONS, C.E. – Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with the pigeon (*Columba livia*). **Amer. J. Hyg.**, **62**: 227-32, 1955.
- ESPINEL-INGROFF, A. & PFALLER, M.A. – Antifungal agents and susceptibility testing. In: **Manual of Clinical**. 4.ed. Washinton, American Society for Microbiology, 1985. p. 1405-14.
- ESPINEL-INGROFF, A.; KISH, J.R., C.W.; KERKERING, T.M.; FROMTLING, R.A.; BARTIZAL, K.; GALGANI, J.N.; VILLAREAL, K.; PFALLER, M.A.; GERARDEN, T.; RINALDI, M.G.; FOTHERGILL, A. – Collaborative comparasion of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests. **J. Clin. Microbiol.**, **30**: 3138-45, 1992.

EVANS, E.E. – The antigenic composition of *Cryptococcus neoformans*. I. A serologic classification by means of the capsular and agglutination reactions. **J. Immunol.**, **64**: 423-30, 1950.

FRANZOT, S.P. & HAMDAN, J.S. – In vitro susceptibilities of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* to five antifungal drugs. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **40**: 822-24, 1996.

FRANZOT, S.P.; HAMDAN, J.S.; CURRIE, B.P.; CASADEVALL, A. – Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* in Brazil and the United States: evidence for both local genetic differences and a global clonal population structure. **J. Clin. Microbiol.**, **35**: 2243-51, 1997.

FRANZOT, S.P.; SALKIN, I.F.; CASADEVALL, A. – *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. **J. Clin. Microbiol.**, **37**: 838-40, 1999.

FRIES, B.C.; CHEN, F.; CURRIE, B.P.; CASADEVALL, A. – Karyotype instability in *Cryptococcus neoformans* infection. **J. Clin. Microbiol.**, **34**: 1531-34, 1996.

GARCIA-HERMOSO, D.; JANBON, G. & DROMER, F. – Epidemiological Evidence for dormant infection due to *Cryptococcus neoformans*. In: International Conference on *Cryptococcus* and cryptococcosis, 1999. Abstracts. P92.

JACOBSON, E.; JENKINS, N.; TODD, J. – Relationship between superoxide dismutase and melanin in pathogenic fungus. **Infect. Immun.**, **62**: 4085-86, 1994.

KAPLAN, W.; BRAGG, S.; CRANE, S.; AHEARN, D.G. – Serotyping *Cryptococcus neoformans* by immunofluorescence. **J. Clin. Microbiol.**, **14**: 313-17, 1981.

KHOSRAVI, A.R. – Isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon (*Columba livia*) droppings in northern Iran. **Mycopathologia**, **139**: 93-7, 1997.

KURTZMAN, C.P. – Systematische zusammenstellung der niedern Algen-Gattungen und Arten. **Linneae**, **8**: 365, 1833.

KURTZMAN, C.P. & FELL, J. – **The yeast, A taxonomic study**. 4.ed. Amsterdam, Elsevier Science Publishers BV, 1998. p. 1055.

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

KWON-CHUNG, K.J. & BENNETT, J.E. – Cryptococcosis. In: **Medical Mycology**. Philadelphia, Lea & Febiger, 1992. p. 397-446.

KWON-CHUNG, K.J.; BENNETT, J.E.; THEODORE, T.S. – *Cryptococcus bacillisporus* sp nov., serotype B-C of *Cryptococcus neoformans*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, **28**: 616-20, 1978.

KWON-CHUNG, K.J. & BENNETT, J.E. – Epidemiologic differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. **Am. J. Epidemiol.**, **120**: 126-30, 1984.

KWON-CHUNG, K.J.; EDMAN, J.; WICKES, B. – Genetic association of mating types and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Infect. Immun.**, **60**: 602-5, 1992.

KWON-CHUNG, K.J.; POLACHECK, I.; BENNETT, J.E. – Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (Serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (Serotypes B and C). **J. Clin. Microbiol.**, **15**: 535-37, 1982.

KWON-CHUNG, K.J. & RHODES, J.C. – Encapsulation and melanin formation as indicators of virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Infect. Immun.**, **51**: 218-23, 1986.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; HEINS-VACCARI, E.M. – **Guia para identificação. Fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. 1.ed. São Paulo, Savier, 1998.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C. – **Micologia Médica. Fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. 8.ed. São Paulo, Sarvier, 1991.

LAZÉRA, M.S.; CAVALCANTI, M.A.S.; TRILLES, L.; NISHIKAWA, M.M.; WANKE, B. – *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* - evidence for a natural habitat related to decaying wood in a pottery tree hollow. **Med. Micol.**, **36**: 119-22, 1998.

LAZÉRA, M.S.; PIRES, F.D.A.; COURA, L.C.; NISHIKAWA, M.M. – Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in decaying wood forming hollows in living trees. **J. Med. Veter. Mycol.**, **34**: 127-31, 1996.

LAZÉRA, M.S.; WANKE, B.; NISHIKAWA, M.M. – Isolation of both varieties of *Cryptococcus neoformans* from saprophytic sources in city of Rio de Janeiro, Brazil. **J. Med. Veter. Mycol.**, **31**: 449-54, 1993.

LEVITZ, M.S. – The ecology of *Cryptococcus neoformans* and the epidemiology of cryptococcosis. **Rev. Infect. Dis.**, **13**: 1163-9, 1991.

LI, A.; NISHIMURA, K.; TANAKA, R.; WU, S.; MIYAJI, M. – The isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon droppings and naturally and clinically sourced isolates in China. **Mycopathol.**, **124**: 1-5, 1993.

LITTMAN, M.L. & BOROK, R. – Relation of the pigeon to cryptococcosis: natural carrier state, heat resistance and survival of *Cryptococcus neoformans*. **Mycopathol. Mycol. Appl.**, **35**: 329-45, 1968.

LOZANO-CHIU, M.; PAETZNICK, V.L.; GHANNOUM, M.A.; REX, J.H. – Detection of resistance to amphotericin B among *Cryptococcus neoformans* clinical isolates: performances of three different media assessed by using E-test and National Committee for Clinical Laboratory Standards M27-A methodologies. **J. Clin. Microbiol.**, **36**: 2817-22, 1998.

MACEDO, R.C.L.; TRILLES, L.; EULÁLIO, K.D.; CAVALCANTI, M.A.S.; MORAES, L.O.; LAZÉRA, M.S.; WANKE, B. – *Cryptococcus neoformans* sorotipos A e D em habitat de tatu no nordeste do Brasil. In: III CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA, 19-23, Águas de Lindoia, 2001. **Anais. Águas de Lindoia**, 2001. pg. 111. (resumo MH125)

MACHADO, C.C.; AMARAL, A.A. & SEVERO, L.C. – *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* isolado do solo. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.**, **35**: 77-79, 1993.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Programa nacional de doenças sexualmente transmissíveis Brasília. Brasil. Bol. Epidemiol. AIDS, 1999. ano11: 44.

MITCHELL, T. & PERFECT, J. – Cryptococcosis in the era of Aids-100 Years after the Discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Clin. Microbiol. Rev.**, **8**: 515-48, 1995.

MONTENEGRO, H.N. – Ocorrência das variedades de *Cryptococcus neoformans* na cidade de São Paulo: isolamento em fezes de pombo e em bosques de eucalipto. São Paulo, 1994. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, USP.

MONTENEGRO, H. N. & PAULA, C.R. – Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* and *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* of São Paulo, Brazil. **Med. Mycol.**, **38**: 385-90, 2000.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; proposed standard. Villanova, Pa, NCCLS, 1992. v.12. p.22. M27-P.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; aproved standard. Wayne. Pa, NCCLS, 1997. v.17. p.28. M27-A.

ODOM, A.; MUIR, S.; LIM, E.; TOFFALETTI, D.L.; PERFECT, J.; HEITMAN, J. – Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Embo. J.**, **16**: 2576-89, 1997.

OLIVEIRA, O.V.; NEGREIROS, D.P.; TREVISOL-BITTENCOURT, P.C. – Neurocriptococose em pacientes com AIDS no hospital Nereu Ramos, Florianópolis - SC. **J. Bras. Aids.**, **1(4)**: 28-34, 2000.

PERFECT, J.R.; KETABCHI, N.; COX, G.M.; INGRAM, C.W.; BEISER, C.L. – Karyotyping of *Cryptococcus neoformans* as an epidemiological tool. **J. Clin. Microbiol.**, **3**: 3305-09, 1993.

PERFECT, J.R.; MAGEE, B.B.; MAGEE, P.T. – Separation of Chromosomes of *Cryptococcus neoformans* by pulsed field gel electrophoresis. **Infect. Immun.**, **57**: 2624-27, 1989.

PFALLER, M.A.; BALE, M.; BUSCHELMAN, B.; LANCASTER, M.; ESPINEL-INGROFF, A.; REX, J.R.; RINALDI, M.G. – Selection of candidate quality control isolates and tentative quality control ranges for in vitro susceptibility testing of yeast isolates by National Committee for Clinical Laboratory Standards proposed standard methods. **J. Clin. Microbiol.**, **32**: 1650-53, 1994.

PFALLER, M.A.; MESSER, A.S.; KARLSSON, A.; BOLMSTRÖM, A. – Evaluation of the Etest method for determining fluconazole susceptibilities of 402 clinical yeast isolates by using three different agar media. **J. Clin. Microbiol.**, **36**: 2586-89, 1998.

POLACHEK, I. & LEBENS, G.A. – Electrophoretic karyotype of pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. **J. Gen. Microbiol.**, **133**: 67-71, 1989.

RHODES, J.C.; POLACHEK, I.; KWON-CHUNG, K.J. – Phenoloxidase activity and Virulence in Isogenic of *Cryptococcus neoformans*. **Infect. Immun.**, **36**: 1175-84, 1982.

RIPPON, J.W. *Cryptococcus*. In: **Medical Mycology: The Pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes**. 3.ed. Philadelphia, Saunders, 1988. p. 582-609.

RODRIGUES, M.L.; ROZENTAL, S.; COUCERO, J.N.S.S.; ANGLUSTER, J.; ALVIANO, C.S.; TRAVASSOS, L.R. – Identification N-acetylneuraminic acid and its 9-0-acetylated derivative on the cell surface of *Cryptococcus neoformans*: influence on fungal phagocytosis. **Infect. Immun.**, **65**: 4937-42, 1997.

- ROZENBAUM, R. & GONÇALVES, A.J.R. – Clinical epidemiological study os 171 cases of cryptococcosis. **Clin. Infect. Dis.**, **18**: 369-80, 1994.
- SAFRIN, R.E.; LANCASTER, L.A.; DAVIS, C.E.; BRAUDE, A. – Diferentiation of *Cryptococcus neoformans* serotypes by isoenzyme electrophoresis. **Am. J. Clin. Pathol.**, **86**: 204-08, 1986.
- SALKIN, I.F. & HURD, N.J. – New medium for differentiation of *Cryptococcus neoformans* serotype pairs. **J. Clin. Microbiol.**, **15**: 169-71, 1982.
- SANFELICE, F. – Contributo alla morfologia e biologia dei blastomiceti che si sviluppano nei succhi di alcuni frutti. **Ann. Igien.**, **4**: 463-95, 1894.
- SANTANA, J.V.; MARTINS, M.A.; PUKINKAS, S.R.; MELHEM, M.S.C. – Varieties of *Cryptococcus neoformans* in state of São Paulo. Brasil. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR HUMAN AND ANIMAL MYCOLOGY. 8-12, Parma, 1997. **Anais. Parma**, 1997. Pg. 119. (abstract P161).
- SCHWARTZ, D.C. & CANTOR, C.R. – Separation of Chromosome Sized DNAs by Pulsed Field Gradient Gel Electrophoresis. **Cell**, **37**: 67-75, 1984.
- SHARON, C.A.; CHEN, S.C.A.; O'DONNELL, M.L.; GORDON, S.; GILBERT, G.L. – Antifungal susceptibility testing using the Etest: comparison with the broth macrodilution technique. **J. Antimicrob. Chemother.**, **37**: 265-73, 1996.
- SHAW, C.E. & KAPICA, L. – Prodution of diagnosis pigmente by phenolxidase activity. **Appl. Environ. Microbiol.**, **24**: 824-30, 1972.
- SIMOR, A.E.; GOSWELL, G.; LOUIE, L.; LEE, M.; LOUIE, M. – Antifungal susceptibility testing of yeast isolates from blood cultures by microbrothdilution and Etest. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, **16**: 693-97, 1997.
- SPITZER, E.D.; SPITZER, S.G.; FREUNDLICH, L.F.; CASADEVALL, A. – Persistence of initial infection in recurrent *Cryptococcus neoformans* meningitis. **Lancet**, **341**: 595-96, 1993.

STAIB, F. – *Cryptococcus neoformans* und *Guizotia abyssinica* (syn. *G. oleifera* D.C.) Farbreaktion für *C. neoformans*. **Z. Hyg.**, **148**: 466-75, 1962.

TURNER, S.H.; CHERNIAK, R.; REISS, E. – Fractionation and characterization of galactoxylomannan from *Cryptococcus neoformans*. **Carbohyd. Res.**, **125**: 343-9, 1984.

VANBREUSEGHEM, R. & TAKASHIO, M. – An atypical strain of *Cryptococcus neoformans* (San Felice) Vuillemin, 1894. Part.II. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* var. nov. Ann. **Soc. Belge. Med. Trop.**, **50**: 695-702, 1970.

WANG, Y. & CASADEVALL, A. – Susceptibility of melanized and nonmelanized *Cryptococcus neoformans* to nitrogen and oxygen-derived oxidants. **Infect. Immun.**, **62**: 3004-7, 1994.

WANG, Y.; AISEN, P.; CASADEVALL, A. – *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: mechanism of action. **Infect. Immun.**, **63**: 3131-36, 1995.

WARNOCK, D.W.; JOHNSON, E.M.; ROGERS, T.R. – Multi-centre evaluation of Etest method for antifungal drug susceptibility testing of *Candida* spp. And *Cryptococcus neoformans*. BSAC Working Party on Antifungal Chemotherapy. **J. Antimicrob. Chemother.**, **42**: 321-31, 1998.

WICKES, B.I.; MOORE, T.D.E.; KWON-CHUNG, K.J. – Comparason of the electrophoretic karyotypes and chromosomal location of tem genes in the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology.**, **140**: 543-50, 1994.

WILLIAMSON, P.R. – Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans*: identification as a laccase. **J. Bacteriol.**, **176**: 656-64, 1994.

WILLIAMSON, P.R.; WAKAMATSU, K.; ITO, S. – Melani biosynthesis in *Cryptococcus neoformans*. **J. Bacteriol.**, **180**: 1570-72, 1998.

WILSON, D.E.; BENNETT, J.E.; BAYLEY, J.W. – Serologic grouping of *Cryptococcus neoformans*. **Proc. Soc. Exp. Biol.**, **127**: 820-30, 1968.

WONG, B.; PERFECT, J.R.; BEGGS, S.; WRIGHT, K.A. – Production of the hexitol d-mannitol by *Cryptococcus neoformans* in vitro and in rabbits with experimental meningitis. **Infect. Immun.**, **58**: 1664-70, 1990.

YAMAMOTO, Y.; KOHNO, S.; KOGA, H.; KAKEYA, H.; TOMONO, K.; KAKU, M.; YAMAZAKI, T.; ARISAWA, M.; HARA, H. – Random amplified polymorphic DNA analysis of clinically and environmental isolated *Cryptococcus neoformans* in Nagasaki. **J. Clin. Microbiol.**, **33**: 3328-32, 1995.



8. *ANEXOS*

8.1. ANEXO 1

CEPAS DE *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* ISOLADAS A PARTIR DE EXCRETAS DE POMBOS, NA CIDADE DE CAMPINAS.

CEPAS	LOCALIDADE	COLETA	VARIEDADE	SOROTIPO	PERFIL (CE)
M 1	Mercado Central	25/05/99	<i>neoformans</i>	A	V
M 2	Mercado Central	25/05/99	<i>neoformans</i>	A	V
M 3	Mercado Central	25/05/99	<i>neoformans</i>	A	V
M 4	Mercado Central	25/05/99	<i>neoformans</i>	A	V
P 1	PUCC II	25/05/99	<i>neoformans</i>	A	IV
P 2	PUCC II	25/05/99	<i>neoformans</i>	A	IV
P 3	PUCC II	25/05/99	<i>neoformans</i>	A	IV
P 4	PUCC II	25/05/99	<i>neoformans</i>	A	IV
P 5	PUCC II	25/05/99	<i>neoformans</i>	A	IV
I 1	Igreja do Carmo	22/09/99	<i>neoformans</i>	A	I
I 2	Igreja do Carmo	22/09/99	<i>neoformans</i>	A	I
I 3	Igreja do Carmo	22/09/99	<i>neoformans</i>	A	I
I 4	Igreja do Carmo	22/09/99	<i>neoformans</i>	A	I
I 5	Igreja do Carmo	22/09/99	<i>neoformans</i>	A	I
I 6	Igreja do Carmo	15/10/99	<i>neoformans</i>	A	III
I 7	Igreja do Carmo	05/07/00	<i>neoformans</i>	A	III
I 8	Igreja do Carmo	05/07/00	<i>neoformans</i>	A	I
I 9	Igreja do Carmo	05/07/00	<i>neoformans</i>	A	I
I 10	Igreja do Carmo	05/07/00	<i>neoformans</i>	A	I
I 11	Igreja do Carmo	05/07/00	<i>neoformans</i>	A	I
I 12	Igreja do Carmo	05/07/00	<i>neoformans</i>	A	I
I 13	Igreja do Carmo	05/07/00	<i>neoformans</i>	A	I
I 14	Igreja do Carmo	05/07/00	<i>neoformans</i>	A	I
I 15	Igreja do Carmo	05/07/00	<i>neoformans</i>	A	I
I 16	Igreja do Carmo	05/07/00	<i>neoformans</i>	A	I
I 17	Igreja do Carmo	05/07/00	<i>neoformans</i>	A	I
I 18	Igreja do Carmo	05/07/00	<i>neoformans</i>	A	I
H 1	HC - UNICAMP	15/10/99	<i>neoformans</i>	A	II
H 2	HC - UNICAMP	15/10/99	<i>neoformans</i>	A	I
H 3	HC - UNICAMP	15/10/99	<i>neoformans</i>	A	I
H 4	HC - UNICAMP	16/03/00	<i>neoformans</i>	A	I

H 5	HC - UNICAMP	16/03/00	<i>neoformans</i>	A	I
H 6	HC - UNICAMP	16/03/00	<i>neoformans</i>	A	I
H 7	HC - UNICAMP	19/04/00	<i>neoformans</i>	A	I
H 8	HC - UNICAMP	19/04/00	<i>neoformans</i>	A	II
H 9	HC - UNICAMP	19/04/00	<i>neoformans</i>	A	II
H 10	HC - UNICAMP	19/04/00	<i>neoformans</i>	A	I
H 11	HC - UNICAMP	19/04/00	<i>neoformans</i>	A	II
H 12	HC - UNICAMP	19/04/00	<i>neoformans</i>	A	II
H 13	HC - UNICAMP	19/04/00	<i>neoformans</i>	A	II
H 14	HC - UNICAMP	19/04/00	<i>neoformans</i>	A	I
H 15	HC - UNICAMP	19/04/00	<i>neoformans</i>	A	I
H 16	HC - UNICAMP	19/04/00	<i>neoformans</i>	A	II
H 17	HC - UNICAMP	19/04/00	<i>neoformans</i>	A	II
H 18	HC - UNICAMP	25/05/00	<i>neoformans</i>	A	II
H 19	HC - UNICAMP	25/05/00	<i>neoformans</i>	A	I
H 20	HC - UNICAMP	25/05/00	<i>neoformans</i>	A	I
H 21	HC - UNICAMP	25/05/00	<i>neoformans</i>	A	I
H 22	HC - UNICAMP	25/05/00	<i>neoformans</i>	A	I
H 23	HC - UNICAMP	25/05/00	<i>neoformans</i>	A	I
H 24	HC - UNICAMP	25/05/00	<i>neoformans</i>	A	I
H 25	HC - UNICAMP	25/05/00	<i>neoformans</i>	A	I
H 26	HC - UNICAMP	25/05/00	<i>neoformans</i>	A	I
H 27	HC - UNICAMP	25/05/00	<i>neoformans</i>	A	I
H 28	HC - UNICAMP	25/05/00	<i>neoformans</i>	A	I

HC - UNICAMP: Hospital de Clínicas da UNICAMP

PUCC II: Pontifícia Universidade Católica de Campinas – Campus II

8.2. ANEXO 2

CEPAS DE *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* ISOLADOS A PARTIR DE ESPÉCIMES CLÍNICOS, DA CIDADE E REGIÃO DE CAMPINAS.

CEPAS	PACIENTE	REGISTRO	MATERIAL CLÍNICO	DATA DA COLETA	PROCEDÊNCIA DO PACIENTE
1	JS 31	386448-9	LCR	07/05/96	**
2	RG 38	562495-6	LCR	30/08/96	Limeira
3	CBH 29	551551-1	LCR	13/09/96	Várzea Paulista
4	JES 56	552314-8	LCR	06/11/96	Indaiatuba
5	JBR 25	353979-3	LCR	22/11/96	Hortolândia
6	CGM 37	544580-5	LCR	27/11/96	Vinhedo
7	UCO 34	474724-8	LCR	29/11/96	Campinas
8	RR 52	532159-0	LCR	18/12/96	Sumaré
9	JB 30	503726-2	LCR	18/12/96	Itatiba
10	AAFS 49	516923-1	LCR	26/12/96	Campinas
11	JG 67	579546-8	LCR	23/01/97	Campinas
12	MB 57	492130-3	LCR	11/04/97	Jundiaí
13	JJC 39	392155-4	LCR	11/04/97	São Paulo
14	RWR 35	376719-8	LCR	22/04/97	S. J. da Boa Vista
15	SVN 20	591893-9	LCR	30/04/97	**
16	RP 36	224055-7	LCR	15/05/97	Campinas
17	GF 47	348931-8	LCR	13/05/97	V. Grande do Sul
18	HAS 28	583697-9	LCR	08/06/97	Mogi Guaçu
19	CAS 06	501676-7	LCR	03/07/97	Campinas
20	AAC 32	600550-9	LCR	07/07/97	Campinas
21	IR 22	372729-5	sangue	20/01/98	Perequê Açu
22	EHC 28	618431-1	LCR	05/03/98	Franca
23	JF 46	445537-6	pulmão	01/04/98	Campinas
24	ATD 16	633057-2	LCR	02/04/98	Americana
25	CRS 42	519091-5	pele	16/06/98	Pirassununga
26	MACA 33	556284-5	pulmão	18/06/98	Indaiatuba
27	AJ 28	650403-0	LCR	25/08/98	Indaiatuba
28	BOS 15	651391-8	LCR	14/09/98	Campinas
29	RTD 44	648978-3	BAL	17/09/98	V. Grande do Sul
30	GV 77	652724-6	BAL	17/09/98	S.C. das Palmeiras

31	JCC 29	664992-7	LCR	05/01/99	Engenheiro Coelho
32	CSS 44	664589-6	urina	19/01/99	Sumaré
33	OP 37	670280-2	LCR	03/03/99	**
34	JAA 39	674444-8	BAL	28/03/99	Indaiatuba
35	CDG 35	683226-5	LCR	07/06/99	Pedreira
36	NR 48	688602-8	LCR	23/07/99	S. J. do Rio Pardo
37	MLG 33	214157-8	LCR	04/08/99	Valinhos
38	MAPS 25	689170-2	LCR	10/08/99	Campinas
39	JFS 22	689339-0	LCR	14/08/99	Campinas
40	IFPS 32	690733-5	LCR	24/08/99	Cosmópolis
41	JAS 20	692105-6	LCR	30/08/99	Hortolândia
42	JRA 32	317699-1	sangue	01/10/99	Sumaré
43	SML 47	697972-2	urina	04/10/99	Serra Negra
44	JFS 44	701041-4	LAS	07/11/99	Campinas
45	GCF 43	917792-2	LCR	14/12/99	**
46	RAS 35	706123-3	LCR	27/12/99	Americana
47	ACRL 34	706166-5	LCR	29/12/99	Americana
48	MTW 31	222349-2	LCR	10/02/00	Campinas
49	JCGA 46	708801-1	LCR	18/02/00	Campinas
50	JRP 38	541768-8	LCR	29/04/00	Jaguariuna
51	AAAS 18	360610-6	LCR	17/03/95	Campinas
52	AAR 27	651753-0	LCR	12/11/97	Campinas

LCR: líquido céfalo raquidiano LAS: líquido ascítico BAL: lavado bronco alveolar

** localidade não identificada

8.3. ANEXO 3

CEPAS DE *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* ISOLADOS A PARTIR DE ESPÉCIMES CLÍNICOS, DA CIDADE E REGIÃO DE CAMPINAS.

CEPAS	SEXO	HIV	VARIEDADE	SOROTIPO	PERFIL (CE)
1	F	+	<i>neoformans</i>	A	C
2	M	+	<i>neoformans</i>	A	B
3	F	+	<i>gattii</i>	B	α
4	M	+	<i>neoformans</i>	A	**
5	M	+	<i>neoformans</i>	A	B
6	M	+	<i>neoformans</i>	A	B
7	M	+	<i>neoformans</i>	A	**
8	M	-	<i>neoformans</i>	A	C
9	F	+	<i>neoformans</i>	A	A
10	M	+	<i>neoformans</i>	A	B
11	M	-	<i>gattii</i>	B	α
12	M	-	<i>neoformans</i>	A	A
13	M	+	<i>neoformans</i>	A	**
14	M	+	<i>neoformans</i>	A	**
15	M	+	<i>gattii</i>	B	α
16	M	+	<i>neoformans</i>	A	**
17	F	+	<i>neoformans</i>	A	**
18	M	-	<i>neoformans</i>	A	B
19	M	+	<i>neoformans</i>	A	C
20	M	+	<i>neoformans</i>	A	I
21	F	+	<i>neoformans</i>	A	A
22	M	+	<i>neoformans</i>	A	M
23	M	-	<i>neoformans</i>	A	D
24	F	-	<i>neoformans</i>	A	J
25	M	-	<i>gattii</i>	B	α
26	F	-	<i>neoformans</i>	A	A
27	M	+	<i>neoformans</i>	A	A
28	F	-	<i>neoformans</i>	A	H
29	M	+	<i>neoformans</i>	A	B
30	M	-	<i>gattii</i>	B	α

31	M	+	<i>neoformans</i>	A	G
32	M	+	<i>neoformans</i>	A	**
33	M	+	<i>neoformans</i>	A	B
34	M	-	<i>neoformans</i>	A	C
35	M	+	<i>neoformans</i>	A	C
36	M	-	<i>gattii</i>	B	α
37	M	+	<i>neoformans</i>	A	A
38	M	+	<i>neoformans</i>	A	A
39	F	-	<i>neoformans</i>	A	E
40	F	+	<i>neoformans</i>	A	F
41	F	+	<i>neoformans</i>	A	**
42	M	+	<i>neoformans</i>	A	**
43	M	-	<i>neoformans</i>	A	D
44	M	+	<i>neoformans</i>	A	L
45	F	+	<i>neoformans</i>	A	K
46	F	+	<i>neoformans</i>	A	A
47	M	+	<i>neoformans</i>	A	N
48	M	+	<i>neoformans</i>	A	A
49	M	+	<i>neoformans</i>	A	A
50	M	+	<i>neoformans</i>	A	D
51	M	-	<i>gattii</i>	B	α
52	M	+	<i>neoformans</i>	A	A

F: feminino M: masculino (+): positivo (-): negativo ** perfil não identificado

8.4. ANEXO 4

CIM ($\mu\text{G/ML}$) DE ANFOTERICINA B (AMB), 5-FLUOROCITOSINA (5-FC), FLUCONAZOL (FLCZ) E ITRACONAZOL (ITCZ) DE CEPAS DE *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* ISOLADAS DE EXCRETAS DE POMBOS, NA CIDADE DE CAMPINAS.

CEPAS	AMB	5-FC	FLCZ	ITCZ
1M	1	1	2	0,25
2M	1	1	2	0,25
3M	1	1	4	0,25
4M	1	1	2	0,25
1P	0,5	1	4	0,25
2P	1	2	2	0,25
3P	1	4	4	0,25
4P	1	16	4	0,25
5P	1	4	2	0,25
1I	1	2	2	0,25
2I	1	4	2	0,25
3I	1	2	4	0,25
4I	1	2	4	0,25
5I	0,5	2	4	0,25
6I	1	1	4	0,25
7I	1	1	4	0,125
8I	1	1	4	0,25
9I	0,5	2	8	0,25
10I	1	2	4	0,25
11I	1	2	4	0,25
12I	1	2	4	0,25
13I	1	2	4	0,25
14I	0,5	2	4	0,25
15I	1	1	4	0,25
16I	0,5	2	4	0,25
17I	0,5	2	8	0,25
18I	1	1	2	0,25
1H	0,5	1	2	0,125
2H	0,5	2	2	0,25

3H	0,5	2	2	0,125
4H	1	2	2	0,25
5H	1	2	4	0,25
6H	1	2	4	0,25
7H	1	2	4	0,25
8H	1	2	4	0,25
9H	1	2	8	0,25
10H	1	1	4	0,25
11H	0,5	2	4	0,25
12H	1	2	2	0,125
13H	1	1	4	0,25
14H	1	2	4	0,25
15H	0,5	2	4	0,25
16H	1	1	4	0,25
17H	0,5	2	4	0,25
18H	1	2	4	0,25
19H	1	2	8	0,25
20H	1	2	4	0,25
21H	1	1	4	0,25
22H	1	1	4	0,125
23H	0,5	1	2	0,125
24H	1	2	2	0,25
25H	0,5	2	2	0,25
26H	1	1	4	0,125
27H	1	1	2	0,25
28H	0,5	1	2	0,125

8.5. ANEXO 5

CIM ($\mu\text{g/mL}$) de anfotericina B (AMB), 5-fluorocitosina (5-FC), fluconazol (FLCZ) e itraconazol (ITCZ) de cepas de *Cryptococcus neoformans* isoladas de espécimes clínicos, na cidade de Campinas.

CEPAS	AMB	5-FC	FLCZ	TCZ
1	1	1	2	0,25
2	1	0,5	2	0,25
3	1	1	8	0,25
4	0,5	1	4	0,25
5	1	1	2	0,25
6	0,5	0,5	2	0,25
7	1	0,25	4	0,25
8	1	1	4	0,25
9	1	1	8	0,25
10	1	4	1	0,125
11	1	1	4	0,25
12	1	1	4	0,125
13	1	0,5	0,25	0,125
14	1	0,5	4	0,25
15	1	1	4	0,25
16	1	1	2	0,25
17	1	1	8	0,25
18	1	0,5	4	0,25
19	1	1	2	0,125
20	1	1	2	0,125
21	1	4	4	0,25
22	0,5	1	2	0,25
23	1	2	2	0,25
24	1	1	2	0,25
25	1	4	4	0,25
26	1	2	2	0,25
27	1	0,5	2	0,25
28	0,5	2	2	0,25
29	1	1	4	0,25
30	1	2	16	0,25

31	1	1	2	0,25
32	1	0,5	1	0,25
33	1	1	4	0,25
34	0,5	1	8	0,25
35	1	1	2	0,25
36	1	1	16	0,25
37	1	1	2	0,25
38	0,5	1	2	0,125
39	1	1	2	0,25
40	0,5	1	2	0,125
41	1	2	2	0,125
42	1	1	2	0,25
43	0,5	1	2	0,125
44	0,5	1	4	0,25
45	1	1	4	0,25
46	1	2	8	0,25
47	1	2	4	0,25
48	1	2	8	0,25
49	1	2	4	0,125
50	1	1	4	0,25
51	1	8	8	0,25
52	1	2	4	0,25

8.6.1. Meios utilizados para a identificação de *C. neoformans***8.6.1.1. Ágar Sabouraud Dextrose (ASD)**

Ágar Sabouraud dextrose 4% 65 g (Merck)

H₂O destilada 1 L

- Autoclavar a 121°C durante 15 minutos
- Distribuir o meio em placas de Petri e/ou tubos inclinados.

8.6.1.2. Ágar “Cornmeal” com ácido caféico

Corn meal ágar 5,2 g (Difco)

Ágar 4 g (Merck)

Ácido Cafeico 90 mg (Sigma)

H₂O destilada 300 mL

- Autoclavar a 121°C durante 15 minutos.
- Distribuir o meio em placas de Petri.

8.6.1.3. Coloração da Tinta da China

Tinta da China 1 gota (Pelikan)

H₂O destilada 1gota

- Diluir 1/2 alçada da colônia de *C. neoformans*, cultivadas em SDA, em 1 gota de água destilada sobre uma lâmina. Posteriormente, colocar 1 gota de Tinta da China e cobrir com lamínula para observar a presença de cápsula ao microscópio (10X e 40X).

8.6.1.4. Ágar Uréia de Christensen

Petona 1 g (Difco)

Glicose 1 g (Synth)

Cloreto de Sódio 5 g (Merck)

Fosfato de Potássio Monobásico 2 g (Merck)

Fenol Vermelho	12 mg (Merck)
Ágar-agar	20 g (Merck)
H ₂ O destilada	1.000 mL

- Dissolver a peptona, o cloreto de sódio, o fosfato de potássio e o fenol vermelho em 1.000 mL de água destilada e ajustar o pH a 6,8. Posteriormente, dissolver o ágar em em banho Maria. Distribuir o meio em tubos e autoclavar a 115°C durante 15 minutos. Após o resfriamento do meio a 60 - 70°C, adicionar 0,5 mL de solução de uréia a 20% (Difco) em cada tubo. Em seguida, agitar e inclinar os tubos para a solidificação do meio.

8.6.2. Meio utilizado na identificação das variedades de *C. neoformans*

9.6.2.1. Meio de Canavanina-Glicina-Azul de Bromotimol (CGB)

Solução A

Glicina	10 g (Nuclear)
Fosfato de potássio monobásico	1 g (Merck)
Sulfato de magnésio	1 g (Merck)
Tiamina-HCL	1 mg (Nuclear)
L-arginina (L-canavanina)	30 mg (Synth)
H ₂ O destilada	100 mL

- Ajustar o pH para 5,6 e esterilizar a solução em filtro 0,45 µm (Advantec MFS).

Solução B

Azul de Bromotimol	0,4 g (Synth)
NaOH	64 mL (Difco)
H ₂ O destilada	100 mL

- Preparar separadamente as soluções A e B, através da mistura de seus componentes.

- Para preparar 1.000 mL do meio: misturar 880 mL de água, 20 mL da solução B e 20 g de ágar (Merck) e autoclavar a 120°C durante 15 minutos. À solução anterior ainda fundida, acrescentar 100 mL da solução A (com pH ajustado e esterilizada). Em seguida, o distribuir o meio aseticamente em tubos inclinados.

8.6.3. Soluções utilizadas no estudo do perfil de CE de *C. neoformans*

8.6.3.1. YEPD

Extrato de Levedura 1%	2 g (Difco)
Dextrose 2%	4 g (Synth)
Bactopeptona 2%	4 g (Difco)
H ₂ O destilada	200 mL

- Misturar os componentes e autoclavar a 121°C durante 15 minutos.

8.6.3.2. Citrato de sódio 1 M

Citrato de Sódio	29,41 g (Sigma)
H ₂ O destilada	q.s.p. 100 mL

- Ajustar o pH a 5,6 e autoclavar a 121°C durante 15 minutos.

8.6.3.3. EDTA 0,5 M

EDTA	93,05 g (Synth)
H ₂ O destilada.....	q.s.p. 500 mL

- Ajustar o pH a 7,8 ou 8,0 e autoclavar a 120°C durante 15 minutos.

8.6.3.4. Sorbitol 2,5 M

Sorbitol 45,55 g (Sigma)

H₂O destilada q.s.p. 100 mL

- Esterilizar a solução em filtro 0,45 µL (Adventec MFS).

8.6.3.5. Tampão Citrato de Sódio, EDTA, Sorbitol

Solução Estoque

Citrato de Sódio 20 mM, pH 5,6 1 mL 1M

EDTA 50 mM, pH 8,0 5 mL 0,5 M

Sorbitol 0,9 M 18 mL 2,5 M

H₂O destilada..... q.s.p. 50 mL

- Preparar em ambiente estéril, na hora.

8.6.3.6. Agarose Low Melt

Solução Estoque

Agarose Low Melt 2% 1 g (Pharmacia Biotech)

EDTA 125 mM, pH 7,5 12,50 mL 0,5 M

H₂O destilada q.s.p. 50 mL

- Autoclavar a 121C° durante 15 minutos.

8.6.3.7. Tris 1,0 M, pH 7,5 ou 8,0

Trizma base 30,3 g (Synth)

H₂O destilada q.s.p. 250 mL

- Ajustar o pH a 7,5 ou 8,0 e autoclavar a 121C° durante 15 minutos.

8.6.3.8. Lauroylsarcosine 10%

Lauroylsarcosine 10 g (Sigma)

H₂O destilada..... 100 mL

- Esterilizar em filtro de membrana de 0,45 µL (Advantec MFS).

8.6.3.9. Tampão NET-Prok

Quantidade da Solução Estoque

Tris 0,01 M, pH 7,5 1 mL 1 M

EDTA 0,45 M, pH 8,0 90 mL 0,5 M

Lauroylsarcosine 1% 10 mL 10%

- Adicionar Proteinase K 0,25 mg/mL , na hora.

8.6.3.10. TBE 5 X

Tris base 54 g

Ácido Bórico 27,5 g (Synth)

EDTA 0,5 M, pH 8,0 20 mL

H₂O destilada q.s.p 1.000 mL

8.6.3.11. TBE 0.5 X

Tbe 5 X 100 mL

H₂O destilada..... 900 mL

8.6.3.12. Gel para corrida

Tbe 0,5 X 100 mL
Agarose molecular grade 1 g (Pharmacia Biotech)

8.6.3.13. Tampão para correr o gel

Tbe 5 x 200 mL
H₂O destilada..... 1.800 mL

8.6.3.14. Brometo de etídio (solução estoque)

Brometo de Etídio 1 g (Sigma)
H₂O destilada..... 100 mL

- Concentração final 10 mg/mL

8.6.3.15. Brometo de etídio para corar o gel

Brometo de Etídio (10 mg/mL) 10 µL
H₂O destilada..... 100 mL

8.6.4. Meios de cultura utilizado no teste de suscetibilidade aos antifúngicos.

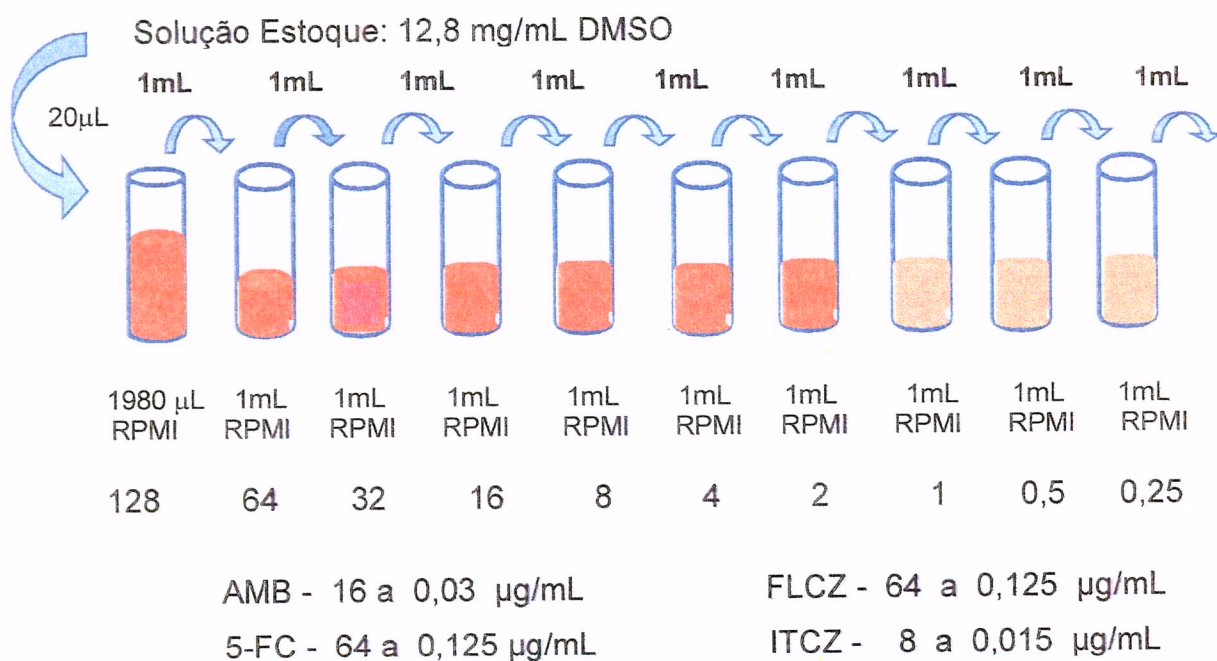
8.6.4.1. Meio RPMI – 1640, sem bicarbonato de sódio, com glutamina e vermelho de fenol; glicose 2%; tamponado com 0,165 mol/L de MOPS, segundo o NCCLS

RPMI – 1640 10,4 g (Gibco)
MOPS 0,165 mol/L 34,53 g (Dojindo)
Glicose 2% 20 g (Synth)

H₂O destilada q.s.p. 1.000 mL

- Ajustar o pH para 7,0 usando 1 mol/L de Hidróxido de Sódio
- Esterilizar o meio em filtro PES 0,22µ m (IWAKI).

PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO ESTOQUE E TRABALHO



PREPARAÇÃO DO INÓCULO

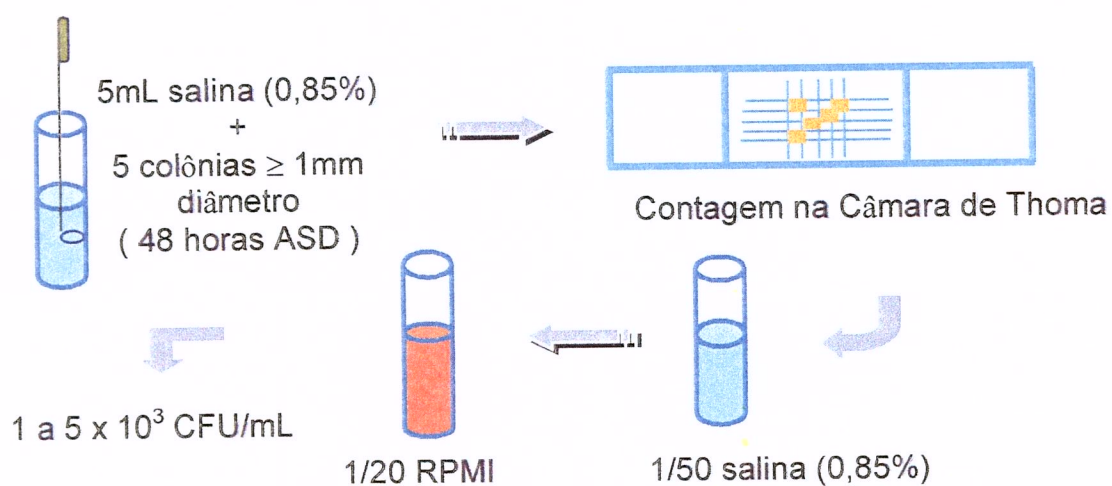
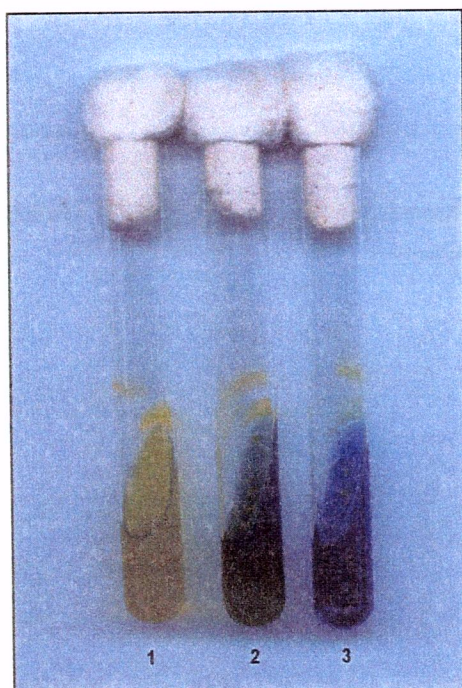




Figura 10: Cultura de *C. neoformans* em ágar Sabouraud dextrose (ASD)



Figura 11: Cultura de *C. neoformans* em ágar "Cornmeal" com ácido cafeico



1. CGB "puro",
2. *C. neoformans* var. *neoformans*,
3. *C. neoformans* var. *gattii*.

Figura 12: *C. neoformans* em meio de Canavanina-glicina-azul de bromotimo (CGB)

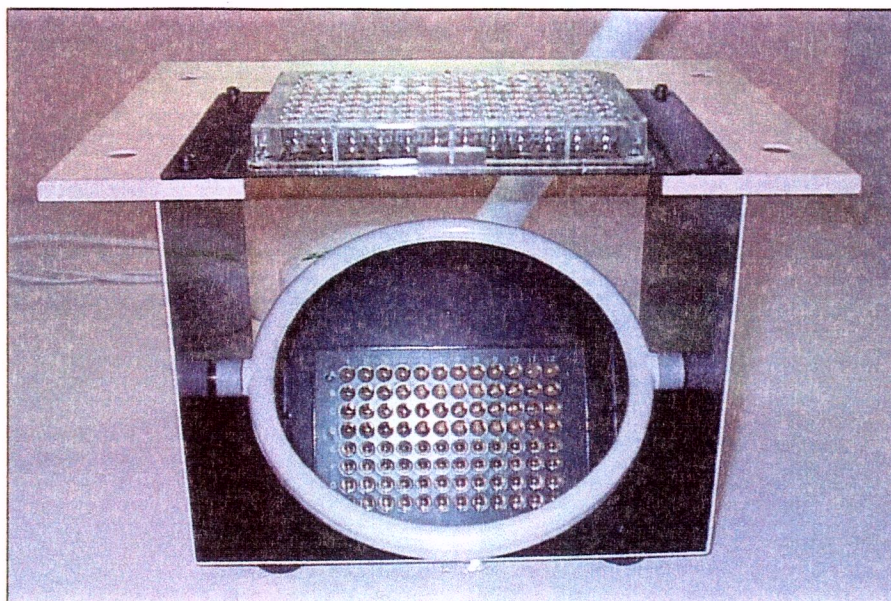


Figura 13: Microplaca de titulação e suporte contendo espelho reverso

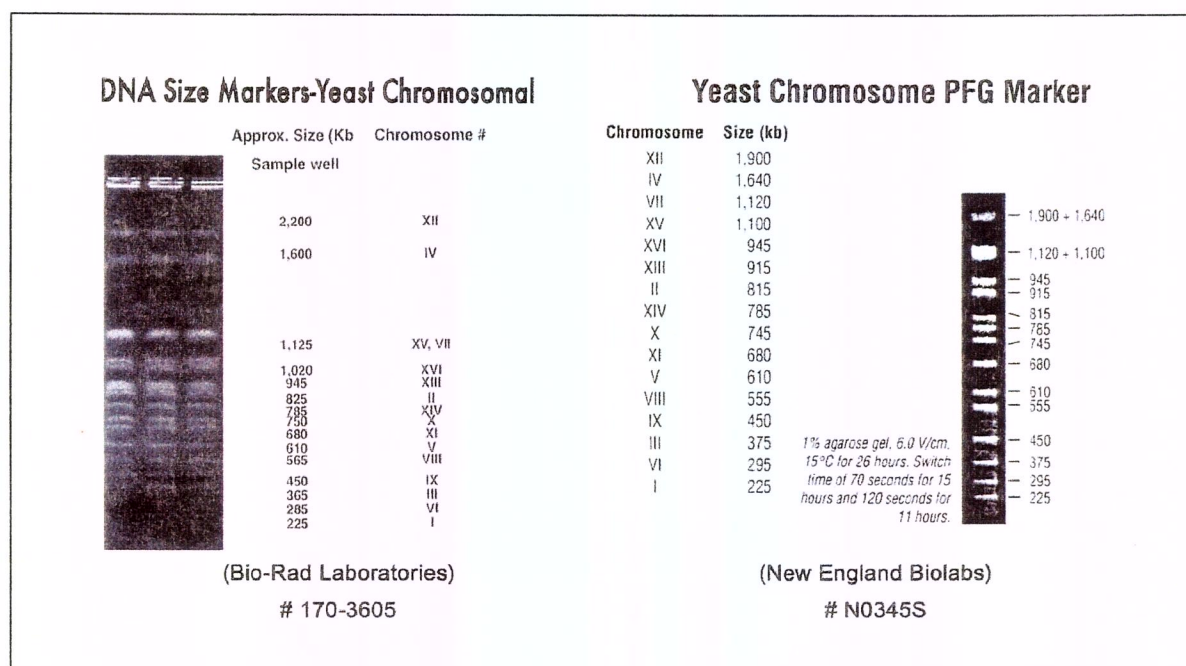


Figura 14: Padrão de peso molecular - *Saccharomyces cerevisiae*

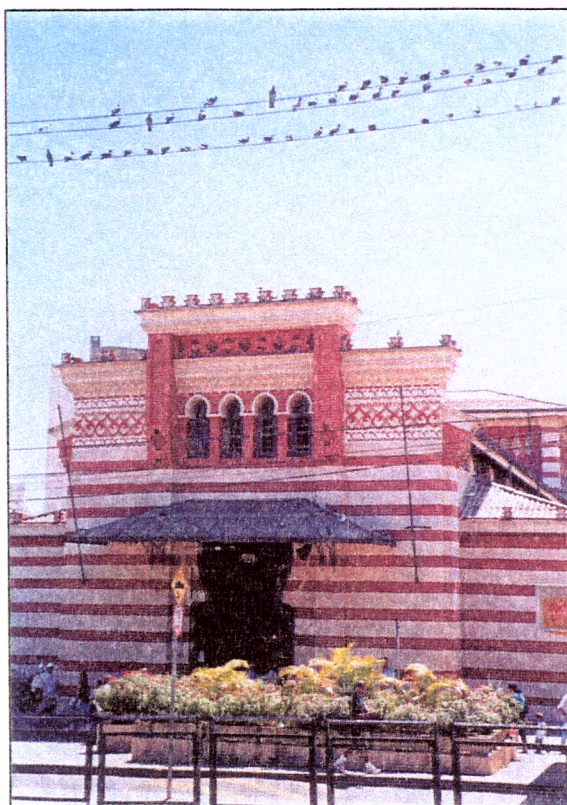


Figura 15: Mercado Central de Campinas



Figura 16: Largo do Rosário - Campinas