

ERRATA

Página 02 – Linha 09

Onde se lê: ... 19..., leia-se: ...39 espécies...

Página 03 – Linha 01

Onde se lê: ... dos isolados clínicos..., leia-se: ... das amostras clínicas...

Linha 04

Onde se lê: ... 4 µm a 6 µm de diâmetro..., leia-se: ... 4 µm a 6 µm a 30 a 34 µm de diâmetro...

Página 07 – Linha 03, 04, 08, 11 e 19

Onde se lê: ... e D., leia-se: ... ,D e AD.

Página 08 – Linha 09

Acrescentar a frase: De acordo com LAZERA ET. AL. as variedades *gattii* e *neoformans* tem sido isoladas de vários nichos e ambientes.

Página 11 – Linha 15

Acrescentar a frase: De acordo com avaliações mais recentes há diferenças clínicas de manifestação da criptococose em pacientes com AIDS, entre indivíduos imunossuprimidos de outra ordem e também entre os não imunossuprimidos.

Linha 18

Onde se lê: ... ,fragmentos, biópsias,... leia-se: ... ,fragmentos, aspirados de ...

Página 13

Suprimir linhas 18, 19, 20, 21 e 22

Página 14

Suprimir linhas 01 e 02.

Página 15 – Linha 06

Acrescentar : Porém, pode haver resistência secundária de até 20 a 30% para o antifúngico fluconazol, sendo que neste caso o MIC seria elevado.

Página 31 – Linha 04

Onde se lê: ...AIDS, na sua maioria..., leia-se: ... AIDS, em sua maioria ...

Página 33 – Linha 21

Onde se lê: ...Esses primers forma..., leia-se: esses primers foram...

Página 34 – Linha 20

Onde se lê: ...dos sorotipos..., leia-se: ... dos sorotipos....

Página 76 – Linha 13

Acrescentar a frase: Porém, há no Estado do Piauí, uma zona endêmica de variante *gattii* do *Cryptococcus neoformans*, sendo que mesmo assim, nos casos em que a criptococose acomete pacientes com AIDS, esta é causada pelo sorotipo A do *Cryptococcus neoformans*

Francisco Hideo Aoki

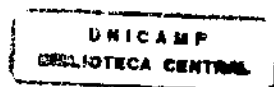
**Identificação de sequências como iniciadores
("primers") específicos para a caracterização em
cultura dos sorotipos A e B de *Cryptococcus neoformans*
pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).**

Pesquisa de sensibilidade a antifúngicos de *Cryptococcus neoformans*
isolados de pacientes atendidos no HC/UNICAMP.

Tese apresentada ao curso de Pós –
Graduação em Clínica Médica da Faculdade
de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção de
título de Doutor em Clínica Médica – Área de
Clínica Médica.

**Orientador : Prof. Dr. Marcelo de Carvalho Ramos
Professor Adjunto**

Campinas , 2000



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	A0431
V.	Ex.
TOMBO BC	42209
PROC.	56-2F8100
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 00,00
DATA	25/09/00
N.º CPD	

CM-00144788-0

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

A43i

Aoki, Francisco Hideo

Identificação de sequências como iniciadores ("primers") específicos para a caracterização em cultura dos sorotipos A e B de *Cryptococcus neoformans* pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) . / Francisco Hideo Aoki. Campinas, SP : [s.n.], 2000.

Orientador : Marcelo de Carvalho Ramos

Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. AIDS. 2. Criptococcose. I. Marcelo de Carvalho Ramos. II. Lívio Nanni. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Banca Examinadora da Tese de Doutorado

Marcelo Carvalho Ramos

Orientador(a): Prof.Dr. Marcelo de Carvalho Ramos

Membros:

1. Prof. Dr. Ronaldo Pires Mendes

2. Prof. Dr. Arnaldo Lopes Colombo

3. Prof. Dr. Piuscelo Mangue de Oliveira Papaiordanos

4. Prof. Dr. Rogério de Jesus Pires

5.

Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 03/04/2000

DEDICATÓRIA

A meu pai, Tadao Aoki, que pouco antes de deixar o nosso convívio escreveu um Hai – Kai , forma de poema japonês que se baseia nas estações do ano, sendo curtas e concisas e tentando traduzir o espírito do poema, lembro-me de que ao observar a pipa de cor vermelha sendo levada pelo vento, feita por ele para a primeira neta e na praia, já doente, dizia para quão longe e distante poderia voar aquela pipa sob o brilho daquele sol de verão, quente, brilhante e acolhedor. Pouco tempo depois nos deixava... e que esteja em um bom lugar.

À minha mãe, férrea batalhadora pela vida, tendo feito e fazendo tudo pela família e que junto de meu pai concederam-me esta possibilidade de estar na situação em que me encontro, felizmente ainda do nosso lado.

A meus irmãos e familiares, pelo apoio de sempre, nas horas mais necessitadas, sem os quais também não estaria nesta situação, aliás ninguém consegue SER sozinho.

À Rafaela, minha esposa, por tudo.

De e com todos, tento aprender as humanidades, a ética, a honestidade, a paciência, a bondade, o amor e a arte de viver.

Dôomu arigatô gozaimassu.

AGRADECIMENTOS

Irrestritamente a todos os profissionais da Disciplina de Moléstias Infecciosas deste DCM-FCM UNICAMP, do DCM e da FCM, desde os docentes, colegas assistentes, residentes, funcionários de todos os níveis que de uma maneira ou de outra sempre me incentivaram e continuam a batalhar pelo crescimento desta instituição, pela convivência nutridora de energias criativas e pelo esforço do trabalho do dia a dia, permitindo ousadias desenvolvimentistas, por pequenas que sejam, e por permitirem minhas ausências, que neste momento não estavam voltadas para o crescimento coletivo e sim quase que exclusivamente para o meu desenvolvimento individual. Muitas vezes colaboraram para o meu desenvolvimento, de fato, e não raras vezes me conduzindo.

Certamente todos colaboraram com esta empreitada, pois quase nada se pode fazer isoladamente.

Meus respeitos e muito obrigadíssimo.

AOS PACIENTES

Necessário se torna reafirmar todo o profundo respeito pelos pacientes, de uma forma geral, sem os quais não existiria nossa profissão, nossas pesquisas e pelos quais juramos dedicar nossas vidas.

Também meu muito obrigado.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos integrantes do “Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicosis” na pessoa do Prof. Makoto Miyaji , Coordenador do Centro, Prof. Yuzuru Mikami do setor de Biologia Molecular, Prof. Jun Uno do setor de estudos de sensibilidade, sem os quais esta pesquisa não teria sido realizada e também pelo apoio que vem dando ao desenvolvimento do convênio de Cooperação Bilateral Internacional, entre o Ministério de Relações Exteriores do Japão e do Brasil, através da JICA(Japanese International Cooperation Agency), fundamental para crescimento da pesquisa nesta área, nesta instituição.

Ao Prof. Kenichi Yamamoto, coordenador da parte japonesa, deste convênio de cooperação internacional e incansável batalhador pela causa deste convênio e também a todos os funcionários brasileiros e japoneses ligados a este trabalho.

Aos integrantes do Gastrocentro, especialmente por parte do Laboratório de Imunologia, pela acolhida da Laboratório de Pesquisa em Aids – infecções oportunistas, pois sem esta ajuda inicial este projeto de cooperação com o Japão não teria tido a oportunidade de se desenvolver, na medida em que hoje se encontra.

Ao laboratório de Biologia Molecular da Disciplina de Moléstias Infecciosas, coordenado pela Profa Maria Luiza Moretti Branchini, que depois de certo tempo passou a abrigar o Laboratório de Pesquisa em Aids – Infecções Oportunistas, desenvolvido por este projeto de cooperação, e assim permanecendo ambos, fundidos de forma harmoniosa.

Ao Prof. Marcelo de Carvalho Ramos, meu orientador.

A todos, meus agradecimentos.

SUMÁRIO

Sumário

Pág.

1. Introdução.....	1
1.1. Nomenclatura e características microbiológicas do <i>Cryptococcus neoformans</i>	2
1.2. Infecção humana e patogenicidade do <i>Cryptococcus neoformans</i>	9
1.3. O uso de drogas para o tratamento da criptococose.....	14
1.4. Emprego de técnicas moleculares na distinção de clones de <i>Cryptococcus neoformans</i>	16
1.4.1 Eletroforese em campo pulsado.....	16
1.4.2. Técnicas baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR).....	22
1.4.2.1. Métodos baseados em amplificação de seqüências arbitrárias do genoma: AP-PCR, RAPD, DAF.....	24
2. Objetivos.....	28
3. Material e Métodos.....	30
3.1. Microrganismos:.....	31
3.2. Determinação dos sorotipos por técnica de aglutinação.....	31
3.3. Extração de DNA cromossômico.....	32
3.4. RAPD (amplificação randômica utilizando iniciadores aleatórios).....	33
3.5. Extração e sequenciamento do DNA das bandas obtidas e consideradas típicas.....	34
3.6. Determinação de sorotipos por reação em cadeia de polimerase (PCR) usando novo conjunto de iniciadores.....	35
3.7. Determinação da sensibilidade à drogas.....	36
4. Resultados.....	41
4.1. Sorotipagem e análise genômica por RAPD de isolados de <i>C. neoformans</i>	42
4.2. Análise genômica por RAPD de amostras de isolados de <i>C. neoformans</i>	42
4.3. Determinação das seqüências das bandas de 695 e 448 pb.....	43
4.4. Desenho e utilização dos novos iniciadores para a detecção do sorotipo A.....	43
4.5. Desenho e utilização dos novos iniciadores para a detecção do sorotipo B.....	45
4.6. Pesquisa de sensibilidade aos antifúngicos para cepas de <i>C. neoformans</i>	46
4.6.1. Resultados das análises de cepas de <i>C. neoformans</i> procedentes de pacientes com infecção pelo HIV.....	47
4.6.2. Resultados de análises das cepas de <i>C. neoformans</i> procedentes de pacientes sem infecção pelo HIV.....	48
4.6.3 Resultados da análise da susceptibilidade 5-FC utilizando-se o meio YNB.....	49
TABELAS (1 A 9).....	51

FIGURAS (1 A 11)	61
5. Discussão	73
6. Conclusões	85
Referência bibliográficas	87
Fontes consultadas	102
Summary	104

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

AIDS – Acquired Immunodeficiency Syndrome
AMB – Anfotericina B
ATCC – American Type Culture Collection
bp – base pair
CE – Cariotipagem Eletroforética
CHEF – Contour-clamped Homogenous Electric Field
CIM – Concentração Inibitória Mínima
CFU – Colony formatting unit
5-FC – 5 - Fluorocitosina
DMSO – Dimetilsulfóxido
DNA – Ácido Desoxirribonucléico
EDTA – Ácido Etilenoaminotetracético
FCZ – Fluconazol
FUNG - Fungison
HCl – Ácido clorídrico
HIV – Human Immunodeficiency Virus
ICZ – Itraconazol
IFM – Institute of Food Management
KCZ - Cetoconazol
Kb – Kilobases
LBA – lavado broncoalveolar
mM – Milimolar
MIC – miconazol
ml - mililitro
µg – Micrograma
µl – Microlitro
µm - micrômetro
Mb – Megabase
MOPS – Ácido morfolinopropanossulfônico
NIH – National Institute of Health
Nm – nanômetro
NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards
pb – par de base
PCR – Polimerase Chain Reaction
PEG – Polietilenoglicol
PFGE – Pulsed-field Gel Electrophoresis
RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA
rpm – rotações por minuto
SDB – Saburaud dextrose broth
SDD – Sensibilidade dose dependente
TBE – Tris(hydroxymethyl) aminomethane
YNB – Yeast Nitrogen Broth
YNB+G – Yeast Nitrogen Broth+ Glucose

UFC – unidades formadoras de colônias

RESUMO

Resumo

A Criptococose, doença cosmopolita, causada pelo *Cryptococcus neoformans*, é conhecida há cerca de um século. A imunossupressão que decorre, tanto de tratamentos com esteróides e outros tipos de drogas, quanto de doenças degenerativas e infecciosas, facilita a multiplicação e o desenvolvimento desse agente tornando a doença importante, particularmente, nesses casos.

O aparecimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) ao final da década de 70 fez proliferar a criptococose, já que um dos efeitos daquela síndrome é o comprometimento acentuado das defesas dos pacientes.

Neste trabalho foram estudadas trinta e três cepas de *Cryptococcus neoformans* isoladas de vinte e quatro pacientes atendidos no Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas. Esses isolamentos foram obtidos de líquido, sangue e biópsia de pele.

As trinta e três cepas de *Cryptococcus neoformans* foram inicialmente sorotipadas, utilizando-se o "kit" comercial "Cryptocheck" (latron, Japan). Vinte e quatro dessas cepas, provenientes de dezenove pacientes portadores de Aids foram caracterizadas como do sorotipo A. Das nove cepas recuperadas de pacientes sem Aids, sete revelaram-se como sendo do sorotipo A e duas do sorotipo B.

Cepas de *C. neoformans* sorotipos A e B foram testadas pelo método da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com iniciadores comerciais aleatórios denominados R1, R2 e R3 para determinação do seu perfil genômico (RAPD). A partir desse perfil, foi selecionada uma banda de 695 pares de bases (pb) presente apenas no perfil do sorotipo A e uma de 448 pb do sorotipo B. Esses “amplicons” foram sequenciados e, a seguir, desenvolvidos dois pares de iniciadores a serem testados para caracterização dos sorotipos A e B.

Esses dois pares de iniciadores foram testados nas 33 amostras de *C. neoformans* previamente determinadas como sorotipos A ou B pela técnica de aglutinação. No caso do sorotipo A, de todas as amostras de referência testadas, bem como as isoladas de casos clínicos foi amplificada a sequência típica desse sorotipo (banda de 695 pb). Do mesmo modo, no sorotipo B a banda de 448 pb pode ser amplificada. A amplificação dessas seqüências específicas, utilizando os iniciadores estudados para ambos os sorotipos foi sensível e específica, quando comparados com o teste de aglutinação.

Para o estudo da Concentração Inibitória Mínima (CIM) as 33 cepas de *C. neoformans* foram testadas contra a Anfotericina B, o Itraconazol, o Fluconazol, a 5 – Fluorocitosina e a Anfotericina B comercial (Fungison®), de acordo com as normas do “National Committee for Clinical and Laboratorial Standards” (NCCLS).

As Concentrações Inibitórias Mínimas das várias drogas estudadas empregando-se o meio de RPMI 1640 para trinta e três cepas de *C. neoformans* foram: Anfotericina B: 0,25 a 2 µg/ml, Fungison: 0,03– 2µg/ml, FCZ: 0,5–32µg/ml; Itraconazol: 0,06–2 e 5-Fluorocitosina: 1–16 µg/ml.

Os resultados deste estudo trouxeram uma nova abordagem para a caracterização dos sorotipos A e B de *C. neoformans* com base na técnica da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), para o conhecimento dos padrões de sensibilidade de cepas colhidas entre nós aos principais agentes antifúngicos e, ainda, para a preocupante presença de cepas dose dependentes ao Fluconazol em pacientes com e sem infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV).

1 - INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1 Nomenclatura e características microbiológicas do *Cryptococcus neoformans*.

Durante muitos anos diversas controvérsias relacionadas com a nomenclatura do *Cryptococcus neoformans* foram estabelecidas. Assim, uma variedade de nomes foi dada para esse agente infeccioso, tais como: *Saccharomyces neoformans*, *Blastomyces neoformans*, *Cryptococcus hominis* e *Torula histolytica*.

São conhecidas hoje dezenove espécies do gênero *Cryptococcus*, caracterizadas como leveduras, que brotam encapsuladas. Mesmo havendo outras espécies patogênicas, a de maior importância é a espécie *Cryptococcus neoformans*, uma levedura usualmente esférica, da qual duas variedades são descritas, o *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* e o *Cryptococcus neoformans* var. *gatti*. Nos meios de cultivo laboratoriais de rotina as colônias de *C. neoformans* desenvolvem-se em 36 a 72 horas, apresentando-se brancas ou coloridas, cremosas e opacas e podem ter diversos milímetros de diâmetro. As colônias podem também desenvolver setores que diferem entre si na pigmentação. São tipicamente mucóides e esse aspecto está diretamente relacionado à quantidade de produção de uma cápsula(Figura 1). Colônias constituídas de células produtoras de cápsulas espessas podem coalescer e, lentamente, escorrer no meio de cultura do tubo de ensaio colocado obliquamente ou, quando em placas, gotejar quando se a inverte (Figura 1)(MITCHELL & PERFECT, 1995).

Por visão microscópica a maioria dos isolados clínicos parece ser esférica, florescendo ou formando um botão(**Figura 2**). Raramente, formas de hifas curtas podem ser vistas. Além dessas, variantes filamentosas já foram observadas.

Essas leveduras variam em tamanho de 4µm a 6µm de diâmetro, são ovais ou esféricas e exibem brotamentos, tanto únicos, quanto múltiplos(**Figura 3**). Dado que esses brotos são ativamente destacados das células mãe, a maioria delas parece perdê-los quando incubadas em meios de cultura ou em tecido vivo. A marca registrada do *C. neoformans* é sua cápsula, que pode ser visualizada com a técnica da tinta China.

A espessura da cápsula é determinada geneticamente, bem como pelas condições de crescimento. Para uma determinada cepa a sua produção “in vitro” pode ser otimizada pelo cultivo em meio líquido ou sólido na presença de glicose a 1%, tiamina a 1µg/ml, glutamato a 1µg/ml, pH neutro (=7.0), temperatura de 37°C, elevada concentração de CO₂ e baixa concentração de Ferro (DYKSTRA, FIREDMAN, MURPHY, 1977; GRANGER, PERFECT, DURACK, 1991; LITTMAN,1958; VARTIVARIAN ET.AL., 1993). Por outro lado, a produção da cápsula pode ser reduzida “in vitro” pelo crescimento a baixas temperaturas, sob condições de alta osmolaridade (16% de glicose ou 2,9% de NaCl) ou pH ácido (DYKSTRA, FIREDMAN, MURPHY, 1977; GRANGER, PERFECT, DURACK, 1991; ISHAQ, BULMER, FELTON, 1967; LITTMAN,1958; VARTIVARIAN ET. AL., 1993).

Ambas as variedades de *C. neoformans* podem ser encontradas na natureza e residem em nichos ambientais separados. O *C. neoformans* var.

neoformans tem sido isolado de solo e “habitat” de aves (LEVITZ, 1991). Ele prospera e é enriquecido por compostos com nitrogênio presentes em guano (fezes de aves) (EMMONS, 1951, 1955), o que propicia ambiente adequado para manutenção do fungo. Embora funcionem como amplificadores desse microrganismo, os pássaros não se infectam, provavelmente, por causa de sua temperatura corpórea que é inadequada ao crescimento do fungo. Nas áreas de ninhos de aves as células do fungo são leveduriformes e possuem cápsulas mínimas(Figura 4; Figura 5) e, por esta razão, são secas e facilmente suspensas no ar (BULMER,1990; NEILSON, FROMTILING, BULMER, 1977; RUIZ & BULMER, 1980). Nesse estado são menores e, portanto, capazes de serem inaladas até o nível dos alvéolos (NEILSON, FROMTILING, BULMER, 1977; POWELL ET. AL., 1972).

O *C. neoformans* tem requisitos mínimos para crescimento com relação à fontes de carbono e nitrogênio e mesmo suplementos vitamínicos, como a tiamina, não são necessários (BRUATTO, VIDOTTO, MAINA, 1992). Na maioria das vezes, em meio completo e a 37°C, a fase exponencial de crescimento é alcançada em 2 a 6 horas de incubação (MILLER ET. AL., 1990). Ele não se desenvolve tão rapidamente como outras leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans* sob condições idênticas. Ao contrário de outras espécies de *Cryptococcus*, a capacidade do *C. neoformans* em utilizar compostos nitrogenados de baixo peso molecular, como a creatinina pode explicar parcialmente o fato de ser o seu nicho ecológico em guano de aves.

A temperatura é um importante sinal do meio ambiente para o *C. neoformans* crescer. Outras espécies de *Cryptococcus* não são capazes de se desenvolver a 37°C e, portanto, não são patogênicas para os humanos. Temperaturas de 39°C a 40°C “in vitro” reduzem significativamente sua taxa de crescimento, as leveduras sofrem vacuolização intracelular e produzem modelos de brotos aberrantes e outras estruturas, como as pseudohifas. O *C. neoformans* var. *gatti* é mais sensível a altas temperaturas e quando incubados a 40°C, ocorre a morte da maioria das amostras em 24 horas.

Algumas dessas características de crescimento do *C. neoformans* têm sido aproveitadas para sua identificação. Na presença de uréia, a maioria das amostras excretam grandes quantidades de urease, possibilitando a execução do teste de “urease rápida” (JACOBSON, E. S., 1993; JACOBSON, E. S.; JENKINS, N. D.; TODD, J. M., 1994; JACOBSON, E. S.; TINNEL, S.B., 1993) . A presença desta enzima, que oxida substratos difenólicos e leva à produção de melanina, além de ser usada para identificação é considerada um alvo potencial para a quimioterapia anticriptocócica (IKEDA, R.; SHINODA, R.; MORITA, T.; JACOBSON, E. S., 1993; JACOBSON, E. S., 1993; WILLIAMSON, P.R., 1994)

Além dos já citados, a captação de ácido t-málico, o teste da repressão da enzima creatinina deaminase e a capacidade de usar glicinas têm sido usados para diferenciar as duas variedades (*gatti* e *neoformans*) “in vitro”. Todas as espécies de *Cryptococcus* não são fermentativas, hidrolizam amido e assimilam inositol. Estas características, bem como os achados morfológicos da cápsula e a rara presença de pseudo-hifa (BLACKSTOCK, R.; HALL, N. K., 1982; ERKE, R.

H. K., SCHNEIDAU, Jr., J. D., 1973; RODRIGUES DE MIRANDA, L., 1984), distingue-as de outras leveduras importantes clinicamente.

As condições ambientais requeridas para a reprodução sexual do *Cryptococcus neoformans* sugerem que esse evento está sob controle nutricional. Geralmente, os acasalamentos ocorrem em meios não enriquecidos, tais como o suco "V-8", infusão de agar e temperatura abaixo de 37°C. As melhores condições para a meiose ocorrem à temperatura ambiente em atmosfera de concentração elevada de CO₂. Esses sinais ambientais, portanto, devem ser relacionados à privação de nitrogênio. Estudos feitos por MOORE & EDMAN (1993) indicam que as células de *C. neoformans* transcrevem, processam e secretam feromônios em resposta à essa privação. Recentes avanços em biologia molecular permitiram a investigação destes sinais para a expressão e regulação de genes ligados à reprodução.

Diversas técnicas têm sido utilizadas para caracterizar clones de *Cryptococcus neoformans*, bem como o seu parentesco em estudos epidemiológicos, que incluem: sorotipagem, cariotipagem eletroforética, utilização de sondas de DNA ribossomal e a reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se diversos iniciadores.

Dentre estas técnicas, a sorotipagem baseada em constituintes da cápsula tem sido considerada como referência. Algumas associações entre o sorotipo e algumas características da doença provocada foram aventadas como, por exemplo, a participação do sorotipo A na maioria dos casos de criptococose em pacientes com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida(AIDS).

Quatro sorotipos diferentes de *C. neoformans* são definidos por técnicas de imunofluorescência ou aglutinação, com base na especificidade antigênica do polissacáride capsular, a saber: A, B, C e D. Os *C. neoformans* var. *neoformans* apresentam os sorotipos A e D sendo que algumas cepas reagem com os antisoros. Os sorotipos B e C pertencem ao *C. neoformans* var. *gattii*. A maioria dos isolamentos clínicos podem ser classificados nesses sorotipos mencionados.

Os sorotipos B e C são classificados como *C. neoformans* var. *gattii* por causa de diversas características que os distinguem dos sorotipos A e D (ELLIS & PFEIFFER, 1987, 1990; PFEIFFER & ELLIS, 1993). Uma dessas razões é que esses sorotipos formam estados perfeitos (sexuados) denominados *Filobasidiella neoformans* var. *bacillispora*. Os sorotipos A e D também têm sido isolados em todo o mundo, mais frequentemente em fezes de pombos. O habitat natural dos sorotipos B e C não é bem conhecido e parece estar associado com o florescimento de árvores como o *Eucalyptus camaldulensis* nas regiões tropicais e subtropicais. No Brasil esses sorotipos também foram identificados em fezes de morcegos. Existem diferenças bioquímicas entre os sorotipos citados. A maioria dos sorotipos B e C assimilam os ácidos t-málico, fumárico e succínico; produzem pigmento verde em agar-niger e assimilam glicina como única fonte de carbono, enquanto os sorotipos A e D não o fazem. O agar contendo L-canavanine, glicina e azul-timol é útil na distinção entre as variedades *neoformans* (sorotipos A e D) e *gatti* (B e C). Baseado no estudo da composição do DNA e homologia de seqüências, há diferenças entre os sorotipos A e D em relação aos sorotipos B e C. Comparados a isolados clínicos de *C. neoformans* var. *neoformans*, os

isolados da variedade *gattii* (sorotipos B e C) isolados do meio ambiente são mais virulentos em modelos animais. As diferenças cariotípicas observadas entre esses isolados sugerem que um rearranjo cromossômico pode ocorrer quando da infecção "in vivo".

Os sorotipos A e D tem sido isolados de solo e excretas de aves, especialmente pombos. Os sorotipos B e C só foram isolados recentemente da natureza na Austrália e em São Francisco em associação com eucaliptos (ELLIS & PFEIFFER, 1987, 1990, 1992; PFEIFFER & ELLIS, 1991) e também em guano de morcegos no Brasil (LAZERA, WANKE, NISHIKAWA, 1993).

A cápsula de polissacáride é um polímero longo e não ramificado, um α -1,3-mannam com ramos de monossacárides de xilose e ácido glicurônico (BHATTACARJEE, BENNETT, CLAUDEMANS, 1984).

Há controvérsias acerca da relação entre a virulência da cepa e a cápsula polissacarídica do *Cryptococcus neoformans*. Em estudos experimentais em camundongos, o tamanho da cápsula não parece ser relacionado à virulência, embora ela seja reduzida em mutantes não encapsulados. Entretanto, a cápsula deve conferir diversas propriedades ao microrganismo que afetam a resposta à infecção. A doença humana devida à essas cepas livres de cápsulas ou com cápsula pequena tem uma resposta imunológica do hospedeiro mais vigorosa, processo inflamatório mais acentuado e desenvolve-se com menor patogenicidade (KOZEL & KAZIN, 1971; FARMER & KOMOROVSKI, 1973; LEVINSON ET. AL., 1974; FROMTLING, SHADOMY, JACOBSON, 1982; MILCHGRUB, VISCONTI, AVELLINI, 1990).

As cepas do sorotipo A de *Cryptococcus neoformans* variam tanto em virulência, quanto no tamanho da cápsula formada "in vitro". A glicoronilomannam (GXM) é, provavelmente, responsável por muitas das propriedades patobiológicas atribuídas à cápsula. Ela parece inibir, sob condições apropriadas, a fagocitose do fungo e a produção de anticorpos específicos. Por outro lado, a GXM é potente ativador da via alternativa do complemento.

1.2 Infecção humana e patogenicidade do *Cryptococcus neoformans*.

Há um contraste entre a elevada frequência de isolamento desse agente no solo e "habitat" de aves e a incidência de doença na população em geral. A inalação de células leveduriformes deve ocorrer de modo frequente, porém um sistema de imunidade mediada por células e de fagocitose competentes provêem fortes defesas contra a criptococose. Epidemias de criptococose originadas por fonte comum parecem não ocorrer (SWINNE ET. AL., 1989).

A extensão da infecção com conseqüências sub-clínicas é desconhecida porque não têm sido desenvolvidos testes antigênicos cutâneos adequados, que permitam um levantamento epidemiológico da prevalência dessa infecção. Entretanto, alguns estudos sorológicos indicam que indivíduos saudáveis possuem anticorpos contra o *Cryptococcus neoformans* (KENT & LAYTON, 1962; KELLER, PFROMMER, KOZEL, 1994; MIYAGAWA ET. AL., 1982).

A despeito de ser raro o seu isolamento do trato respiratório de indivíduos saudáveis, o *Cryptococcus neoformans* não é um membro da flora microbiana normal de humanos ou animais (DUPERVALL ET. AL., 1977). Além disso,

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

epidemias de criptococose originadas por fonte comum parecem não ocorrer (SWINNE ET. AL., 1989)

Embora essa doença seja observada também em pacientes que não são aparentemente imunocomprometidos, a maioria deles possui condições mórbidas pré-existentes. Essas condições, em ordem de importância, são: a AIDS, o tratamento com corticosteróides, os transplantes de órgãos, as leucemias crônicas, os linfomas e a sarcoidose.

Mesmo antes da epidemia de AIDS, a criptococose ocorria mais freqüentemente em homens do que em mulheres. Curiosamente, a despeito do grande número de crianças imunossuprimidas, a incidência de criptococose em pacientes com idade abaixo da puberdade é rara.

A criptococose é uma das principais doenças provocadas por fungos entre pacientes com AIDS ao lado da candidíase (CHUCK & SANDE, 1989; KOVACS ET. AL., 1985; ROZENBAUN & RIO GONÇALVES, 1994; STANSELL, 1993; ZUGGER ET. AL., 1986). Em muitos pacientes o seu diagnóstico é a primeira indicação para se pensar na existência dessa síndrome. A letalidade da doença entre esses pacientes tem sido estimada entre 6 a 10% nos Estados Unidos, Europa Ocidental e Austrália e 15 a 30% na região africana do Sub-Saara (POWDERLY, 1993). Essa taxa é particularmente elevada no sudeste dos Estados Unidos e África equatorial (CLARK ET. AL., 1990; POWDERLY, 1993). A letalidade a curto prazo em pacientes tratados é estimada em 10% a 25% sendo que a maioria dos pacientes morre no primeiro ano do diagnóstico (30 a 60%) (POWDERLY, 1993).

Mesmo em áreas geográficas endêmicas para o *Cryptococcus neoformans* var. *gatti*, os pacientes com AIDS são infectados quase exclusivamente com *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* do sorotipo A. Entretanto, na França, onde o sorotipo D tem sido historicamente mais encontrado, dentre 273 casos que foram analisados de 1990 a 1992, 17% foram causados pelo sorotipo D sendo que 80% deles eram em pacientes infectados pelo Vírus da Imunodeficiência Humana(HIV) (DROMER ET. AL., 1994).

As manifestações clínicas da criptococose tendem a ser semelhantes entre pacientes com ou sem AIDS, entretanto, certos achados são mais comuns nos últimos. Nesses, os sítios da infecção criptocócica usualmente contêm uma quantidade elevada de criptococos e poucas células inflamatórias. Além do Sistema Nervoso Central há também uma elevada freqüência de recuperação do agente em culturas de urina e sangue e de outros sítios de acometimento (DISMUKES, 1988; ENG, BISHBURG, SMITH, 1986; KOVACS ET. AL., 1985; ZUGER, 1986).

O diagnóstico da doença é feito geralmente pela demonstração direta do parasita. Espécimens clínicos como: líquido, tecidos, escarro e outras amostras de secreção do trato respiratório, fragmentos, biópsias, aspirados de lesões cutâneas, dentre outros, podem ser examinados através da preparação com tinta da China para visualização de células leveduriformes encapsuladas. Em preparações úmidas de material fresco as paredes celulares das leveduras parecem ser refringentes e as células freqüentemente contêm vacúolos esféricos em movimento "Browniano". As cápsulas podem variar em espessura de uns

pouco micrômetros até a largura igual ou superior ao diâmetro da célula. Em secções teciduais, leveduras encapsuladas parecem ser circundadas por largos espaços vazios por causa da pobre tintura da cápsula e da distorção da preparação. Como já assinalado, a resposta inflamatória em tecido vai, desde mínima até granulomatosa.

O *C. neoformans* pode ser isolado, ainda, na maioria dos meios bacteriológicos ou micológicos de rotina para fins de diagnóstico. Para culturas de sangue o método mais sensível parece ser o processo de lise-centrifugação (TARRAND, 1991).

A sorologia para o diagnóstico de criptococose baseada na pesquisa de anticorpos não tem utilidade clínica, porém o achado de antígeno presente na cápsula do criptococo em vários fluidos corporais tem sido útil para o diagnóstico da doença (CHUCK & SANDE, 1989). Além disso, como durante a infecção a cápsula de polissacáride se torna solubilizada nos fluídos corpóreos, este antígeno pode ser detectado e quantificado utilizando-se antisoro de coelho.

O método mais utilizado para titulação desse antígeno é o teste de aglutinação com látex. Os reagentes para esse teste são comercialmente disponíveis na forma de "kit". A aglutinação positiva na diluição de 1/4 sugere fortemente a infecção criptocócica. Títulos maiores que 1/8 usualmente indicam doença ativa, como se observa na maioria dos pacientes com AIDS. Quando da realização de testes sorológicos deve-se incluir controle, constituído de partículas de látex revestidas de globulina normal de coelhos para detectar a aglutinação não específica que ocorre no soro quando existe nele fator reumatóide

(BENNETT & BAYLAY, 1989). A maioria dos resultados falso positivos são causados pela presença desse fator, que também pode ser eliminado tratando-se o espécimen com ditioneitol e fervendo com EDTA (GORDON & LAPA, 1974; GRAY & ROBERTS, 1988).

Pacientes com infecção pelo HIV e criptococose pulmonar primária (sem disseminação) podem ter testes falso negativos para o antígeno criptocócico no soro (TAELMAN, 1994). Apesar disso, em estudo prospectivo de lavado broncoalveolar (LBA) de pacientes infectados pelo HIV, oito pacientes que desenvolveram pneumonia criptocócica tinham títulos de antígeno acima de 1/8 (BAUGHMAN, 1992). Entre pacientes com meningoencefalite criptocócica, resultados falso negativos obtidos no líquido céfalo-raquiano são raros, conforme bem documentado em diversos estudos (BERLIN & BALLEY, 1989; CURRIE ET. AL., 1993; HAMILTON ET. AL., 1991; HOFFMANN, STENDERUP, MATHIESEN, 1991).

Testes falso negativos podem ser causados por baixos níveis de antígeno, presença de complexos imunes, altos títulos de antígeno, infecção com amostra de *Cryptococcus neoformans* pobremente encapsulada ou não encapsulada.

A partir dos anos 80 foram iniciadas as pesquisas para padronização de testes de sensibilidade aos antifúngicos para leveduras (National Committee for Clinical Laboratory Standards – NCCLS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved Standard. Wayne, Pa, NCCLS, 1997).

Entre as diferentes provas para os testes de sensibilidade, a microdiluição em caldo tem sido a mais utilizada por ser de fácil execução e permitir análise de

1.3 O uso de drogas para o tratamento da criptococose

Para a maioria dos isolados de *Cryptococcus neoformans*, as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de Anfotericina B (AnfB), 5 fluorocitosina (5 FC) e os compostos azólicos são baixas (GHANNOUM, ET. AL., 1992; SHADOMY & PFALLER, 1991).

A partir dos anos 80 foram iniciadas as pesquisas para padronização de testes de sensibilidade aos antifúngicos para leveduras (National Committee for Clinical Laboratory Standards – NCCLS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved Standard. Wayne, Pa, NCCLS, 1997).

Os métodos utilizados para o teste “in vitro” de agentes anti-fúngicos contra uma variedade de leveduras, incluindo o *Cryptococcus neoformans*, têm sido padronizados com respeito aos meios de cultura utilizados e tamanho do inóculo. (ESPINEL-INGROFF ET. AL., 1992; FROMTILING ET. AL., 1993; NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS – NCCLS, 1997). Dentre as diferentes provas para os testes de sensibilidade, a microdiluição em caldo tem sido a mais utilizada por ser de fácil execução e permitir a análise de grande número de amostras. Entre os vários meios de cultivo empregados nessa técnica para os estudos com criptococos, o RPMI 1640 com L-glutamina e o YNB (yeast nitrogen base) têm sido os preferidos pelo alto índice de concordância entre laboratórios (ANAISSSE, 1993).

A frequência de cepas de *Cryptococcus neoformans* resistentes à 5-fluorocitosina (5-FC) tem sido, em geral, menor que 2% das amostras testadas (POLACK, 1992). Há relação entre a recidiva clínica e a maior Concentração Inibitória Mínima (CIM) desse agente, conforme já foi demonstrado em casos de meningoencefalites e pneumonias (UTZ, SHADOMY, McGEHEE, 1972, 1975; KERKERING, DUMA, SHADOMY, 1981).

A Anfotericina B (AnfB) é universalmente ativa contra isolados de *Cryptococcus neoformans*. As CIMs são geralmente baixas e pouco variáveis. Há, segundo pudemos apurar, somente um relato de caso clínico que envolveu uma amostra resistente à anfotericina B detectada através do E-teste (BODENHOFF, 1968). Com os regimes atuais de tratamento mesmo em pacientes severamente comprometidos, a maioria das falhas não são relacionadas diretamente ao desenvolvimento de resistência direta.

Os derivados azólicos que compreendem: o miconazol (MIC), cetoconazol (KCZ), fluconazol (FCZ) e itraconazol (ICZ) também têm sido usados para tratar a criptococose. Esse uso tem sido mais intenso desde o início da pandemia de AIDS. Esses compostos possuem atividade inibitória "in vitro" contra a maioria dos isolados de *Cryptococcus neoformans*. Entretanto, a maioria das recaídas clínicas observadas se deu com cepas que conservavam a CIM inicial e a tipagem molecular desses isolados indicaram que eram recaídas ao invés de reinfecções (CASADEVALL ET. AL., 1993). Estas recaídas em pacientes com AIDS em uso de azóis parecem não representar a emergência de amostras resistentes e sim a falha das defesas do hospedeiro na erradicação do patógeno.

1.4 Emprego de técnicas moleculares na distinção de clones de *Cryptococcus neoformans*

Vários sistemas de tipagem molecular têm sido utilizados no estudo da epidemiologia molecular do *C. neoformans*, a saber: análise do DNA através do tamanho dos fragmentos gerados por enzimas de restrição (RFLP), tipagem eletroforética determinada pelo padrão de isoenzimas, variação alélica do locus UEA5, análise do DNA cromossômico em gel através de eletroforese em campo pulsátil (PFGE), análise de DNA por técnicas baseadas em PCR, sendo que a mais utilizada é a amplificação polimórfica aleatória (RAPD) e "fingerprinting" de DNA com sondas de DNA genômico, sondas de DNA mitocondrial e sondas de oligonucleotídeos homólogos à sequências microsátélites (VARMA & KWON – CHUNG, 1989; PERFECT, MAGEE & MAGEE, 1989; CASADEVALL ET. AL., 1992; BRANDT ET. AL., 1993; CRAMPIN ET. AL., 1993).

1.4.1. Eletroforese em campo pulsado

Na análise do DNA cromossômico através da eletroforese em campo pulsado (cariotipagem eletroforética – CE), é possível a separação de moléculas de DNA de até 2 megabases(Mb) com excelente resultado. Submete-se o gel contendo o DNA extraído do microrganismo à corrente elétrica alternando-se a sua direção em curtos períodos, de acordo com programação estabelecida previamente (SCHWARTZ & CANTOR, 1984; GOERING,1993). O PFGE possui diferentes sistemas, sendo que todos permitem obter a resolução de moléculas de grande peso molecular, podendo existir diferença entre eles, tanto na velocidade de separação de moléculas, quanto na resolução obtida em alguma banda de

tamanho específico. Dentre esses sistemas, podemos citar: Orthogonal Field Alternating Gel Electrophoresis (OFAGE), Transverse Alternating Field Electrophoresis (TAFE), Field Inverse Gel Electrophoresis (FIGE), Contour-Clamped Homogeneous Electric Field Electrophoresis (CHEF), Rotating Gel Electrophoresis (RGE), Zero Integrated Field Electrophoresis (ZIFE) e o Programmable Automomously Controlled Electrodes Electrophoresis System (PACE).

No sistema CHEF, o mais aplicado, utiliza-se o princípio da eletrostática para corrente elétrica homogênea usando-se 24 eletrodos, dispostos de forma hexagonal em uma cuba de eletroforese. A voltagem originada em módulo fornecedor tem a distribuição feita através desses eletrodos. O gradiente de voltagem incide de forma constante no gel em ângulo e com intervalos previamente determinados (CHU, VOLLRATH & DAVIS, 1986).

POLACHECK & LEBENS em 1989 fizeram as primeiras publicações sobre a separação de cromossomos dos quatro sorotipos já mencionados de *C. neoformans*, com base numa modificação da técnica OFAGE em isolados, tanto de fontes naturais quanto clínicas. Essa Cariotipagem Eletroforética (CE) de *C. neoformans* mostrou três diferentes perfis. Os isolados de *C. neoformans var. gatti* (sorotipos B e C) apresentaram perfis similares de CE, com nove cromossomos maiores que 580 Kb. Isolados do sorotipo A (variedade *neoformans*) exibe padrões similares entre si, apresentando oito cromossomos maiores que 700 Kb. Porém, os isolados do sorotipo D (variedade *neoformans*) mostraram diferentes perfis à CE.

Empregando o sistema CHEF de eletroforese, PERFECT, MAGEE & MAGEE em 1989, demonstraram que o tamanho dos cromossomos de *C. neoformans* é similar ao tamanho dos cromossomos do *Saccharomyces cerevisiae* e de *Candida albicans*. Houve variação de cerca de 10 a 12 bandas entre as cepas examinadas. Cada amostra apresentou um padrão único e reprodutível de bandas. Nesse trabalho, o número de cromossomos foi maior do aquele relatado por POLACHEK & LEBENS (1989) desta feita empregando a técnica OFAGE, sem referência à fonte de isolamento das amostras de *Cryptococcus*.

Amostras do meio ambiente de *C. neoformans var. gatti*, retiradas de *Eucalyptus camaldulensis* da Austrália e São Francisco (EUA) foram sorotipadas, submetidas a testes de virulência em camundongos, cariotipadas eletroforéticamente através de CHEF e também realizados testes de hibridização com sondas de DNA específicas. Ao lado dessas, amostras clínicas de sorotipo B isoladas de vários locais foram comparadas com essas cepas provenientes de *Eucalyptus* através da CE. As cepas isoladas de *Eucalyptus*, caracterizadas como do sorotipo B, isoladas na Austrália e São Francisco mostraram semelhança à CE, enquanto as cepas isoladas de *Cryptococcus neoformans var. gatti* obtidas de materiais clínicos mostraram-se heterogêneas. Esse fato parece apontar para a hipótese de que haja uma reorganização cromossômica durante a infecção humana, já que esse polimorfismo não foi observado em cepas mantidas em cultura por cerca de quinze anos. No que diz respeito à virulência, surpreendentemente, verificou-se que cepas de *C. neoformans var. gatti* originadas de *Eucalyptus* eram tão virulentas para camundongos, quanto as da

variante *neoformans*. Ao contrário, houve uma maior virulência das cepas isoladas do ambiente em *Eucalyptus* da variedade gatti, do que as obtidas em isolamentos clínicos. Essa maior virulência pode estar relacionada com a atividade mais intensa da enzima fenol-oxidase (KWON-CHUNG ET. AL., 1992). *C. neoformans* var. *neoformans* isolados de *Eucalyptus* e do ambiente apresentaram-se com padrão uniforme à CE, não importando a sua origem geográfica, o que enseja também a hipótese da reorganização em humanos do genoma.

Estudando a epidemiologia das infecções provocadas por *C. neoformans*, PERFECT ET. AL. (1993) analisaram o perfil da variedade *neoformans* através da CE. As amostras isoladas foram obtidas de pacientes, tanto HIV positivos, quanto HIV negativos. Amostras isoladas do ambiente, obtidas do solo ou excretas de pássaros dos estados americanos da Carolina do Norte e Ohio também foram analisadas. A CE foi realizada através do sistema CHEF. Cerca de 90% das amostras de materiais clínicos e do ambiente demonstraram ter um padrão único por PFGE. Não houve associação do padrão da eletroforese com o local de infecção, área geográfica do isolamento ou a presença de infecção pelo HIV. Perfis de CE de cepas analisadas individualmente mantiveram-se estáveis na infecção “in vivo” e após passagens “in vitro”.

Utilizando uma combinação de análise por RFPL e CE com CHEF, SPITZER ET. AL. (1993) determinaram a possibilidade de recorrências de meningites criptocócicas serem causadas por persistência da cepa inicial ou aquisição de novas. Através do RFPL o mesmo padrão foi observado para

isolamentos iniciais e posteriores em todos os pacientes quando foram hibridizadas sequências URA5 e sondas CNER-1 por "Southern-blot". A cariotipagem eletroforética (CE) evidenciou que isolamentos em série de um mesmo paciente tinham padrões de imunoelektroforese idênticos ou intimamente relacionados. Cepas que se mostraram distintas geneticamente, demonstraram que recaídas clínicas não eram devidas à infecção com uma única cepa. Comparando-se técnicas de tipagem molecular como a CE e análise por RFLP foi possível demonstrar a sua importância em estudos epidemiológicos. Observou-se que o método de RFLP foi menos sensível que a CE para discriminar isolados clínicos de *Cryptococcus*.

WICKES , MOORE & KWON-CHUNG em 1994 compararam múltiplos isolamentos de duas variedades de *C. neoformans*, levando-se em conta o cariótipo eletroforético, através do sistema CHEF. As duas variedades foram separadas com clareza, de acordo com o tamanho dos cromossomos menores. Os da variedade *gattii* variaram de 400 a 700Kb e os da variedade *neoformans* em aproximadamente 700Kb. Os isolamentos da variedade *gattii* e da variedade *neoformans* apresentaram média de 12 e 13 cromossomos. O tamanho do genoma do *Cryptococcus* foi de 23 Mb. Comparando a posição dos genes, os da variante *neoformans* eram mais organizados que os da variante *gattii*.

Treze isolados clínicos de *C. neoformans* de oito pacientes com AIDS na Itália foram obtidos através da CE pelo sistema CHEF. Em três pacientes foram analisados vários isolados do mesmo indivíduos e, em cinco, um só um isolado. Todas as cepas foram testadas com respeito à susceptibilidade "in vitro" a

antifúngicos pela técnica de microdiluição em caldo. A CE separou de 9 a 12 bandas correspondentes à cromossomos demonstrando ampla variabilidade genética. Os maiores tinham 1900Kb e os menores 750 Kb. De um dos indivíduos em que foram isoladas culturas em seqüência, a segunda amostra colhida tinha um perfil eletroforético diferente do perfil da primeira e terceira amostras, que foram idênticas. A explicação para esse achado poderia ser uma infecção mista no início (BARCHIESI ET. AL. , 1995).

Estudando isolamentos clínicos e ambientais de *C. neoformans* da cidade de Nova York, FRIES ET. AL. em 1996, utilizando o sistema CHEF, observaram extensa variação entre os cariótipos eletroforéticos das cepas isoladas de diferentes pacientes. Isolamentos seqüenciais de *C. neoformans* de pacientes com infecção crônica e recorrente tinham cariótipos muito semelhantes. Uma sugestão de reorganização "in vivo" surgiu com a observação de pequenas diferenças nos cariótipos eletroforéticos detectados entre isolamentos seqüenciais de 50% de pacientes estudados. Três isolamentos clínicos e três ambientais foram estudados antes e depois da passagem em camundongos para um dos isolados clínicos e um dos ambientais. A conclusão dos autores foi de que havia extensa variação entre amostras de pequena região geográfica, alta freqüência de diferenças de cariótipo eletroforético entre isolamentos seqüenciais de pacientes individualmente e ocorrências de mudanças no cariótipo eletroforético durante a infecção experimental em camundongos. Para pacientes com isolamentos seriados com cariótipos diferentes, as diferenças foram geralmente encontradas entre isolamentos recuperados em infecções iniciais, enquanto os isolamentos mais

tardios mostravam cariótipos homogêneos. Apesar da pequena população estudada, observou-se que alguns padrões predominam em estágios tardios, por provável seleção durante a infecção humana. Isto demonstra que modificações dos cromossomos podem ocorrer durante infecção, ao passo que cariótipos eletroforéticos de *C. neoformans* têm sido estáveis nas passagens “in vitro”. O mecanismo das variações do cariótipo é desconhecido, podendo ocorrer independentemente do uso de antifúngicos. Considerando-se isolamentos geneticamente relacionados de pacientes com meningite recorrente, mudanças nos cromossomos podem estar associadas a achados como à variação da estrutura polissacarídica, bem como à alteração no conteúdo de esterol, além de mudanças na susceptibilidade à antifúngicos durante passagem de cepas ambientais em camundongos. Em relação à patogenia essas implicações são desconhecidas.

Cinquenta e um isolados clínicos e ambientais das cidades brasileiras de Belo Horizonte e Rio de Janeiro foram estudados segundo padrões de assimilação de carbono, a cariotipagem eletroforética pelo sistema CHEF, o polimorfismo do tamanho dos fragmentos gerados por enzimas de restrição de endonucleases (RFLPs) com elemento 1 repetitivo de *C. neoformans* (CNRE-1) e sequências URA-5 (FRANZOT ET. AL., 1997). Os resultados foram comparados com estudos semelhantes realizados com isolamentos feitos em Nova York, pelos mesmos métodos moleculares. O número de cromossomos em ambos os estudos variou de 10 a 13. Alguns isolados brasileiros mostraram alto grau de similaridade com os de Nova York, provavelmente pela dispersão global das cepas patogênicas.

1.4.2. Técnicas baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR)

MULLIS em 1983 idealizou um método de acordo com o qual, a partir de uma única sequência, poderia permitir produção de grande quantidade de DNA. Uma grande revolução em biologia molecular, comparável à determinada pelas enzimas de restrição. Essa técnica foi denominada de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, *Polymerase Chain Reaction*). Baseia-se na atividade da enzima DNA polimerase, enzima esta envolvida nos processos de replicação e correção de DNA. A reação de PCR possui uma amostra de DNA fonte, uma DNA polimerase termoestável, oligonucleotídeos iniciadores, sendo que em geral são utilizados dois oligonucleotídeos livres e um tampão de reação, usualmente tendo como componente o Cloreto de Magnésio ($MgCl_2$). Esta solução é submetida a diversos ciclos com três etapas: *desnaturação*, na qual a dupla hélice de DNA é desfeita por ação da temperatura, *anelamento*, situação na qual os iniciadores se ligam a porções complementares no DNA e *extensão*, quando os nucleotídeos são incorporados aos iniciadores, formando uma sequência complementar ao DNA fonte. Ao término de alguns ciclos, obtém-se amplificação exponencial de região delimitada pelos iniciadores.

O PCR é utilizado em várias aplicações, tais como: diagnóstico de doenças infecciosas, genéticas, clonagem de genes, estudos de paternidade e a medicina forense. Vários métodos foram propostos e a maior parte deles estuda o polimorfismo dos produtos de amplificação (*amplicons*) em corrida de eletroforese. Os oligonucleotídeos iniciadores podem ser direcionados para regiões repetitivas do genoma ou arbitrários. Os “amplicons” também podem ser clivados com enzimas de restrição, através do processo chamado PCR-RFLP.

Há vantagens em se utilizar o PCR em tipagem molecular, por requerer apenas pequena quantidade de DNA da amostra, pois mesmo através do DNA fragmentado podemos obter padrões confiáveis.

1.4.2.1 Métodos baseados em amplificação de seqüências arbitrárias do genoma: AP-PCR, RAPD, DAF.

Propostos independentemente por diversos grupos de pesquisadores o AP-PCR é denominado: "*Arbitrarily-Primed*" PCR (PCR com Iniciadores Arbitrários), "*Random Amplification of Polymorphic*" DNA (Amplificação Randômica do DNA Polimórfico-RAPD) e DNA "*Amplification Fingerprinting*" ("Tipagem" por amplificação do DNA). Há diferenças na metodologia para a realização destas técnicas, porém elas têm em comum algumas características, como: utiliza-se iniciadores oligonucleotídeos arbitrários de pequena extensão (8 a 10 pares de bases) e realizam ciclos com baixa temperatura de anelamento, o que permite a ligação destes iniciadores a regiões de homologia parcial. Com isso determina-se a amplificação de seqüências inespecíficas, em número suficiente que permita gerar um padrão discriminatório. Por utilizar-se desta inespecificidade, há a possibilidade de uma aplicabilidade quase que irrestrita. Tanto bactérias, microrganismos eucariontes e organismos pluricelulares podem ser tipados por este método. O RAPD é o termo mais comumente utilizado, inclusive para falar de outras técnicas um pouco modificadas.

O RAPD tem grande poder discriminatório e sua relativa facilidade técnica e rápida disponibilidade dos resultados tornou popular este método. Pode ser

aplicado em investigações epidemiológicas, estudos de genética populacional, taxonomia e evolução.

Sendo modelo de tipagem molecular por PCR, o RAPD também tem desvantagens: baseia-se em amplificação inespecífica e depende das condições físicas utilizadas na reação. A sua reprodutibilidade pode ser prejudicada ou sofrer interferências pela aparelhagem usada, das especificações dos ciclos (desde temperaturas até os intervalos entre os ciclos), das condições dos reagentes e inclusive da procedência da polimerase termoestável.

De acordo com o tamanho dos “primers”, o RAPD pode ser classificado em: AP-PCR, com “primers” de 18-24 bases; RAPD com “primers” mais curtos, típicos com 10 bases e o DAF de 5-8 bases (WILLIAMS ET. AL., 1990; POWER, 1996).

O RAPD foi empregado para produzir DNA “fingerprint” de isolamentos de *C. neoformans* por CRAMPIN ET. AL. (1993) e os resultados demonstraram que cada isolamento mostrava um padrão ou “fingerprint” diferente, sem relação com o sorotipo.

Sondas de hibridização para “fingerprints” de DNA clássicos foram utilizadas como iniciadores para ampliar fragmentos do DNA genômico de *C. neoformans* e espécies relacionadas. Amplificação com o “primer” GTG5, GACA4 ou a sequência core M13 resultou num perfil eletroforético altamente reprodutível, mostrando variações nas espécies, variedades e níveis individuais de cepas. Estes iniciadores utilizados para amplificação determinavam mais vantagens que as clássicas técnicas de DNA “fingerprinting” e com aspecto de ser mais específica que o RAPD (MEYER ET. AL., 1993, 1995).

Estudo comparativo de HYNES ET. AL (1995) verificou a capacidade do RAPD e do "fingerprinting" de DNA digerido com *Eco RI* e sondas de nucleotídeos para tipagem de cinco pares de isolamentos de *C.neoformans var. neoformans* recuperados de cinco pacientes infectados pelo HIV . O objetivo desse estudo foi tentar distinguir se a recorrência da criptococose poderia ser considerada como recaída ou nova infecção. Ambas as técnicas conseguiram fazer a discriminação de forma semelhante.

Usando RAPD para análise de *C.neoformans var. neoformans* com combinações de "primers" de 12 a 22 mer (CHEN ET. AL., 1996) identificaram cinco perfis principais (I, II, III, IV e V), independente da origem do material clínico ou área de isolamento. O tipo I apresentou cinco subtipos, denominados de Ia a Ie , sendo que o subtipo Ia predominou entre pacientes imunossuprimidos.

A utilização do AP-PCR com os iniciadores GTG5, GATA4 e GACA4 foi feita por WEN ET. AL. em 1997 para a discriminação de isolados de *C. neoformans* e sua estabilidade, a diferenciação com outras leveduras e a comparação de padrões genotípicos com o sorotipo. O iniciador GACA4 foi o que melhor distinguiu o *C. neoformans* de outras espécies de leveduras, bem como os sorotipos entre si. Notou-se um padrão específico para o sorotipo A e outro para o sorotipo D. Cepas do sorotipo AD mostraram 5 perfis genotípicos diferentes. Esses padrões mostraram-se constantes.

SILVA ET. AL. (1997) utilizando-se do RAPD, com o método rápido descrito por para extração de DNA, analisou 17 isolados clínicos de *C.neoformans* de São Paulo, Brasil, encontrando polimorfismo genético entre as cepas estudadas. O

RAPD demonstrou, nesse caso, ser prático, rápido e sensível para tipagem molecular de *C. neoformans*.

Estudando cepas de *C. neoformans* da variedade *neoformans* (BOTTONE ET.AL., 1987) e da variedade *gattii* , através do AP-PCR com o iniciador M13, (BOTTONE ET.AL., 1987) compararam cepas da variedade *gattii* do Brasil e da Austrália, tentando verificar se ocos de árvores poderiam ser fonte de infecção humana. Houve semelhanças entre as amostras brasileiras e grandes diferenças entre isolados brasileiros e australianos e cepas padrão ATCC e CDC. Sugeriram também, que ocos de árvores podem representar fontes de infecção humana para ambas as variedades de *C. neoformans* (TRILLES ET. AL., 1998).

28 - OBJETIVOS

2. Objetivos

1. Identificar produtos de amplificação que sejam característicos dos sorotipos A e B de *Cryptococcus neoformans*.
2. Determinar os atributos da técnica de reconhecimento utilizando-se a amplificação de regiões características dos sorotipos A e B.
3. Classificar os sorotipos de cepas de *Cryptococcus neoformans* isolados de alguns pacientes do Hospital das Clínicas da UNICAMP.
4. Determinar a sensibilidade aos antifúngicos das cepas isoladas de *C.neoformans* procedentes de pacientes atendidos no Hospital das Clínicas da UNICAMP.

30 - MATERIAL E MÉTODOS

3. Material e Métodos

3.1 Microrganismos:

I. Foram utilizadas 33 cepas de *Cryptococcus neoformans*, obtidas de 24 pacientes internados no Hospital das Clínicas no período de 1996 a 1998 e que tiveram diversas formas clínicas de criptococose. Os pacientes dos quais foram isolados esses microrganismos tinham Aids, na sua maioria. Essas cepas foram denominadas de CAMP e numeradas seqüencialmente.

II. Cepas isoladas em Campinas e outros locais e, ainda, espécimens cujos sorotipos já eram conhecidos e padronizados, foram utilizados como de referência.. A tabela 1 relaciona as cepas utilizadas, o seu sorotipo, bem como o local do isolamento.

Nome da cepa	Procedência	Sorotipo
CAMP 4	Campinas	A
THAI 5	Tailândia	B
CAMP 3	Campinas	B
IFM 5856	NIH	C
IFM 5873	Recife	C
IFM B3501	Japão	D
IFM 3502	Japão	D
IFM 2536	Recife	AD

Tabela 1. Relação das cepas utilizadas, segundo a procedência e o sorotipo

3.2 Determinação dos sorotipos por técnica de aglutinação

A sorotipagem foi realizada no "Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicosis (Chiba, Japan)", utilizando-se o teste de aglutinação em lâmina

(Crypto Check, Iatron, Japan). Resumidamente, a partir de cultivos de *C. neoformans* feitos em meio de Sabouraud Dextrose Agar por 24 a 48 horas, são retiradas células que, a seguir, são suspensas em água destilada estéril, cuja turbidez é ajustada para o nível 10 da escala de Mc Farland. Uma gota de antisoro de cada tipo é colocada sobre lâmina e, a seguir, trinta microlitros da suspensão de *C. neoformans* é aplicada sobre ela e o preparado homogeneizado em movimentos circulares por um a dois minutos. O teste é considerado positivo quando há aglutinação visível.

3.3 Extração de DNA cromossômico

O DNA cromossômico de todas as amostras de *Cryptococcus neoformans* foi extraído pelos métodos modificados de ZHU ET. AL. (1993) e POONWANN ET. AL. (1997).

As amostras foram cultivadas em meio inclinado de ágar BHI a 37°C por uma semana. Três ou quatro alçadas de células de leveduras retiradas de culturas desses tubos de ágar inclinado foram suspensas em 500 µl de solução tampão TE (Tris – Hcl 100mM, EDTA 1mM, pH 8.0) colocados em um tubo de microcentrífuga (1,5 ml) e o tubo aquecido a 80°C por 30 minutos com a finalidade de inativar as células.

Após breve agitação, essa suspensão foi centrifugada a 12000rpm à temperatura ambiente e, após o descarte do sobrenadante por inversão, ao sedimento foi adicionado a 0,5 ml de tampão de extração (Tris – Hcl 100 mM, pH – 9.0, EDTA 40 mM, 0,1 ml de SDS a 10% e 0,3 ml de cloreto de benzila).

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Depois de agitação vigorosa, as células foram incubadas a 60°C por 30 minutos e então rompidas utilizando-se contas de vidro (Beadbeater, Wakenyaku Co., Japan) por 20 segundos.

Após nova centrifugação a 12000rpm a 4° C por 5 minutos, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de microcentrífuga e adicionada uma solução 3M de acetato de sódio (1/10 do volume inicial) e mantida à 0° C por 10 minutos.

O DNA foi então precipitado com 0,5 ml de isopropanol e mantido a -70° C por 3 horas. A seguir, foi novamente centrifugado e o sedimento lavado com etanol a 70% e ressuspenso em 100 µl de solução tampão TE.

A concentração de DNA foi determinada utilizando-se um espectrofotômetro de luz Ultra-violeta (Bio- mini UV monitor-ATTO-Japan).

3.4 RAPD (amplificação randômica utilizando iniciadores aleatórios) para análise por PCR

Foram utilizados os seguintes iniciadores, segundo GOODWIN & ANNIS(1991).

Iniciador	Seqüência
R – 1 (ou ATCG)	5'- ATGGATCGGC – 3'
R – 2 (oligo – 1)	5'- ATTGCGTCCA – 3'
R – 3 (oligo – 2)	5'- TCACGATGCA – 3'

Tabela 2. Iniciadores utilizados na amplificação aleatória de *C.neoformans*

Esses primers foram utilizados com base em experimentos anteriores.

As reações de amplificação foram realizadas em um volume de 30 µl, contendo: 2,5 µl do iniciador (20 pM), 2,5 µl de DNA genômico (1µg/ml) e uma

pérola de produto comercializado contendo os reagentes para reação de PCR (Ready- to-Go PCRZ bead , Pharmacia Biotech, USA).

A PCR foi realizada aquecendo-se as amostras a 94° C por 4 minutos. Seguiram-se 35 ciclos de desnaturação a 94° C por 2 minutos, anelamento a 32° C por 2 minutos , extensão a 72° C por mais 2 minutos e extensão final a 72° C por 10 minutos em um termociclador (Perkin Elmers 2400, USA). Os produtos do PCR foram resolvidos em corrida eletroforética em gel de agarose 1,5% , a 80 volts por minuto. A seguir o gel foi corado com solução de brometo de etídio(0,5 µg/ml) e fotografado utilizando-se transiluminador com luz ultravioleta.

A reação de RAPD utilizando-se os primers R-1, R-2 e R-3 foi realizada primeiramente em cepas de *C.neoformans* de referência a saber: sorotipo A – cepa CDC 551; sorotipo B – cepa NIH 112; sorotipo C – cepa NIH 18; sorotipo D – cepa IFM 5857 e sorotipo AD – LY 23.

A mesma reação de RAPD com os primers R-1, R-2 e R-3 foi aplicada em isolados clínicos de *C. neoformans* sorotipo A obtidas de pacientes do HC – UNICAMP.

3.5 Extração e sequenciamento do DNA das bandas obtidas e consideradas típicas.

Foram escolhidas para sequenciamento as bandas que se apresentaram com padrão de peso molecular único nas cepas padrão dos sorotipos A e B. Para a cepa padrão de *C. neoformans* sorotipo A(CDC 551) foi sequenciada a banda com peso molecular de 695 bp (**Figura 9**) e para a cepa padrão do

sorotipo B(NIH 112), utilizou-se a banda de peso molecular 448 bp (**Figura 11**).

As bandas consideradas típicas foram extraídas por separação com lâmina do gel de eletroforese e purificadas utilizando-se fenol-clorofórmio e precipitadas com etanol.

Os produtos amplificados por reação em cadeia de polimerase (RAPD-PCR) foram submetidos a extração com fenol clorofórmio e precipitado com etanol e a seguir clonados com o vetor (P GEM 3Zf) e transformadas em células bacterianas (JM109- Promega Co. Maddison, Wis, USA). O DNA plasmidial sequenciado foi purificado utilizando-se um “kit” comercial de purificação de plasmídios (GFX Micro Plasmid Prep Kit, Pharmacia Biotech, USA).

Esses fragmentos purificados foram sequenciados utilizando-se um sequenciador automatizado ABI prism 377A, e o “kit” de sequenciamento “Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction” (Applied Biosystems Division, Perkin Elmer, USA) de acordo com o protocolo do fabricante.

3.6 Determinação de sorotipos por reação em cadeia de polimerase (PCR) usando novo conjunto de iniciadores

Uma vez conhecidas as seqüências de nucleotídeos dos fragmentos de amplificação considerados específicos dos sorotipos A e B, foram desenvolvidos novos iniciadores para esta etapa. Esses iniciadores foram obtidos através de síntese em escala comercial.

As reações de amplificação foram feitas em termociclador (Perkin Elmers 2400, USA) com o aquecimento das amostras a 94°C por 10 minutos para a

denaturação inicial e a essa se seguiram 25 ciclos de 94° C por 1 minuto , 55° C por 1 minuto, 72° C por 2 minutos uma extensão final por 10 minutos a 72° C.

Os produtos da reação foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% em solução tampão TBE a 80V por 90 minutos e a seguir corados com Brometo de Etídio (0,5 µg/ml) e fotografado através de luz ultra violeta(UV).

3.7. Determinação da sensibilidade à drogas.

Os isolados de *Cryptococcus neoformans* foram testados frente às seguintes drogas, todas utilizáveis na terapêutica das infecções provocadas por esse microrganismo: Anfotericina B (AMB; Bristol-Meyer Squibb) na sua forma bruta, um preparado comercial de Anfotericina B (FUNG; Fungison, MSD), Fluconazol (FCZ, Pfizer Pharmaceutical, Aichi, Japan), Itraconazol (ICZ, Janssen Pharmaceutical, Beerse, Belgium), e a 5-Fluorocitosina (5-FC, Nippon Roche, KK, Tokyo, Japan).

Para a pesquisa de sensibilidade às drogas antifúngicas foi feita a determinação de Concentração Inibitória Mínima(CIM), o MIC 50(MIC-50%) e o MIC 90(MIC – 90%), de acordo com o protocolo do NCCLS(M-27A, 1997)

As drogas utilizadas, bem como seu modo de preparação e soluções estoque, são apresentadas a seguir:

1. **Anfotericina B** (Bristol-Meyer Squibb) Solução estoque em Dimetil Sulfóxido (DMSO) na concentração de 5mg/ml. Foram preparadas alíquotas de 0,8 ml em tubos de poliestireno estéreis e armazenadas em congelador a –70°C. A solução foi utilizada até três meses após sua preparação. Solução de trabalho - a partir

da solução estoque foi feita uma diluição a 1:5 em DMSO e, a seguir, diluída novamente a 1:6,25 em H₂O para obter concentração final de 160 µg/ml. Da solução de trabalho foram preparadas nove diluições a 1:5 nos meios RPMI e YNB e, posteriormente, distribuídas alíquotas de 100µl nas placas de microdiluição até o uso.

2. 5-Fluorocitosina e Fluconazol (Nippon Roche, KK, Tokyo, Japan; Pfizer Inc.) – Solução estoque a 5mg/ml em água deionizada estéril. A solução de fluconazol foi armazenada em tubo com rosca, conservada à temperatura ambiente ao abrigo da luz e podendo ser utilizada até seis meses após o preparo. A solução de 5-Fluorocitosina foi dividida em alíquotas de 1,3ml, acondicionadas em tubo de poliestireno estéreis, conservadas em congelador a -70 °C e podendo ser utilizadas até seis meses após o preparo. Solução de trabalho – A partir da solução estoque foi feita uma diluição a 1:7,8 em água destilada e deionizada estéril para a obtenção de uma concentração final de 640µg/ml, que foi adicionada ao primeiro poço da placa de microdiluição. As diluições seguintes foram feitas com a transferência de 50µl para o poço vizinho e assim sucessivamente, até a concentração de 1,25µg/ml.

3. Itraconazol (Jansen Pharmaceuticals) Solução estoque na concentração de 5mg/l em polietileno glicol 400 (PEG 400, Union Carbide), para a solubilização a preparação foi aquecida a 60-70 °C. Mantida em tubo com rosca e ao abrigo da luz, essa solução pode ser utilizada até seis meses após o preparo. Solução de trabalho – foi feita uma diluição a 1:5 da solução estoque e, a seguir, novas diluições a 1:25 em água destilada e deionizada estéril, para a obtenção de

preparo anterior. As placas de microdiluição foram conservadas em congelador a -20°C até o seu uso.

Esses testes foram realizados segundo a padronização do National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS M-27A, 1997) para o teste de fungos realizados em caldos de cultura. Foram determinadas as concentrações inibitórias mínimas (MIC), a concentração inibitória mínima para 50% (MIC50) e 90% (MIC90) das cepas. O inóculo inicial correspondeu a 10^3 Unidades Formadoras de Colônias (CFU)/ml e as drogas objeto de teste, incorporadas aos meios nas diferentes concentrações exigidas.

Os meios utilizados foram: O **YNB** (Difco, USA), tamponado com MOPS (Sigma, USA), em $\text{pH}=7,0$ o **RPMI-1640** (American Biorganics, Inc.) com L-glutamina sem bicarbonato de sódio também tamponado com MOPS, em $\text{pH}=7,0$, adicionado de dextrose a 2% e o **SDB** (Sabouraud Dextrose Broth).

O **YNB** foi preparado, dissolvendo-se 6,7g de pó em 100ml de água destilada e deionizada estéril, a seguir a solução foi esterilizada por filtração (filtro Costar). Esse meio foi utilizado por aumentar o crescimento de *C. neoformans* e, portanto, melhorar o significado clínico da Concentração Inibitória Mínima dos antifúngicos testados (GHANNOUM M. ET. AL., (1992).

O **RPMI** foi re-hidratado em água destilada e deionizada numa concentração final de 46,5g/l e esterilizado em filtro biológico (Nalgene). Uma vez preparados, foram conservados em refrigerador a 4°C .

O **SDB** foi preparado em água destilada e deionizada numa concentração final de 65g/l e a seguir esterilizado por autoclavagem.

Foram utilizadas placas de microdiluição de fundo chato (Nunc) de 96 poços e a observação da turbidez foi feita com o uso de um espelho côncavo inclinado. O meio contendo a droga em teste foi dispensado no primeiro poço (100µl) e, a seguir, diluições sucessivas foram feitas retirando-se 50µl de cada poço e adicionando-se ao seguinte. Foram também adicionados um controle positivo e um controle negativo em cada linha. Todos os testes foram feitos em duplicata.

Uma vez semeadas, as culturas foram incubadas a 35°C e a primeira leitura feita após 24 horas da inoculação para observação da turvação do meio com o auxílio do espelho de leitura. Duas outras leituras com 48h e 72h foram feitas. Em alguns casos, dado o crescimento lento das amostras, houve uma nova leitura com 12 dias de incubação.

A leitura obedeceu o critério elaborado por PFALLER ET. AL.(1995). Esse método, em resumo, atribui escores à turvação existente nos poços da placa em que foi feita a inoculação, a saber: 0= claro, + = levemente enevoadado, ++ = proeminente redução da turbidez, +++ = leve redução da turbidez, ++++ = sem redução da turbidez quando comparado ao controle sem droga. A concentração foi considerada eficaz quando a turbidez observada era pelo menos de ++.

Os inóculos foram obtidos a partir de colônias de *C. neoformans* de pelo menos 1mm de diâmetro, cultivadas em meio de Sabouraud dextrose agar por 48 horas. As células foram suspensas em água destilada e deionizada e ajustadas para uma transmitância de 90%, medida em espectrofotômetro de luz visível com comprimento de onda de 530 nm. Um controle do inóculo foi feito

pelo método de diluições sucessivas em meio de Sabouraud dextrose agar, para verificação da quantidade e qualidade das células.

41 - RESULTADOS

4. Resultados

4.1 Sorotipagem pelo método de aglutinação de isolados de *C. neoformans*

As cepas de *C. neoformans* isoladas de pacientes do HC/UNICAMP puderam ser classificadas de acordo com o seu sorotipo em A e B. Houve, das 33 cepas testadas, 31 casos do sorotipo A e 2 casos do sorotipo B. Não foram encontrados sorotipos C, D ou AD(Tabela 3).

Todas as cepas isoladas de pacientes HIV positivos revelaram-se do sorotipo A e dentre as nove cepas de pacientes sem infecção pelo HIV, sete foram do sorotipo A e duas cepas do sorotipo B(Tabela 3).

4.2 Análise genômica por RAPD de amostras de *C. neoformans*

Os padrões de RAPD, utilizando-se os iniciadores R1, R2 e R3, das cepas pertencentes ao sorotipo A revelaram-se todos idênticos. Na **Figura 6** apresentamos os perfis genômicos de sete cepas representativas do total de cepas analisadas, obtidos com o iniciador R-1. Esse padrão de “fingerprint” foi bastante semelhante aos obtidos de outras cepas testadas do sorotipo A de referência, havendo apenas pequeno número de bandas discrepantes.

A análise pelo RAPD das cepas do sorotipo B revelou diferentes padrões, relacionados a cada um dos iniciadores testados.

Selecionamos o iniciador R-2 para comparar padrões de amplificação que fossem característicos dos sorotipos A, B, C, D e AD dado que à eletroforese, os produtos de amplificação forneceram bandas mais nítidas e bem mais separadas

do que as obtidas com os demais iniciadores (R-1 e R-3). Essas amplificações podem ser vistas na **Figura 7**.

As seqüências escolhidas para serem amplificadas estão assinaladas nessa figura e correspondem a fragmentos de 695 pb e 448 pb. O critério para a escolha dessas bandas foi a sua existência exclusiva no sorotipo assinalado. Não pudemos caracterizar bandas exclusivas dos sorotipos C, D e AD.

4.3 Determinação das seqüências das bandas de 695 e 448 pb.

As bandas de 695 pb e 448 pb foram então extraídas. Após a purificação esses fragmentos foram então seqüenciados. Essas seqüências podem ser vistas na **Figura 8**.

4.4 Desenho e utilização dos novos iniciadores para a detecção do sorotipo A

Dois pares de iniciadores foram desenhados para a detecção do sorotipo A, considerando que a banda característica desse grupo era a de 695-bp. O primeiro par, designado C-Na-70-S e C-Na-70-A (sublinhado na **Figura 8, Tabela 4**), que amplifica uma região com 695-pb e outro par (também sublinhado na **Figura 8, Tabela 4**) designado C-Na-29-S e C-Na-29-A que amplifica uma região interna da mesma seqüência de 579-pb.

Na **Figura 9** pode ser vista a amplificação obtida com o primeiro par de iniciadores a partir do DNA extraído de uma cepa de referência de *C. neoformans* sorotipo A (CDC 551), além de outras três cepas classificadas previamente, também, como do sorotipo A. O mesmo par de iniciadores foi testado frente a

cepas do sorotipo B (NIH 112), C (NIH 18), D (IFM 5857) e AD (LY 23), não se obtendo amplificação. De outras 31 cepas do sorotipo A o mesmo fragmento pode ser amplificado. Essas cepas estão representadas pelas últimas três canaletas da figura com a abreviatura CA (Campinas).

Utilizando-se o segundo par de iniciadores, que amplifica uma sequência interna da banda de 695-pb, obtivemos, a partir de cepas do sorotipo A, banda de 579-bp, inclusive das 31 cepas do HC/UNICAMP. Não houve, como nas amplificações com os iniciadores anteriores, amplificação dessa banda a partir das cepas de outros sorotipos além do A.

A combinação dos iniciadores C-Na-29-S e C-Na-70-A amplificou uma sequência de 666-bp, juntamente com outras bandas satélites, quando foram testados frente a uma cepa de referência do sorotipo A. As mesmas bandas puderam ser observadas quando testamos as demais 31 cepas do sorotipo A, conforme pode ser observado, na **Figura 10**, onde são apresentadas algumas amplificações representativas das demais.

Quando testado frente a uma cepa do sorotipo B, o mesmo par de iniciadores amplificou uma sequência de 290-bp (**Figura 10**).

Sorotipo, Iniciadores (sequências de bases)	Origem do DNA
Sorotipo A	
C-Na-70-S (5'-ATTGCGTCCACCAAAGGAGCTC-3')	<i>C.neoformans</i> sorotipo A (696 bp)
C-Na-70-A (5'-ATTGCGTCCATGTTACGTGGC-3')	
Sorotipo A	
CNa-29-S (5'-CTCTTGACGTTGGCTCTTTC-3')	<i>C.neoformans</i> sorotipo A (696 bp)
CNa-29-A (5'-CTACTGATGAAAACGCTG-3')	
Sorotipo B	
CNb-49-S (5'-ATTGCGTCCAAGGTGTTGTTG-3')	<i>C.neoformans</i> sorotipo A (448 bp)
CNb-49-S (5'-ATTGCGTCCATCCAACCGTTATC-3')	

Tabela 4. Iniciadores da reação de PCR preparados com base na sequência do DNA das bandas específicas dos sorotipos A e B

4.5 Desenho e utilização dos novos iniciadores para a detecção do sorotipo B

O par de iniciadores CNb-49-S e CNb-49-A (Tabela 4) amplificou o DNA de amostras clínicas isoladas em Campinas, Brasil (cepas CAMP-3 e CAMP-24), identificadas com CB na foto, ambas do sorotipo B, bem como o das cepas de referência (NIH 112), também do sorotipo B (Figura 11). Esse mesmo par de iniciadores não amplificou a mencionada sequência quando se usou DNA de cepas dos sorotipos A, D ou AD.

4.6 Pesquisa de sensibilidade aos antifúngicos para as cepas de *C. neoformans*.

Analisando-se os valores da CIM para as 31 cepas de *C. neoformans* em relação à CIM máxima e à CIM Mínima, para inóculos de 10^3 células no meio de RPMI, observaram-se os seguintes valores de variação: AMB: 0,5 – 2 µg/ml; Fungison®: 0,03 – 2 µg/ml; FCZ: 0,5 – 32 µg/ml; ICZ: 0,06 – 2 µg/ml e 5FC: 1 – 16 µg/ml. As mesmas 31 cepas quando estudadas utilizando o meio de SDB com inóculo de 10^3 células os resultados obtidos para MIC máximo e MIC mínimo foram os seguintes: AMB: 0,06 – 4 µg/ml; Fungison®: 0,03 – 1 µg/ml; FCZ: 0,5 – 64 µg/ml; ICZ: 0,015 – 0,25 µg/ml e 5FC: 0,03 – 32 µg/ml. De modo geral pode-se dizer que as 31 cepas apresentaram um bom perfil de sensibilidade aos antifúngicos testados.

Com base nestes resultados podem-se observar variações nos resultados quando se utiliza o meio de SDB para os valores de CIM máxima e mínima com cepas de *C. neoformans*. No caso do FCZ houve detecção de cepas dose-dependente quando se utilizou meio de RPMI e de cepa resistente pelo meio de SDB. Já para o ICZ os resultados foram discrepantes, pois pelo meio de RPMI foi detectada cepa resistente enquanto que todas as cepas foram sensíveis quando testadas pelo meio de SDB. Para 5FC também foram observados resultados discrepantes quando se utilizou o SDB e de sensibilidade intermediária pelo meio de RPMI.

Nas **Tabelas de 5 a 9** são apresentados os resultados dos testes de sensibilidade às drogas mencionadas. Houve diferença em relação à Concentração Inibitória Mínima quando comparados os resultados dos ensaios feitos com os diferentes meios utilizados. De modo geral, pode-se dizer que essas cepas apresentaram um bom perfil de sensibilidade aos antifúngicos testados, não havendo diferenças significativas quando comparadas as cepas provenientes de pacientes infectados e não infectados pelo HIV. Assinale-se que o número de amostras do grupo não infectado não é numeroso, de modo que estudos posteriores deverão ser feitos para confirmação desses resultados. Quando comparados os resultados obtidos com o meio **RPMI1640** com o **SDB** verificamos que há diferenças significativas nas CIM no mesmo grupo de fármaco e cepas, mostrando que quando se emprega o SDB pode-se obter valores de CIM discordantes com o meio padrão, que é o **RPMI1640**.

No caso do Fluconazol, houve a detecção de cepas dose-dependentes quando se utilizou o meio **RPMI-1640** e de cepa resistente quando o meio utilizado foi o **SDB**. Já para o Itraconazol os resultados foram discrepantes pois, com o uso do meio **RPMI-1640** foi detectada uma cepa resistente, enquanto que todas as cepas foram sensíveis quando o meio utilizado foi o **SDB**. Para a 5-Fluorocitosina também foram observados resultados discrepantes, já que uma cepa mostrou-se resistente quando se utilizou o meio de **SDB** e com o **RPMI** mostrou-se de sensibilidade intermediária.

4.6.1. Resultados das análises de cepas de *C. neoformans* procedentes de pacientes com infecção pelo HIV.

A **Tabela 5** mostra as CIM máximas e CIM mínimas e também CIM50 e CIM90 para as cepas isoladas de pacientes com infecção pelo HIV utilizando o meio de **RPMI-1640** e a **Tabela 7** apresenta os mesmos parâmetros utilizando-se o meio de **SDB**. Considerando –se o meio **RPMI-1640** observou-se cepa com CIM de 16µg/ml para o Fluconazol, ou seja, podendo ser considerada como de sensibilidade dose dependente (SDD). O mesmo resultado foi observado quando se utilizou o meio **SDB**. Para a 5-Fluorocitozina foi observado cepa com sensibilidade intermediária (16 µg/ml) no meio **RPMI-1640**, com um valor correspondente no meio **SDB** de 32 µg/ml, considerada como resistente.

Avaliando-se o meio de **RPMI-1640** (meio padrão do método NCCLS), de modo geral as 24 cepas foram sensíveis à AMB , porém foram encontradas cepas com sensibilidade dose dependente (SDD) ao fluconazol, resistente (R) ao Itraconazol e sensibilidade intermediária à 5-Fluorocitosina.

4.6.2 Resultados de análises de cepas de *C. neoformans* procedentes de pacientes sem infecção pelo HIV

Os dados referentes ao perfil de sensibilidade aos antifúngicos das cepas de *C.neoformans* isolados de pacientes sem infecção pelo HIV estão dispostos nas **Tabelas 6 e 8** , referentes ao uso dos meios de **RPMI-1640** e **SDB**, respectivamente.

Apesar de terem sido estudadas apenas 9 cepas de *C. neoformans* foi possível observar cepa com sensibilidade dose dependente(SDD) ao fluconazol (32 µg / mL) quando se aplicou o meio de **RPMI-1640** . No meio de **SDB** esse

mesmo isolado apresentou CIM de 64 $\mu\text{g} / \text{mL}$, considerada como resistente ao FCZ.

Também foram detectadas CIM de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para o ICZ nos meio de **RPMI-1640** e **SDB**, respectivamente e cepa com CIM de 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para 5-FC no meio de **RPMI-1640**.

Estudando-se comparativamente as CIM das cepas isoladas a partir de pacientes com e sem infecção pelo HIV, observou-se para o FCZ a presença de cepas com CIM máxima de 32 $\mu\text{g}/\text{ml}$, entre os isolados de pacientes sem infecção pelo HIV, enquanto que entre as cepas de pacientes com infecção pelo HIV a CIM máxima foi de 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Foram detectadas cepas com CIM de 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ em ambos os grupos de cepas e a presença de sensibilidade intermediária ao 5-FC de 16 e 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ nas cepas isoladas de paciente com e sem infecção pelo HIV, respectivamente.

A CIM máxima para AMB foi de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ nas cepas de pacientes sem infecção pelo HIV e de 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ nas cepas dos pacientes com infecção pelo HIV.

4.6.3 Resultados da análise da susceptibilidade à 5-FC utilizando-se o meio YNB.

O teste de sensibilidade aos antifúngicos utilizado-se o meio de **YNB+G** (Yeast Nitrogen Broth + Glucose) foi realizado para as cepas isoladas de pacientes com e sem infecção pelo HIV apenas para a 5-FC (**Tabela 9**).

Os resultados da CIM máxima e CIM mínima no meio de **YNB-G** para os isolados de paciente com infecção pelo HIV foram , respectivamente 1 e 0,015 $\mu\text{g/ml}$ e nas cepas de pacientes HIV negativos 0,25 e 0,06 $\mu\text{g/ml}$. Esses dados são discrepantes dos observados no meio de **RPMI-1640**, onde as CIM máximas e CIM mínimas foram muito mais elevadas que em ambos os grupos de isolados de pacientes com ou sem infecção pelo HIV (**Tabela 9**).

Nome da cepa	Procedência	Sorotipo
CAMP 4	Campinas - BR	A
THAI 5	Tailândia	B
CAMP 3	Campinas - BR	B
IFM 5856	NIH - EUA	C
IFM 5873	Recife - BR	C
IFM B3501	Japão	D
IFM 3502	Japão	D
IFM 2536	Recife - BR	AD

Tabela 1 . Relação das cepas utilizadas, segundo a procedência e o sorotipo

Iniciador	Sequência
R – 1 (ou ATCG)	5'- ATGGATCGGC – 3'
R – 2 (oligo – 1)	5'- ATTGCGTCCA – 3'
R – 3 (oligo – 2)	5'- TCACGATGCA – 3'

Tabela 2. Iniciadores utilizados na amplificação

	Paciente HIV reagente	Paciente HIV não reagente
Sorotipo A	24	7
Sorotipo B	-	2
Total	24	9

Tabela 3. Resultados de sorotipagem de 33 cepas de *C. neoformans* obtidos de pacientes com e sem infecção pelo HIV, pelo método de aglutinação empregando-se o “Kit” comercial “Cryptocheck” (latron Co. Japan).

Sorotipo , par de primer para PCR (sequência de base)	Origem do DNA (Tamanho da banda por RAPD)
Sorotipo A	
CNa-70-S(5'-ATTGCGTCCACCAAGGAGCTC-3')	<i>C.neoformans</i> sorotipo A (695 pb)
CNa-70-A(5'-ATTGCGTCCATGTTACGTGGC-3')	<i>C.neoformans</i> sorotipo B (448 pb)
Sorotipo A	
CNa-29-S(5'-CTCTTGACGTTGGCTCTTTC-3')	<i>C.neoformans</i> sorotipo A (695 pb)
CNa-29-A(5'-CTACTGATGAAAACGCTG-3')	
Sorotipo B	
CNb-49-S(5'-ATTGCGTCCAAGGTGTTGTTG-3')	<i>C.neoformans</i> sorotipo B (448 pb)
CNb-49-A(5'-ATTGCGTCCATCCAACCGTTATC-3')	<i>C.neoformans</i> sorotipo B (448 pb)

Tabela 4 . “Primers” para PCR preparados com base na informação de sequência de DNA para modelos de bandas de “fingerprinting” por RAPD

	Droga testada (µg/ml)				
	AMB	FUNG	FCZ	ICZ	5FC
Nº de amostras	22	22	23	23	23
MIC máx	2	2	16	2	16
MIC mín	0,25	0,03	0,5	0,06	1
MIC 50	1	0,5	4	0,13	4
MIC 90	2	1	16	0,5	16
AMB – Anfotericina B , FUNG - Fungison®, FCZ – Flucanazol , ICZ – Itraconazol , 5-FC - % Fluorocitosina MIC máx = valor máximo encontrado para o MIC ; MIC mín = valor mínimo encontrado para MIC ; MIC 50 = MIC de 50% das cepas testadas ; MIC 90 = MIC de 90% das cepas testadas					

TABELA 5. Distribuição das concentrações inibitórias mínimas(CIM) de vários antimicrobianos testados contra cepas de *C.neoformans* coletados de pacientes HIV positivos.O meio empregado foi o RPMI-1640, incubação a 35° C, inóculo inicial de 10³ UFC / ml, Período de Incubação(PI) e 2 a 5 dias.

Droga testada ($\mu\text{g/ml}$)					
	AMB	FUNG	FCZ	ICZ	5FC
Nº de amostras	8	9	9	9	8
MIC máx	1	2	32	2	8
MIC mín	0,5	0,25	1	0,25	2
MIC 50	0,5	0,5	8	0,5	4
MIC 90	1	1	8	0,5	8

AMB – Anfotericina B, FUNG - Funglison®, FCZ – Flucanazol, ICZ – Itraconazol, 5-FC - % Fluorocitosina
 MIC máx = valor máximo encontrado para o MIC ; MIC mín = valor mínimo encontrado para o MIC
 MIC 50 = MIC de 50% das cepas testadas ; MIC 90 = MIC de 90% das cepas testadas

TABELA 6 . Distribuição das concentrações inibitórias mínimas (MIC) de vários antifúngicos contra cepas de *C. neoformans* coletados de pacientes não infectados pelo HIV. O meio empregado foi o RPMI1640 ; incubação a 35° C ; inóculo inicial de 10³ UFC / ml; Período de incubação(PI) de 2 a 5 dias

Droga testada ($\mu\text{g/ml}$)					
	AMB	FUNG	FCZ	ICZ	5FC
Nº de amostras	24	23	24	24	6
MIC máx	4	1	32	0,25	32
MIC mín	0,25	0,25	0,5	0,015	0,06
MIC 50%	1	0,5	8	0,13	1
MIC 90%	2	1	16	0,25	32

AMB – Anfotericina B , FUNG - Fungison®, FCZ – Flucanazol , ICZ – Itraconazol , 5-FC - % fluorocitosina . MIC máx = valor máximo encontrado para o MIC ; MIC mín = valor mínimo encontrado para o MIC ; MIC 50 = MIC de 50% das cepas testadas ; MIC90 = MIC de 90% das cepas testadas

Tabela 7 – Distribuição das concentrações inibitórias mínimas (MIC) de vários antifúngicos contra cepas de *C.neoformans* coletadas de pacientes infectados pelo HIV. O meio empregado foi o SDB; incubação a 35°C ; o inóculo inicial de 10³ CFU/ml; período (PI) de incubação (2 a 5 dias).

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

	Droga testada ($\mu\text{g/ml}$)				
	AMB	FUNG	FCZ	ICZ	5FC
Nº de amostras	9	9	9	9	8
MIC máx	1	1	64	0,25	4
MIC mín	0,06	0,03	0,5	0,015	0,03
MIC 50	0,5	0,5	16	0,13	0,06
MIC 90	0,5	1	32	0,25	0,25

MIC máx = valor máximo encontrado para o MIC ; MIC mín = valor mínimo encontrado para o MIC
 MIC 50 = MIC de 50% das amostras testadas ; MIC 90 = MIC de 90% das amostras testadas

Tabela 8. Distribuição das concentrações inibitórias mínimas (MIC) de vários antifúngicos contra cepas de *C.neoformans* coletados de pacientes não infectados pelo HIV. O meio empregado foi o SDB ; incubação a 35°C ; inóculo inicial de 10^3 CFU/ml; período de incubação (PI) de 2 a 9 dias.

	Infectados pelo HIV		Não infectado pelo HIV	
	YNB	RPMI-1640	YNB	RPMI-1640
Nº de amostras	22	23	6	8
MIC máx	1	16	0,25	8
MIC mín	0,015	1	0,06	2
MIC 50	0,13	4	0,13	4
MIC 90	0,5	16	0,13	8

MIC máx = valor máximo encontrado para o MIC ; MIC mín = valor mínimo encontrado para o MIC
 MIC 50 = MIC de 50% das cepas testadas ; MIC 90 = MIC de 90% das cepas testadas

Tabela 9 . Distribuição das concentrações inibitórias mínimas (MIC) de 5-Fluorocitosina contra cepas de *C. neoformans* em pacientes infectados e não infectados pelo HIV; inóculo de 10^3 CFU/ml ; os meios empregados foram YNB e RPMI-1640 ; incubação a 35°C ; período de incubação de 2 a 5 dias

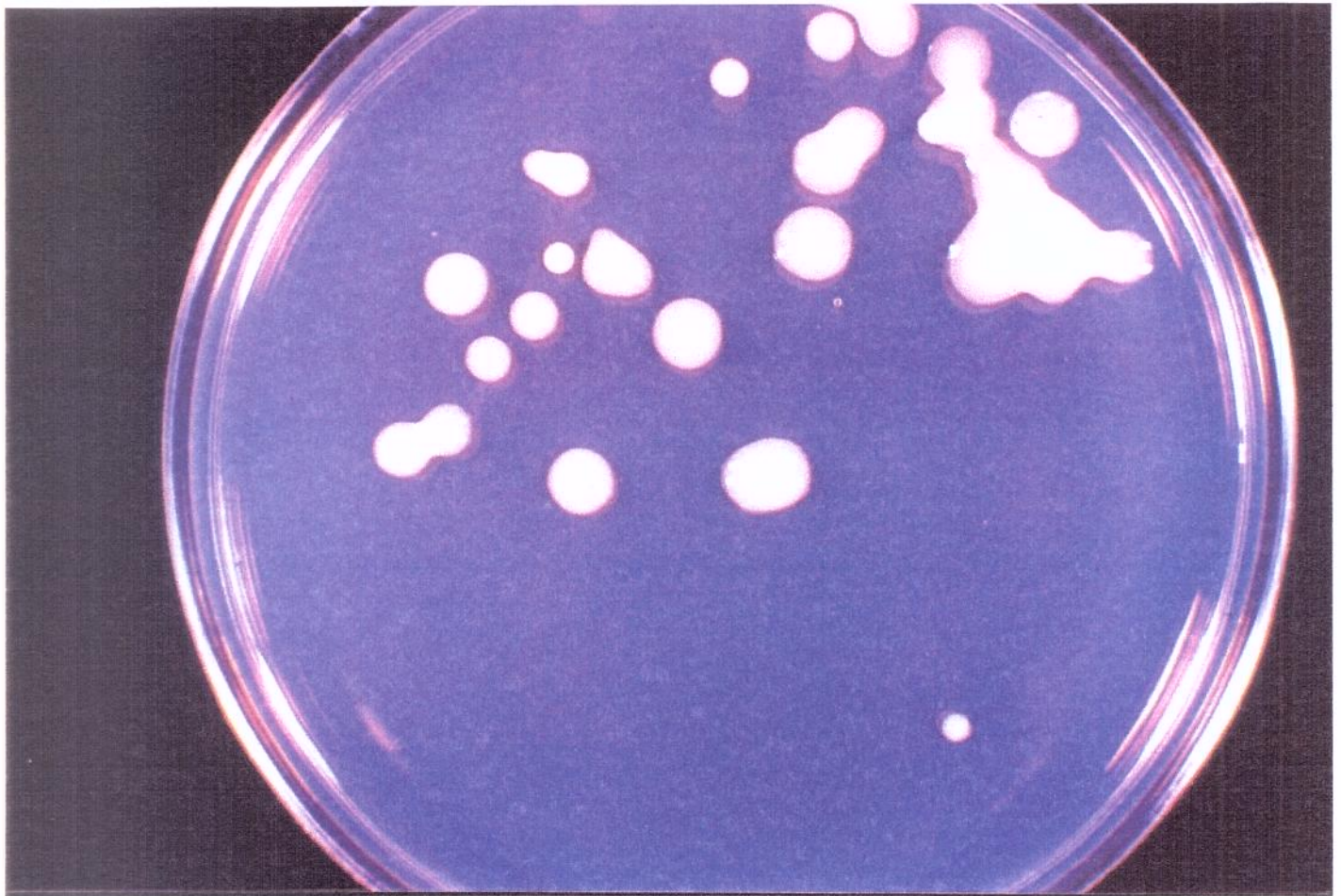


Figura 1. *Cryptococcus neoformans* demonstrando um aspecto coalescente

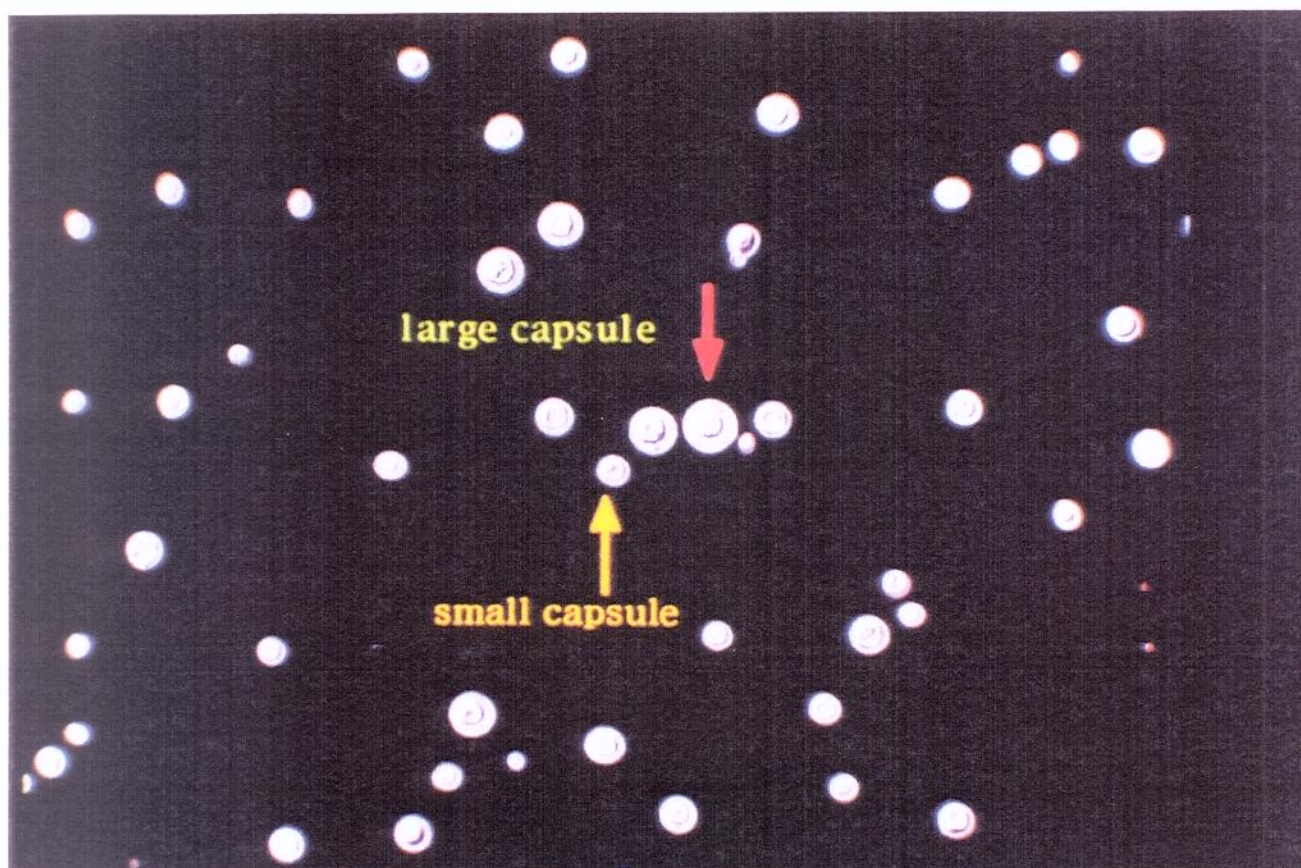


Figura 2. *Cryptococcus neoformans* , com demonstração de cápsulas grandes e cápsulas pequenas

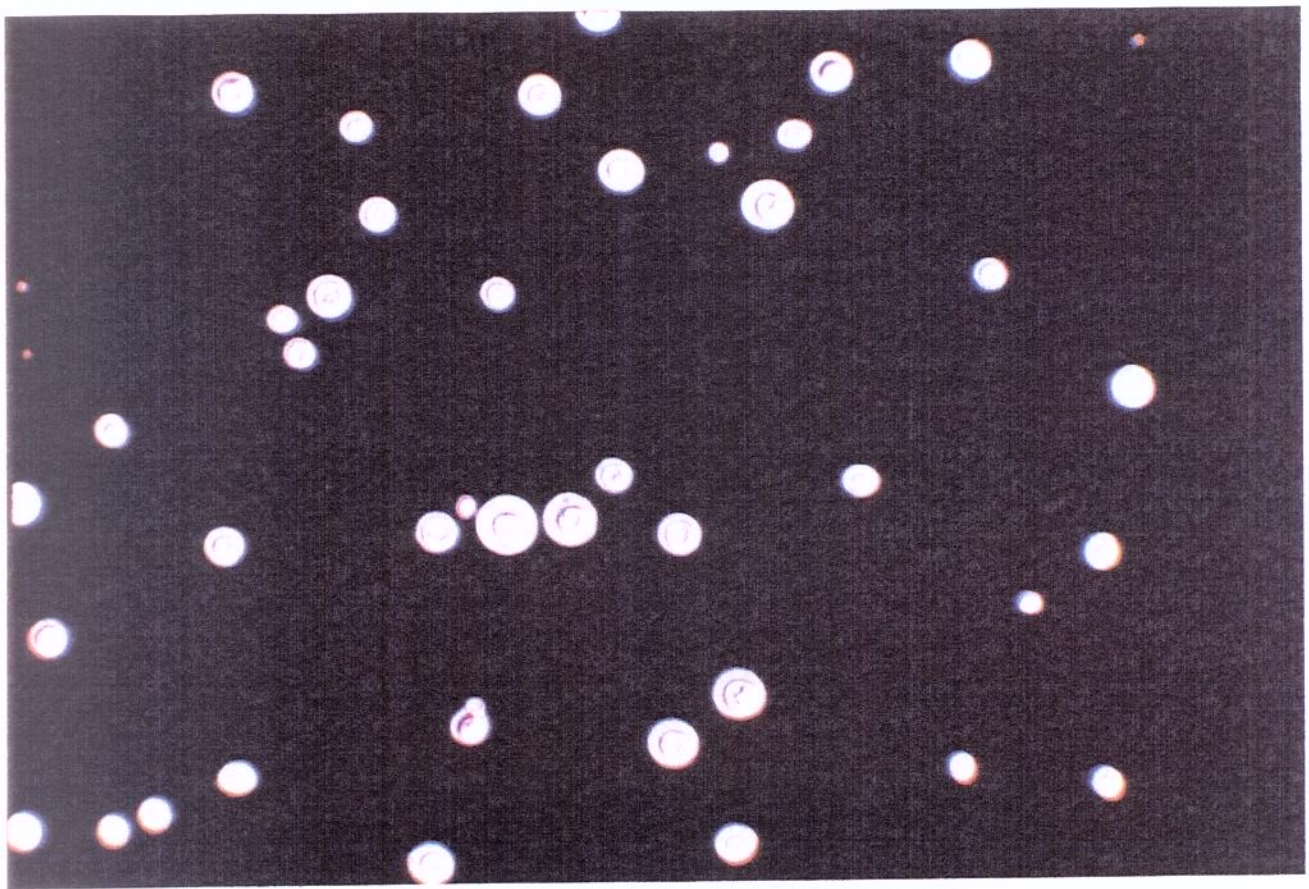


Figura 3. *Cryptococcus neoformans*, demonstrando tamanho das cápsulas, grandes e pequenas

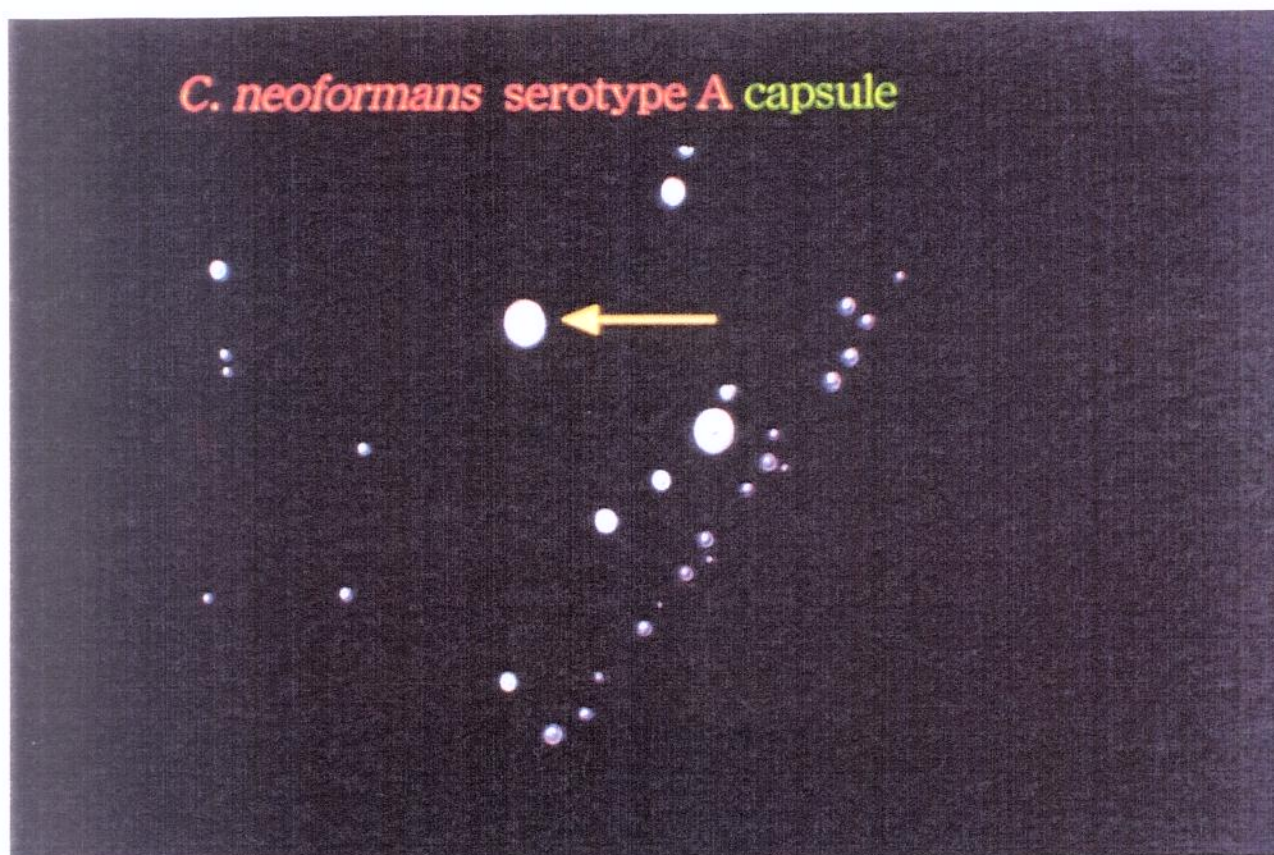


Figura 4. *Cryptococcus neoformans* sorotipo A - cápsula

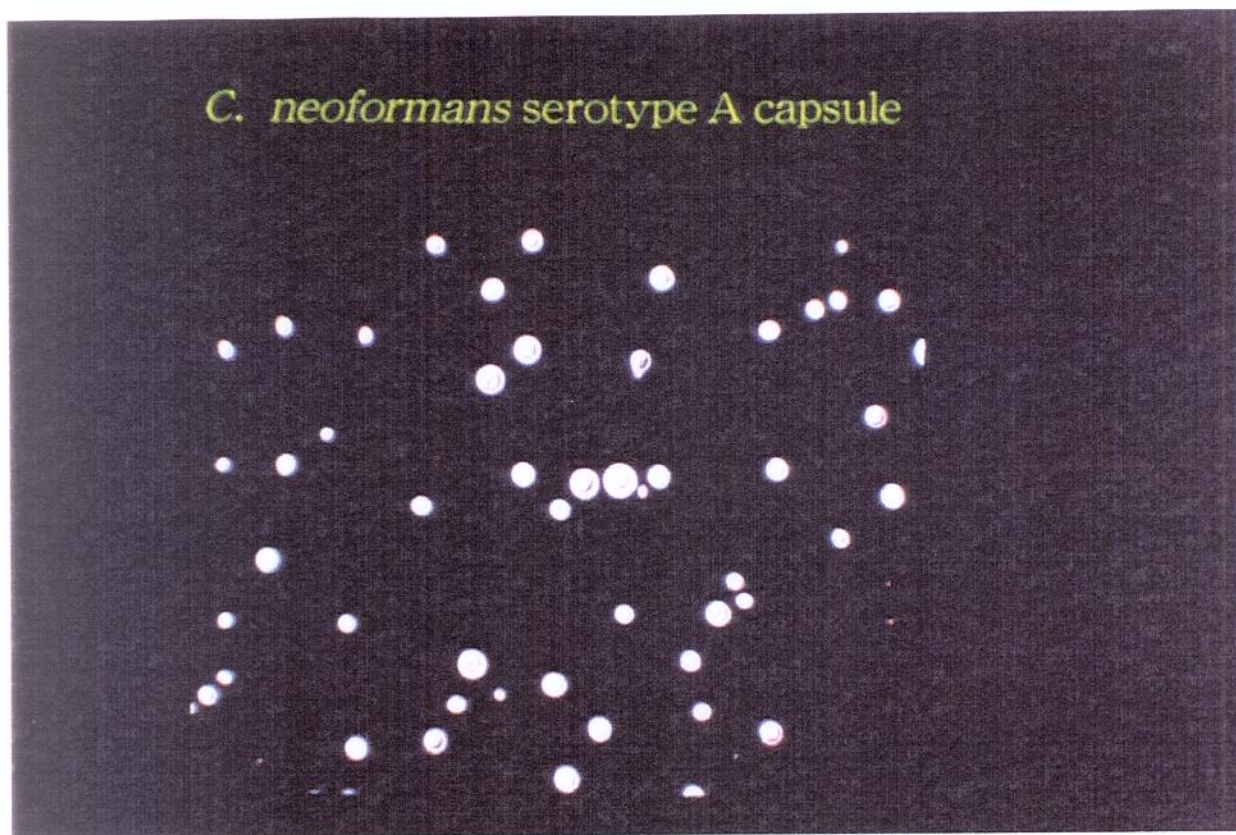


Figura 5. *Cryptococcus neoformans* - sorotipo A - variabilidade do tamanho das cápsulas

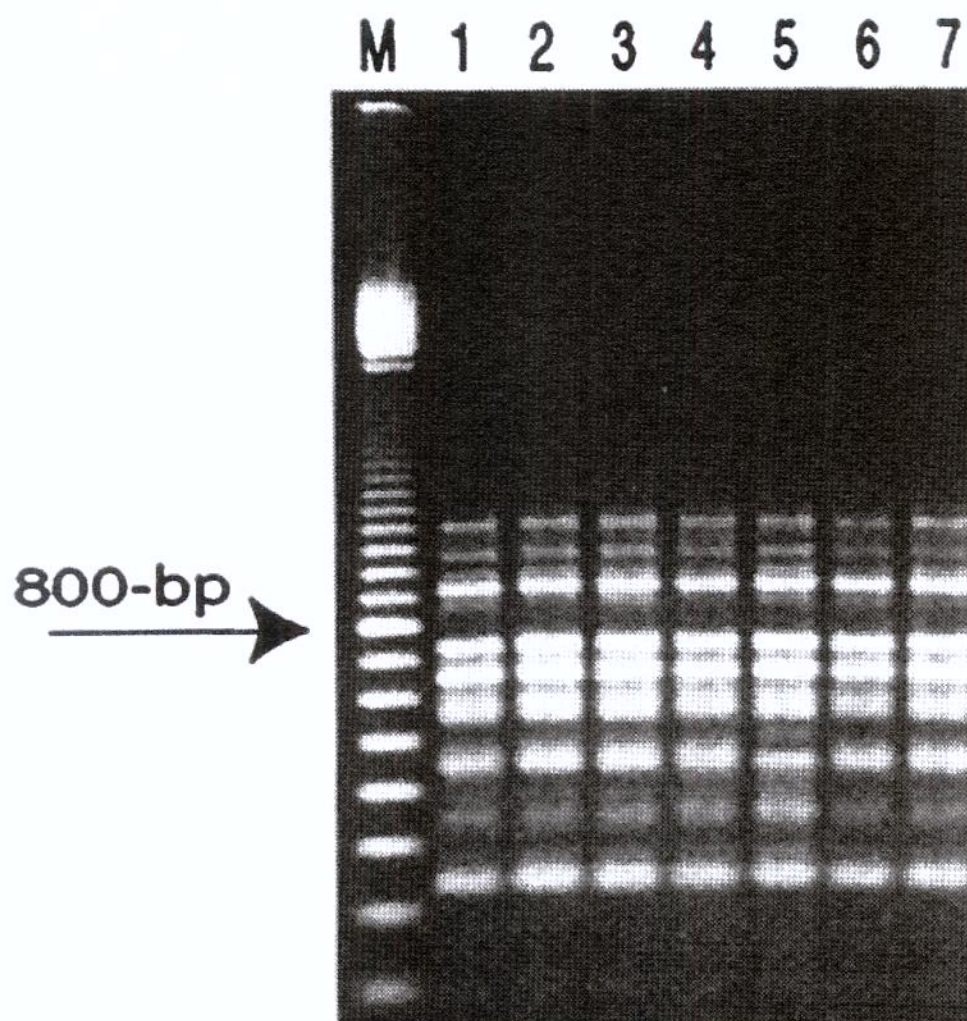


Figura 6 . Modelos de fingerprint por RAPD de sete cepas de *C.neoformans* sorotipo A isolado do Brasil e obtido com o “primer” R-1. Coluna M , marcador de DNA usado como peso molecular padrão ; colunas 1 a 7 , isolados clínicos sorotipo A do Brasil

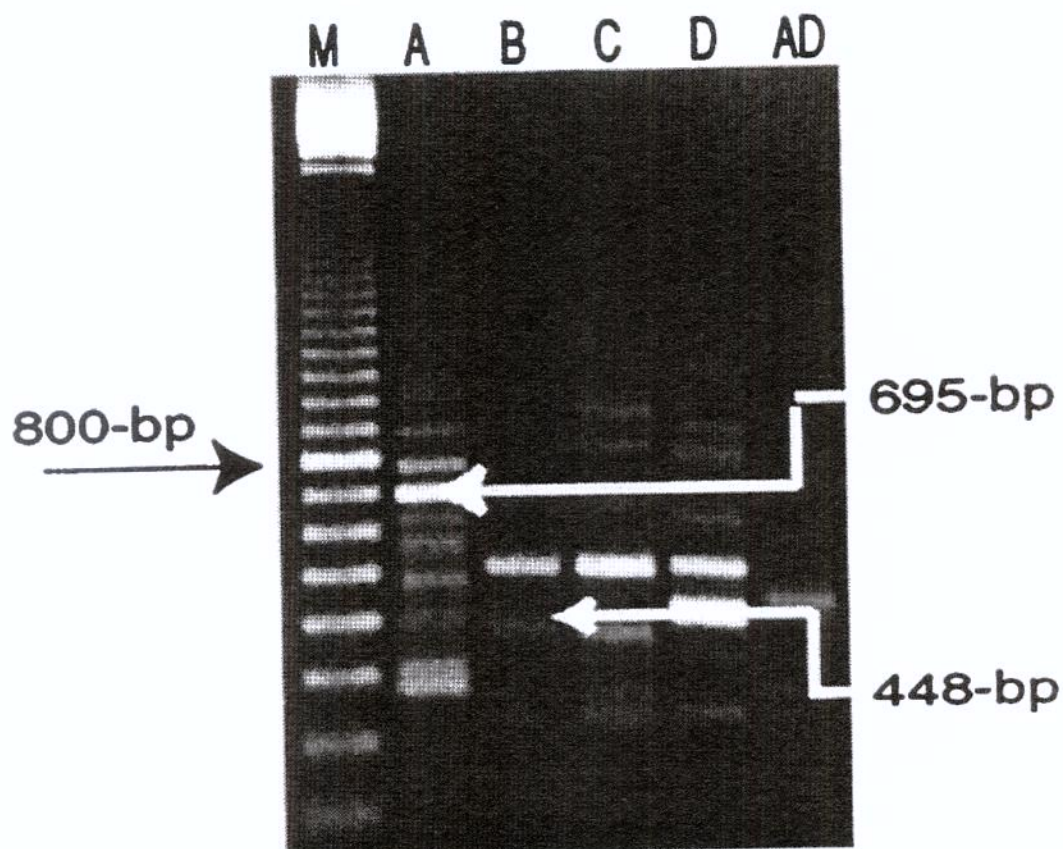


Figura 7. Modelos de “fingerprint” por RAPD das cepas de referência de *C. neoformans* sorotipos A, B, C, D e AD , respectivamente. As cepas de referência foram CDC 551 (sorotipo A), NIH 112 (sorotipo B), NIH 18 (sorotipo C), IFM 5857 (sorotipo D) e LY 23 (sorotipo AD). As setas indicam as bandas de DNA que foram obtidas por análise de RAPD e que foram extraídas e sequenciadas no presente experimento

A

10 20 30 40 50 60
ATTGCGTCCA CCAAGGAGCT CATGAATACT CTTGACGTTG GCTCTTTCGG AGGCACTTAT
 CNa-70-S CNa-29-S

70 80 90 100 110 120
 GCCGGTAACG CCGTCGCTTG TGCCGCTGGT ATCGCCGCTC AAGAAGTCTA TGCCTCTGGT

130 140 150 160 170 180
 GAGATTGAGA AGAATGTTGC CGCTCGATCC GAGCAGCTCT TCACCGCCCT TAACAAGCTT

190 200 210 220 230 240
 ACCTCTTCGG AGAAGACCAA GCATCTCATT GCCGATGTTG GAGGCGTTGG TCTCATGACT

250 260 270 280 290 300
 GCCATTGAAT TCCGTTCTGC TTCCGACCCT CTTACCCACG AGGGATTGCC CGAGGGCACC

310 320 330 340 350 360
 AAGATCCCCA AGGACATTGG CAAGAGGGTT CAGGCTTACT GTCTCGAGAA GGACTTGATG

370 380 390 400 410 420
 GTTCTTACCA CTTCTTGCTT TGACACTATC AGGTTCTACC CTGCTTTGGT CATTAAACGAG

430 440 450 460 470 480
 GAGGAGATGA AGAGGGCTAT GGACATTTTC ACCGAGGCCG TGGAGAAGGT TGCGCTTGAG

490 500 510 520 530 540
 GCCTAGAAAA CTGGCATAGA GTTAAGTTGT AGGGAAAAAG TTTCGTATAT TTGTATTATT

550 560 570 580 590 600
 CAGGATCACT GGTTTTTGT ATGCATTAG GCCCGATCAG ATATTCCAGC GAGTTTTCAT
 CNa-29-A

610 620 630 640 650 660
CAGTAGGAAA AGCCTTTACC TATAACACAT GGCCTATTA AAATTGTAAC GATAAATCAT

670 680 690
 CCAGTATAAG GATCGCCACG TAACATGGAC GCAAT
 CNa-70-A

B

10 20 30 40 50 60
ATTGCGTCCA AGGTGTTGTT GACTTCCCAC GGAGTTAAGT GAGTCACGTA AATAAATTAG
 CNb-49-S

70 80 90 100 110 120
 ATATTATGAT TTTCATGITT TTTCCGCTGA CGGTCCTCGT CTACTTTATC GACAAGTCGT

130 140 150 160 170 180
 CCGAATTAC AGCTTTCTCT ATAATCCTAT AAACCTTTAA AATGGTATGT CAAGATAATT

190 200 210 220 230 240
 GGTATATTAC TGCCGCTCTGA TGCTGACTAT TATGGTGCCT TAGATTATCC CCGTTCGTTG

250 260 270 280 290 300
 CTTTCCTGTC GGTAAAGTAA TCGGTAACCT TTGGGACAGC TATCTTGAGC TTCTCACC GC

310 320 330 340 350 360
 CCGTGTGAT GAGGGGTGAG TCACAATGTT GATTGGCTTT GTGGACATTI GCTCATAAGC

370 380 390 400 410 420
 GAATCTGTAG TGAAGCGTGG ACAAGTTGCA ATTGTGAGCA GAGGATCCTA AAGGCACTGG

430 440
 ACNCAGATAA CGGTTGGATG GACGCAAT
 CNb-49-A

Figura 8. Sequência de banda de DNA de 695 pb determinada recentemente de cepa de *C. neoformans* sorotipo A obtida por análise de RAPD e sequências (sublinhadas) do novo par de “primers” para PCR que foram preparados. Sequência de banda de DNA de 448-pb determinada recentemente de cepa de *C. neoformans* sorotipo B obtida por análise de RAPD e as sequências (sublinhadas) do novo par de “primers” para PCR que foram preparados.

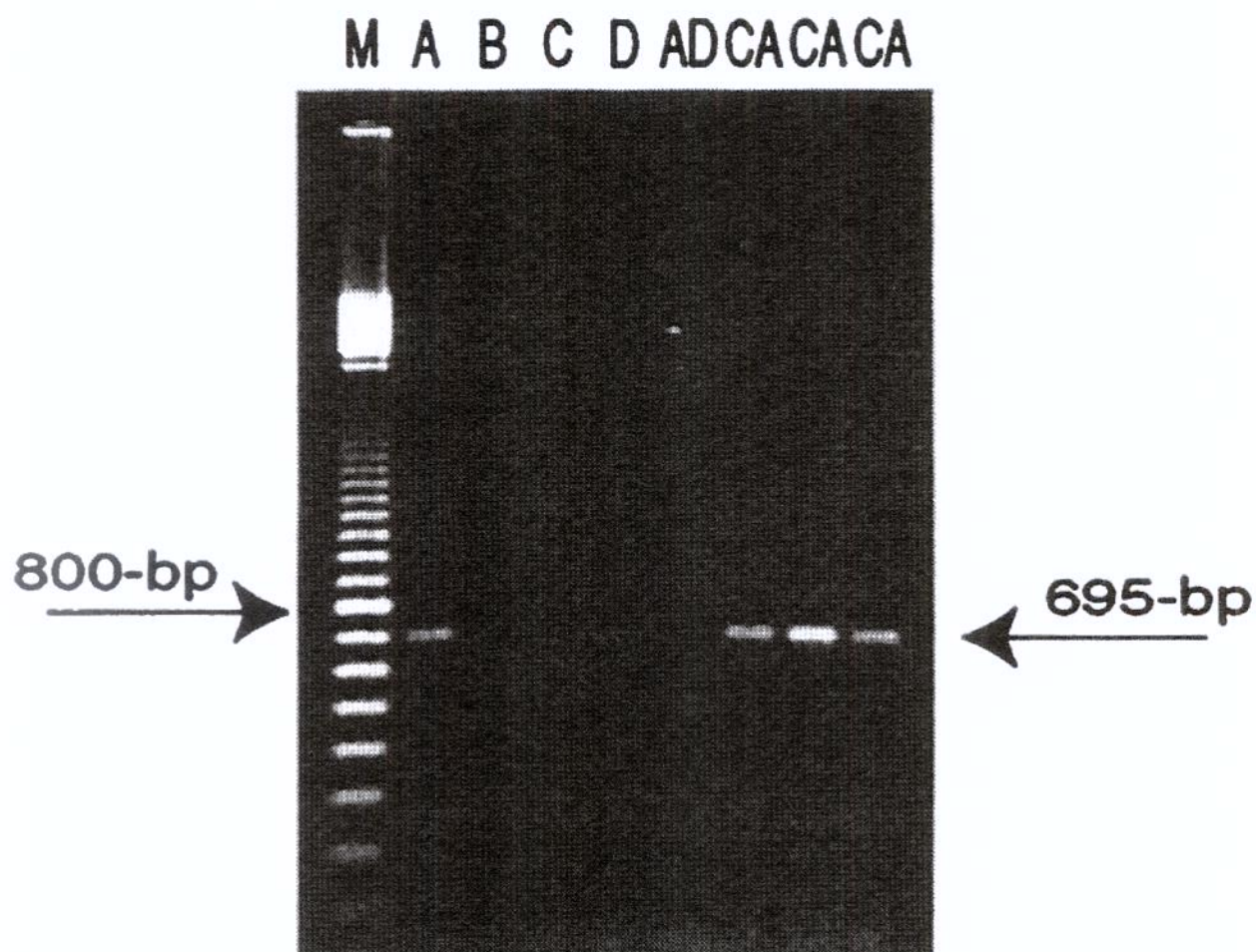


Figura 9. Identificação por PCR de cepas de *C. neoformans* sorotipo A com par de “primer” para PCR CNa-70-S e CNa-70-A .Coluna M , marcador ; colunas A a AD, cepas referência de sorotipos A, B, C, D e AD, respectivamente. Colunas CA , isolados clínicos sorotipo A (CAMP-1, CAMP-2 e CAMP-4 da esquerda para a direita, respectivamente) do Brasil

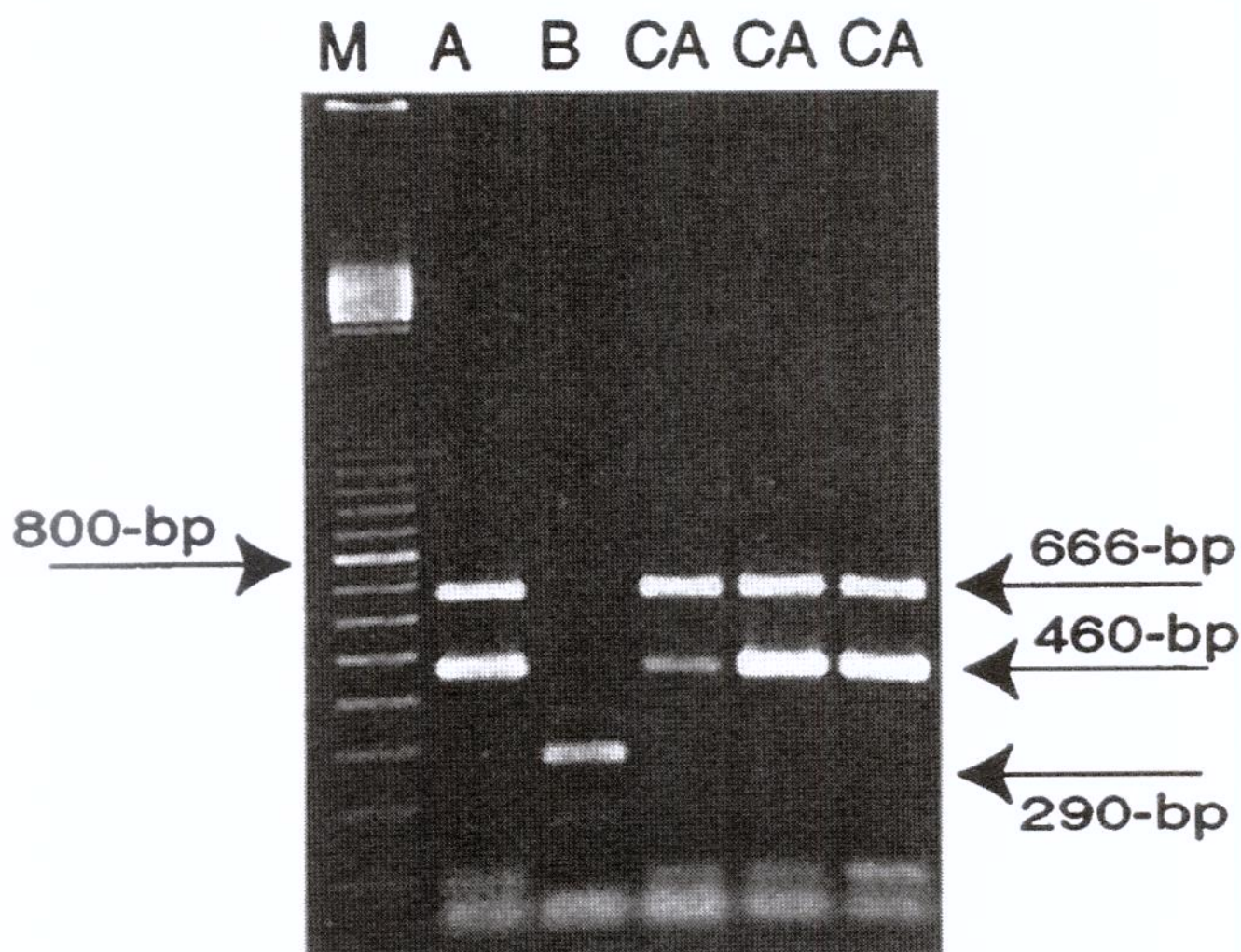


Figura 10. Identificação por PCR de amostras de *C. neoformans* sorotipo B com o par de “primer” específico para sorotipo A CNa-29-S e CN-a-70-A. Cepas de sorotipo A e B foram identificadas pela presença de bandas amplificadas de 666 pb (juntamente com uma de 460 pb) e 290 pb , respectivamente. Coluna M , marcador ; colunas A e B , cepas referência de sorotipos A (CDC 551) e B(NIH 112) , respectivamente; colunas CA, isolados clínicos sorotipo A (CAMP-1, CAMP-2 e CAMP-4 da esquerda para a direita, respectivamente) do Brasil

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

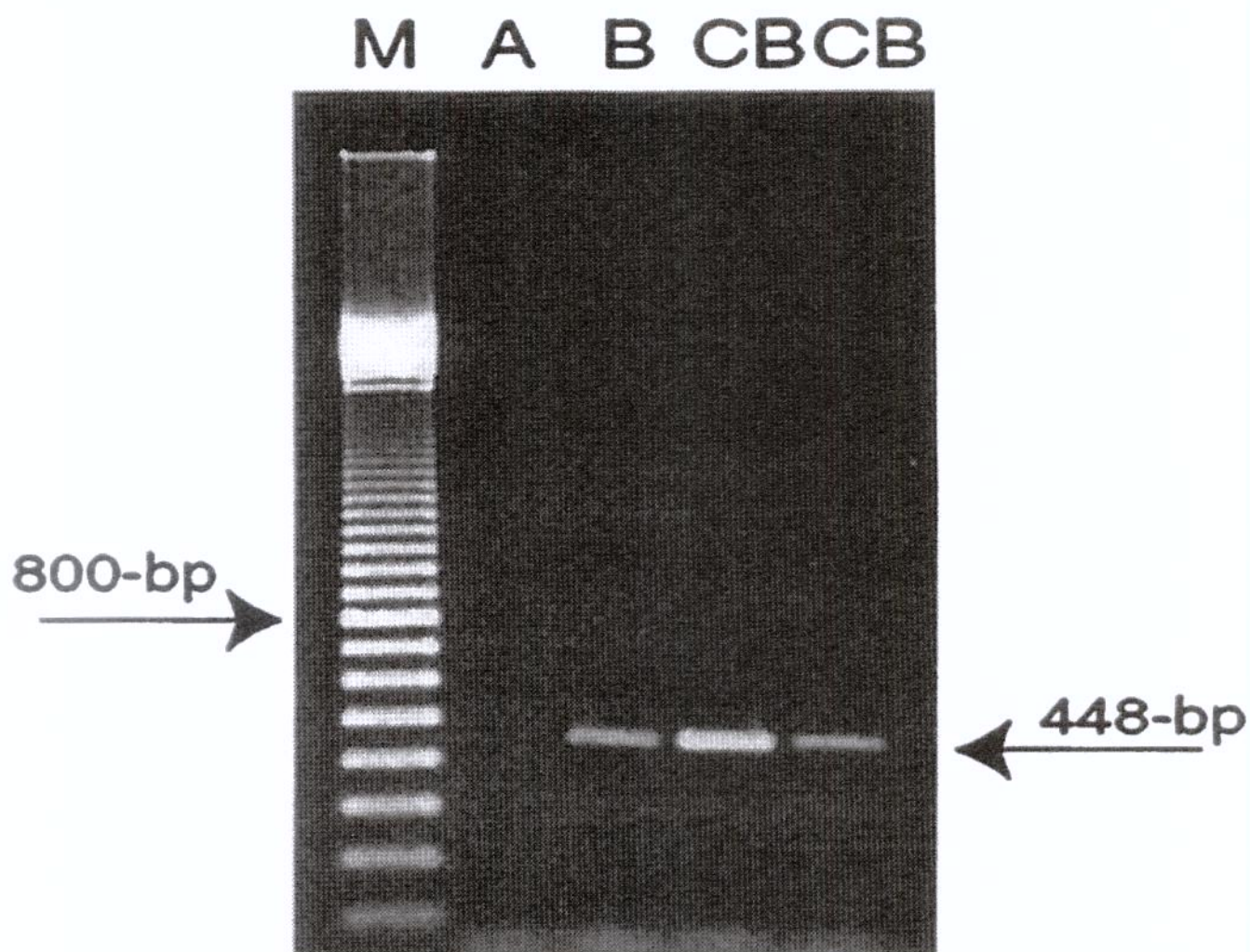


Figura 11 . Identificação por PCR de 2 amostras clínicas de *C. neoformans* sorotipo B com o par de “primer” para PCR CNb-49-S e CNb-49-A. Coluna M , marcador ; colunas A e B , cepas referência de sorotipos A (CDC 551) e B (NIH 112), respectivamente; colunas CB , isolados clínicos sorotipo B (CAMP-3 e CAMP-24, à esquerda e à direita , respectivamente) do Brasil.

73 - DISCUSSÃO

Discussão

A pandemia da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) iniciada ao final dos anos 70 conferiu também importância à uma série de doenças infecciosas consideradas oportunistas, entre elas a criptococose, originadas no intenso prejuízo ao sistema imunológico que essa síndrome provoca. Diversos são os microrganismos que podem causar doenças oportunistas nesses casos, entre eles, vírus, bactérias, fungos, protozoários e helmintos

Nos pacientes com AIDS a infecção pelo *Cryptococcus neoformans* pode ser devastadora e ocasionar o óbito (VAN DER HORST ET. AL., 1997). Para se ter uma idéia da importância dessa associação, o número de indivíduos convivendo com o HIV/AIDS até abril de 2000 encontra-se em torno dos quarenta milhões (Organização Mundial da Saúde, OMS). Desses, mais de 5 milhões já desenvolveram a doença plenamente manifesta com possibilidade de terem sido acometidos por germes oportunistas. De acordo com DUPONT ET. AL.(1992), a frequência da criptococose nos Estados Unidos da América nos indivíduos com AIDS varia de 6 a 10%, ocupando a segunda posição dentre as infecções provocadas por fungos. Na Europa essa incidência vai de 3 a 6% e nos países africanos de 10 até 30%.

Pesquisadores norte americanos afirmam que com a introdução da terapia antiretroviral combinada desde 1996 (HAART - "Highly active antiretroviral therapy"), que corresponde à uma combinação de inibidores da transcriptase reversa, nucleosídeos análogos e não análogos e inibidores da protease, a

incidência da criptococose estaria diminuindo nos pacientes com AIDS tratados, Outros autores não concordam com essa afirmativa (SUGAR, 1998).

No Brasil, os casos notificados de AIDS chegam a 179 541 e desses cerca da metade já faleceu (Boletim Epidemiológico Ano XII—nº 04 - 1999). A criptococose foi relatada em 4,4% dos pacientes, sendo mais frequente nos indivíduos de mais que 13 anos de idade. Em algumas regiões do nosso país, os isolamentos de *Cryptococcus neoformans* em pacientes com AIDS em casos suspeitos de criptococose variaram de 53% a 90%, sendo em São Paulo de 70% a 90%, de 53% no Rio de Janeiro e de 64% no Paraná (MELO ET. AL.,1993; SANT'ANNA ET. AL.,1997; ROZENBAUM & RIOS GONÇALVES, 1994; FERNANDEZ-BORDGNON ET. AL., 1996).

Neste trabalho, realizado com vinte e quatro pacientes, foram recuperadas 33 amostras de *C. neoformans*, sendo que vinte e quatro delas, obtidas de vinte e dois pacientes, pertenciam a indivíduos infectados pelo HIV. Os outros dois pacientes que participaram do estudo também possuíam doença que levou à imunossupressão.

Os isolamentos da variedade *neoformans* do *Cryptococcus neoformans* predominam sobre a variedade *gattii*, conforme mostram alguns estudos epidemiológicos. Entretanto, ocorre o inverso nas regiões tropicais e subtropicais, quando o isolamento é feito no meio ambiente (KWON-CHUNG & BENNETT, 1984).

No Brasil, tem sido documentada em vários trabalhos uma presença predominante da variante *neoformans*, tanto em pacientes com ou sem AIDS (LACAZ & RODRIGUES, 1986; PAULA ET. AL. ,1988; MELO ET. AL., 1993;

ROZENBAUM & RIOS GONÇALVES, 1994; FERNANDEZ-BORDIGNON ET. AL., 1996; SANT'ANNA ET AL., 1997; MOREIRA ET AL., 1998; CHANG ET AL., 1998; AOKI ET AL., 1998). Segundo MORALEZ ET. AL., (1999), as frequências observadas dos vários sorotipos de amostras provenientes do Brasil, Venezuela e Chile foram de 80% para o sorotipo A, 12% para o sorotipo B, 3% para o sorotipo C e 4% para o sorotipo AD. Esses resultados são semelhantes aos de outra publicação, na qual estão incluídas amostras clínicas de várias áreas geográficas da Europa, Ásia, África, América do Norte e América do Sul, cujo resultado mostra o encontro de 72,9% amostras do sorotipo A, 10,9% do sorotipo B, 3,6% do sorotipo C, 6,3% do sorotipo D e 4,3% do sorotipo AD, tendo havido, ainda, 1,9% de cepas cujo sorotipo não pode ser determinado (KWON-CHUNG & BENNETT, 1984). Observe-se que apenas para o sorotipo D houve uma certa diferença entre os estudos mencionados.

Foram encontradas, no presente trabalho, 31 cepas de *C. neoformans* var. *neoformans* das trinta e três estudadas. Tem sido relatado que o sorotipo A de *Cryptococcus neoformans* distribui-se por todo o mundo, sendo o maior causador de todas as formas clínicas de criptococose. Já o sorotipo B, por outro lado, tem uma distribuição global mais restrita, sendo encontrado nos países das regiões tropical e subtropical. Uma vez que o Brasil é localizado numa região tropical, a existência de criptococose devido ao sorotipo B é menos provável.

KWON-CHUNG ET. AL.(1990) relataram que o *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* constitui-se em torno de 98 a 100% dos isolados de pacientes com AIDS no Brasil e no sul da Califórnia e que 40 a 45% dos isolados de pacientes sem AIDS foram do sorotipo B . O achado correspondente a este

trabalho, indicando que das trinta e três cepas testadas, trinta e uma foram de *C. neoformans* do sorotipo A reforça a idéia apresentada em trabalhos anteriores já que a maioria dos pacientes envolvidos neste estudo tinham AIDS.

Técnicas empregadas em laboratório que utilizam a biologia molecular como instrumento de estudo, como a análise do DNA genômico através dos diversos tamanhos dos fragmentos gerados pela digestão com enzimas de restrição e, também, a amplificação aleatória utilizando-se iniciadores ("primers") inespecíficos (RAPD) têm se revelado instrumentos poderosos para possibilitar a análise direta desses genomas e por conseguinte apoiar estudos epidemiológicos relacionados a diversos agentes causadores de doença (BRANDT M.E. ET. AL., 1996 ; LO PASSO C., ET. AL. 1997 ; SANDHU G. S., ET. AL., 1995; YAMAMOTO, Y. ET. AL. , 1995).

A amplificação feita no presente trabalho, utilizando iniciadores aleatórios, mostrou que os padrões de "fingerprinting" de trinta e um isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans* sorotipo A foram muito similares quando utilizado o iniciador R-1, sugerindo que a maioria das cepas isoladas de *Cryptococcus neoformans* desse sorotipo tinham uma certa homogeneidade sob o aspecto genético. A amplificação obtida com o iniciador R-2 produziu "amplicons" com suficiente grau de distinção, sendo bem individualizados à eletroforese em gel de agarose.

Os motivos dessa monotonia observada nos isolados testados de *C. neoformans* sorotipo A, através de análise por RAPD não são claros. Talvez isso possa ser explicado pelo fato de que todas as amostras foram coletadas de pacientes que provêm da região de Campinas e atendidos no Hospital das

Clínicas da UNICAMP. Outros estudos utilizando um número maior de cepas, também obtidas no Brasil estão em progresso na nossa instituição.

RHUMA ET. AL. (1996) relataram que técnicas de análise por RAPD têm sido capazes de distinguir entre sorotipos A, D e AD do *Cryptococcus neoformans*. Os mesmos autores também relataram que a identificação dos sorotipos B e C de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* pelo método de RAPD pode ser possível. VARMA ET. AL. (1995) analisou 156 amostras, de acordo com os padrões de “fingerprinting” por RAPD e concluíram que o *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* e o *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* podem ser classificados em diversos grupos de acordo com esses diversos padrões. O nosso estudo também demonstrou que essa distinção entre os sorotipos A e B é possível de ser feita.

Apesar de diversas investigações terem mostrado que análises por modelos de RAPD são vantajosas para a identificação dos sorotipos de *C. neoformans*, poucos estudos para o desenvolvimento de iniciadores sorotipo específicos de *C. neoformans* a serem utilizados em reações de amplificação têm sido feitos. Nos experimentos descritos, foram desenhados e testados iniciadores específicos para os sorotipos A e B do *C. neoformans* isolados no Brasil.

Com base nas informações fornecidas pela análise por RAPD, foram desenhados e sintetizados três pares de iniciadores a serem utilizados na reação de amplificação (PCR), dois deles relacionados ao sorotipo A, denominados arbitrariamente CNa-70-S / CNa-70-A e CNa-29-A / CNa-29-S e um relacionado ao sorotipo B, denominado arbitrariamente CNb-49-S / CNb-49-A, que pudessem caracterizar em cultura esses sorotipos. Esses iniciadores forneceram um produto de amplificação que foi capaz de identificar em todas as trinta e três amostras de

C. neoformans testadas o seu sorotipo A ou B. Resultado idêntico foi obtido empregando-se amostras de referência. Esses resultados são originais, ou seja, esse é o primeiro relato de identificação dos sorotipos A e B de *Cryptococcus neoformans* em cultura, baseado em amplificações específicas.

Esse resultado se reveste de importância já que os diagnósticos feitos por reações de amplificação são rápidos, desde que padronizados e, nesse caso podem identificar com rapidez a maioria das cepas isoladas em pacientes com AIDS, que no nosso meio são do sorotipo A ou B na maioria dos casos. Além disso, a utilização dos iniciadores CNa-29-S e CNa-70-A, pela diversidade de bandas que produz em ambos os sorotipos testados pode revelar-se uma importante arma para a detecção de *C. neoformans* sorotipos A e B em materiais biológicos dependendo de estudos futuros.

A discriminação dos dois sorotipos mencionados empregando-se técnicas convencionais não tem sido usuais em laboratórios clínicos brasileiros, que trabalham com amostras coletadas de pacientes com AIDS.

Empregando os iniciadores destinados à identificação do sorotipo A obtivemos uma amplificação inespecífica quando o testamos frente ao DNA de cepa dos sorotipos B e C (obteve-se uma banda de aproximadamente 290pb). Esse resultado ainda não foi explicado, porém pode se dever a algum grau de homologia em sequências presentes nesses sorotipos.

As amostras do sorotipo C, apesar de produzirem padrões discriminantes ao RAPD, não puderam ser distintas por reações de amplificação utilizando-se iniciadores desenhados de modo idêntico aos sorotipos A e B, tendo sido o

produto dessa reação inespecífica quando testados juntamente com amostras do sorotipo B.

RHUMA ET. AL.(1996) também testaram diferentes iniciadores para a identificação do sorotipo C, tendo sucesso em apenas um de sete iniciadores empregados. Relata também que a distinção entre os diversos sorotipos pode ser feita com base no padrão obtido ao RAPD. Esses resultados, em conjunto, apontam para a hipótese de que os sorotipos B e C podem ser bastante relacionados sob o ponto de vista genético.

Durante os nossos estudos, observamos que o par de iniciadores CNa-70-S / CNa-70-A amplificou também um produto de aproximadamente de 500 pares de bases a partir do DNA de *Cryptococcus albidus* (resultados não apresentados). Esse resultado indica que no caso das infecções por essa espécie, que ocasionalmente aparece em alguns espécimens clínicos, esse iniciador poderia também ser útil na sua identificação.

MITCHELL ET. AL. (1994) apresentaram um par de iniciadores designados CN4 e CN5 que pode identificar todas as variedades de *C. neoformans*, com exceção dos sorotipos D e AD. O uso desses iniciadores combinados com outros pares de iniciadores já descritos, podem permitir a identificação de todos os sorotipos de *Cryptococcus*.

Diversos agentes antifúngicos têm sido desenvolvidos, em especial, nas últimas três décadas (ANDRIOLE,1998). Antes do aparecimento da crescente epidemia de AIDS no mundo, o tratamento de escolha para a criptococose era a Anfotericina B associada à 5-Fluorocitosina (DISMUKES ET. AL., 1987; CHUCK & SANDE,1989). No entanto, esse esquema terapêutico apresentou reações

adversas que desaconselharam seu uso nos pacientes com doença criptocócica e AIDS. Desse modo, fez-se necessário o estudo de outras drogas antifúngicas em seu tratamento.

A gravidade da doença criptocócica em pacientes com AIDS tem levado a constante preocupação da sensibilidade do *C.neoformans* aos antifúngicos de uso corrente. A metodologia utilizada atualmente é a microdiluição em caldo, seguindo-se a determinação do NCCLS (1997). A padronização de testes de sensibilidade para o *C.neoformans* ainda permanece em estudo, não estando determinada, até o momento, a padronização dos “end points” para os testes de sensibilidade.

Diversos autores têm estudado as CIMs de isolados clínicos de *C. neoformans* empregando a metodologia do NCCLS. BARCHIESI ET. AL. (1994) descreveram os seguintes resultados de variações de CIMs para 50 amostras de *C.neoformans* utilizando a técnica de microdiluição: AMB: 0,125-1µg/ml; FCZ: 0,5 a 64 µg/ml; ITZ: 0,3-1µg/ml e 5-FC:1-64 µg/ml. GHANNOUM ET. AL. (1997) estudaram a sensibilidade ao FCZ de 149 isolados de *C.neoformans*, porém utilizando o meio de YNB com leitura em 72 horas, observaram variações de 1 a 16 µg/ml. No Brasil, FRANZOT & HAMDAN (1996) avaliaram 36 cepas de *C.neoformans* empregando a técnica de macrodiluição relataram variações de 0,25 a 1µg/ml para AMB; 0,5 a 16 µg/ml para FCZ; $\leq$ 0,03 a 0,25 µg/ml para ITZ e 0,25 a 8 µg/ml para 5-FC. Mais recentemente, MORALES ET. AL. (1999) estudando 100 cepas de *C.neoformans* provenientes do Brasil, Venezuela e Chile, observaram CIMs para AMB de 0,06 a 1 µg/ml; FCZ de 1 a 16 µg/ml; ICZ de

0,015 a 0,25 $\mu\text{g/ml}$ e 5-FC de 0,5 a 64 $\mu\text{g/ml}$. Todos esses autores observaram valores máximas de CIMs para AMB de 1 $\mu\text{g/ml}$.

No presente estudo, com 31 cepas de *C.neoformans*, foi obtido o CIM máximo de 2 $\mu\text{g/mL}$ para AMB, valor esse, mais elevado que os citados por outros autores na literatura. Valores semelhantes aos da AMB foram observados quando se empregou a formulação comercial da AMB, qual seja o Fungison. Para o FCZ, as cepas deste estudo apresentaram variações de CIMs de 0,5 a 32 $\mu\text{g/ml}$ onde também a CIM máxima foi o dobro da encontrada por outros autores, mas ainda considerada com susceptibilidade dose-dependente ao FCZ. Para o ICZ foram detectadas cepas resistentes com CIM máxima de 2 $\mu\text{g/ml}$ e para a 5-FC as CIMs variaram de 1 a 16 $\mu\text{g/ml}$ com presença de cepas susceptibilidade dose-dependente. De certa forma, pode-se considerar preocupante as CIMs máximas encontradas neste estudo para AMB e FCZ, uma vez que essas drogas são empregadas amplamente no tratamento de criptococose em pacientes com AIDS.

As 33 cepas deste projeto também foram testadas para sensibilidade aos antifúngicos utilizando-se a mesma metodologia de microdilução em caldo do NCCLS, porém empregando-se o meio de **SDB**, com o objetivo de observar a concordância de resultados em relação ao meio de RPMI1640. O meio de **SDB** é muito mais barato que o meio de **RPMI1640**, e sua utilização representaria uma vantagem econômica em países de recursos limitados como o nosso. No entanto, foram observadas discrepâncias nos resultados de CIMs máximas da AMB, FCZ e 5-FC tanto nos 24 isolados de *C. neoformans* de pacientes com HIV como nos 9 isolados dos pacientes sem HIV e portanto o emprego do meio de **SDB** nos testes

de sensibilidade aos antifúngicos necessita ainda maiores estudos. O meio de **YNB** foi empregado somente para o estudo da sensibilidade a 5-FC (**Tabela 10**) para as cepas de *C.neoformans* isoladas de pacientes com ou sem HIV. Os resultados foram muito discrepantes dos observados com o meio padrão **RPMI 1640** e com o meio experimental **SDB**, embora GRANNOUM ET. AL., (1992) e WITT ET. AL., (1996) tenham ressaltado o uso do meio de **YNB** para incrementar o crescimento de *C.neoformans* e assim melhorar a relevância dos CIMs dos antifúngicos.

Quando se analisou a resposta dos testes de sensibilidade aos antifúngicos entre os isolados de *C.neoformans* obtidos de pacientes com ou sem infecção pelo HIV, estes se mostraram semelhantes, com variações tanto nas CIMs máxima e mínima em ambos os grupos de isolados (**Tabelas 5,6,7,8 e 9**). Cabe ressaltar que o pequeno número de cepas (oito em 31 isolados) pode ter interferido nas conclusões de nossos resultados e que um número maior de cepas provenientes de pacientes sem HIV deverão ser testadas para possibilitar melhores conclusões.

Os estudos de sensibilidade ao FCZ apresentados na literatura tem referido a presença de cepas de *C.neoformans* resistentes ou com sensibilidade dose-dependente, principalmente, relacionado ao uso prévio de profilaxia primária ou secundária utilizando-se este antifúngico (ARMENGOU ET. AL.,1996; BERG ET. AL., 1997; ORNI-WASSERLAUF ET. AL., 1998).

Nos isolados desta casuística foram detectados cepas com sensibilidade dose-dependente ao FCZ em duas cepas. Uma isolada de paciente HIV positivo e outra de paciente HIV negativo. Quando essas duas cepas foram analisadas pelo

meio de **RPMI1640**, ambas foram consideradas como dose-dependente. Porém, uma das cepas de paciente HIV negativo, quando estudada pelo meio de SDB apresentou-se como resistente. A presença de cepas susceptibilidade dose-dependente ao FCZ torna-se bastante preocupante nos dias atuais, uma vez que essa droga é muito utilizada no tratamento da criptococose.

Com base nos resultados do presente trabalho pode-se sugerir que as principais drogas antifúngicas utilizadas no tratamento da criptococose, AMB, FCZ e 5-FC podem ser prescritas com segurança respeitando os esquemas terapêuticos da literatura (VAN DER HORST ET. AL., 1997; JUST-NUBLILNG ET. AL. 1997).

85 - CONCLUSÕES

Conclusões

1. O *Cryptococcus neoformans* sorotipo A foi o isolado mais frequente dentre as trinta e três cepas estudadas. Trinta e uma delas foram caracterizadas como sendo *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* sorotipo A e duas do sorotipo B.
2. Os *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* do sorotipo A puderam ser caracterizados através de reação de amplificação (PCR) utilizando-se um par de iniciador CN-a-70-S e CNa-70-A, que produziu um fragmento único de 695 pb.
3. Os *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* do sorotipo B puderam também ser caracterizados através de reação de amplificação (PCR) utilizando-se um par de iniciador CNb-49-S e CNb-49-A, que produziu um fragmento único de 448 pb.
4. A sensibilidade e especificidade desse teste, baseado na amplificação dos fragmentos mencionados, foram elevadas, utilizando-se cepas de referência nessa avaliação.
5. A maior concentração inibitória mínima observada entre as cepas testadas frente à Anfotericina B foi de 2 ug/ml. Esse valor é maior do que os citados por outros autores.
6. As concentrações inibitórias mínimas relativas ao Fluconazol variaram de 0,5 a 32 ug/ml. Esse fato é preocupante, sugerindo que haja cepa que exiba sensibilidade dose dependente à essa droga.
7. Houve variação das Concentrações Inibitórias Mínimas segundo o meio de cultura empregado nas determinações dessas concentrações

87 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências bibliográficas

1. ANAISSE, E.; SHWAR, R.; PAETZNICK, U.; ENSIGN, L. G.; WITTE, Z.; LAROCCO, M. – Two site comparison of broth microdilution and semisolid agar dilution methods for susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans* J. Clin. Microbiol., 31: 1370 – 72, 1993.
2. ANDRIOLE, V. T. – History of Antifungal Therapy. Infect. Dis. Clin. Prac.,(supl. 1): S2 – 7, 1998.
3. ARMENGOU, A.; PORCAR, C.; MASCARO, J.; GARCIA-BRAGADO, F. Possible development of resistance to fluconazole during suppressive therapy for AIDS – associated cryptococcal meningitis. Clin. Infect. Dis., 23: 1337 – 38, 1996.
4. AOKI, F. H.; IMAI, T.; TANAKA, R.; MIKAMI, Y.; TAGUCHI, H.; NISHIMURA, N. F.; NISHIMURA K.; MIYAJI, M.; SCHREIBER, A. Z.; BRANCHINI, M. L. M. – New PCR Primer Pairs specific for *Cryptococcus neoformans* serotypes A and B Prepared Based on Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Fingerprint Pattern Analyses. J. Clin. Microbiol., 37: 315 – 320, 1999.
5. BARCHIESE, F.; COLOMBO A.; 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 Committee for Clinical Laboratorial Standards Proposed Standard. J. Clin. Microbiol., 32: 2494 – 2500, 1994.
6. BARCHIESE, F.; HOLLIS, R.; MESSER, S. A.; SCALISE, G.; RINALDI, M. G.; PFALLER, M. A. – Electrophoretic karyotype and “In vitro” Antifungal Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* Isolates from Aids patients. Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 23: 99 – 103, 1995.
7. BAUGHMAN, R. P.; RHODES, M. N.; DOHN, M.N.; HENDERSON, H.; FRAME, P. T. – Detection of cryptococcal antigen in bronchoalveolar lavage fluid : a prospective study of diagnostic utility. Am. Rev. Respir. Dis., 145: 1226 – 229, 1992.
8. BERLIN, L.; BALLEY, J. W. – Cryptococcal meningitis: false-negative antigen test results and cultures and nonimmunosuppressed patients. Arch. Neurol., 46: 1312 – 1316, 1989.
9. BENNET, J. E.; BAYLEY, J.W. – Control for rheumatoid factor in the latex test for cryptococcosis. Am. J. Clin. Pathol., 56: 360 – 365 , 1989.
10. BERG, J.; CLANCY, C. J.; YU, C. Y.; NGUYEN, M. H. – The hidden danger of primary fluconazole prophylaxis in AIDS: emergence of fluconazole resistance in *C. neoformans*. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR

- HUMAN AND ANIMAL MYCOLOGY, 13, Parma, 8 – 13 June, 1997. **Abstracts.** Parma, Federazione Italiana Micopatologia Umana ed Animale, 1997. p.89. (Abstract oral, O 54).
11. BHATTACARJEE, A. K.; BENNET, J.E.; CLAUDEMANS, C.P.J. – Capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans*. **Rev. Infect. Dis.**, 6: 619 – 624, 1984
 12. BLACKSTOCK, R.; HALL, N. K. – Immunossuppression by avirulent, pseudohyphal forms of *Cryptococcus neoformans*. **Mycopathologia.**, 80: 95–99, 1982.
 13. BODENHOFF, J. – Development of strains of *Cryptococcus neoformans* resistant nystatin, amphotericin B, trichomycin and polymeylin B. **Acta Pathol. Microbiol. Scand.**, 73: 572 – 582., 1968
 14. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Coordenação Nacional do Programa Nacional de DST/Aids – Fonte – CN-DST/AIDS/SP/MS). - **Boletim Epidemiológico Ano XII – Nº 04 – Semana Epidemiológica – 35/1999 A 47/1999 – Setembro / Novembro – 1999** – Brasília - Ministério da Saúde –Secretaria de Políticas de Saúde – coordenação Nacional de DST/Aids – Fonte – CN-DST/AIDS/SP/MS)
 15. BOTTONNE, E. J.; SAKIN, I. K.; HURD, N. J.; WORMSER, G. P. Serogroup Distribution of *Cryptococcus neoformans* in patients with AIDS. **J. Infect. Dis.**, 156: 242, 1987.
 16. BRANDT, M. E.; HUTWAGNER, L. C.; KLUG, L. A.; BAUGHMAN, W. S.; RIMLAND, D.; GRAVISS, E. A.; HAMILL, R. J.; THOMAS, C.; RAPPAS, P. G.; REINGOLD, A. L.; PINNER, R. W.; AND THE CRYPTOCOCCAL DISEASE ACTIVE SURVEILLANCE GROUP. Molecular subtype distribution of *Cryptococcus neoformans* in four areas of the United States. **J. Clin. Microbiol.**, 34: 912 – 917, 1996.
 17. BRANDT, M. E.; BRAGG, S. L.; PINNER, S. L. – Multilocus enzyme typing of *Cryptococcus neoformans*. **J. Clin. Microbiol.**, 31: 2819 – 33, 1993.
 18. BRUATTO, M.; VIDOTTO, V.; MAINA, A. M. – Growth of *Cryptococcus neoformans* in thiamina-free media. **Mycopathologia.**, 119: 129 – 132 , 1992
 19. BULMER, G.S. – Twenty five years with *Cryptococcus neoformans*. **Mycopathologia.**, 109: 11 – 122 , 1990
 20. CASADEVALL, A.J.; SPITZER E.D.; WEBB, D.; RINALDI, M.G. – Susceptibilities of serial *Cryptococcus neoformans* isolates from patients with recurrent cryptococcal meningitis to amphotericin B and fluconazole. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 37: 1383 – 1386, 1993.

21. CASADEVALL, A.J.; FREUNDLICH, L. F.; MARCH, L.; SCHARF, M. – Extensive allelic variation in *Cryptococcus neoformans*. **J. Clin. Microbiol.**, 30: 1080 – 84, 1992.
22. CHANG, M. R.; PANIAGO, A.; WANKE, B.; LAZERA, M.; FILIU, E.; AGUIAR, E.; CÂNDIA, M. – Estudo das variedades de *Cryptococcus neoformans* isolados de pacientes internados no Hospital Universitário de Campo Grande – Mato Grosso do Sul. *In* CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA, 2, Rio de Janeiro, 17 a 21 de abril 1998. **Temas livres**. Rio de Janeiro, Sociedade Brasileira de Micologia, 1998. P.66.(Resumo A 46).
23. CHEN, S.C.; BROWNLEE, A. G.; SORRELL, T.G.; RUMA, P.; NIMMO, G. – Identification by random amplification of polymorphic DNA of a common molecular type of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in patients with Aids or other immunosuppressive conditions. **J. Infect. Dis.**, 173:754 –758 , 1996.
24. CHU, G.; VOLLRATH, D.; DAVIS, R. W. – Separation of large DNA molecular by Countour-Clamped Homogeneous Electric Fields. **Science.**, 234: 1582 – 85, 1986.
25. CHUCK, S. L.; SANDE, M.A. – Infection of *Cryptococcus neoformans* in the Acquired Immunodeficiency Syndrome. **N. Engl. J. Med.**, 321: 794 – 799 , 1989.
26. CLARK, R.A.; GREER, D.L.; ATKINSON, W.; VALAINIS, G.T.; HYSLOP, N. – Spectrum of *Cryptococcus neoformans* infection in 68 patients infected with human immunodeficiency virus. **Rev. Infect. Dis.**, 12: 768 – 777, 1990.
27. CRAMPIN, A. C.; MATHEWS, R.C.; HALL, D.; EVANS, E.G.V. – PCR fingerprinting of *Cryptococcus neoformans* by random amplification of polymorphic DNA. **J. Med. Vet. Mycol.**, 31: 463 – 465, 1993.
28. CURRIE, B.P.; FREUNDLICH, M.A.; SOTO, M.A.; CASADEVALL, A. – False negative cerebrospinal fluid cryptococcal latex agglutination tests for patients with culture-positive cryptococcal meningitis. **J. Clin. Microbiol.**, 31: 2519 – 2522, 1993.
29. DISMUKES, W.E.; CLOUD, G.; GALLIS, H. A.; KERKERING, T. M.; MEDOFF, G.; CRAVEN, P. C.; KAPLOWITZ, L. G.; FISHER, J. F.; GREGG, C. R.; BOWLES, R. N.; SHADOMY, S.; STAMM, A. M.; DIASIO, R. B.; KAUFAMAN, L.; SOONG, S.; BLACWELDER, W. C. – Treatment of cryptococcal meningitis with combination amphotericin B and fluocytosine for four as compared with six weeks. **N. Engl. J. Med.**, 317: 335 – 41, 1987
30. DISMUKES, W.E. – Cryptococcal meningitis in patients with Aids. **J. Infect. Dis.**, 157: 624 – 628 , 1988.

31. DROMMER, F.; VARMA, A.; RONIM, O.; MATHOULIN, S.; DUPONT, B. – Molecular typing of *Cryptococcus neoformans* serotype D clinical isolates. **J. Clin. Microbiol.**, 32: 2364 – 2371, 1994.
32. DUPERVAL, R.; HERMANS, P.E.; BREWER, N.S.; ROBERTS, G.D. – Cryptococcosis with emphasis on the significance of isolation of *Cryptococcus neoformans* from the respiratory tract. **Chest**, 72: 13 – 19, 1977.
33. DUPONT, B.; GRAYBILL, J. R.; ARMSTRONG, D.; LAROCHE, R.; TOUZÉ, J.E.; WHEAT, L. J. – Fungal infections in AIDS patients. **J. Med. Vet. Mycol.**, 30(Suppl.1): 19 – 28, 1992.
34. DYKSTRA, M.A.; FIREDMAN, L.; MURPHY, J.W. – Capsule size of *Cryptococcus neoformans* : control and relationship to virulence. **Infect. Immun.**, 16: 129 – 135, 1997.
35. ELLIS, D. H.; PFEIFFER, T. J. – Ecology, life cycle and infection propagule of *Cryptococcus neoformans*. **Lancet**, 336: 923 – 925, 1990.
36. ELLIS, D. H.; PFEIFFER, T. J. – Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. **J. Clin. Microbiol.**, 28: 1642 – 1644, 1990.
37. ELLIS, D. H. – *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. in Australia. **J. Clin. Microbiol.**, 25: 430 – 431, 1987.
38. ELLIS, D. H.; PFEIFFER, T. J. – The ecology of *Cryptococcus neoformans*. **Eur. J. Epidemiol.**, 8: 321 – 325, 1992.
39. EMMONS, C.W. – Isolation of *Cryptococcus neoformans* from soil. **J. Bacteriol.**, 62: 685 – 690, 1951.
40. EMMONS, C.W. – Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with the pidgeon (*Columba livia*). **Am. J. Hyg.**, 62: 227 – 232, 1955.
41. ENG, R. H. K.; BISHBURG, E.; SMITH, S.M. – Cryptococcal infection in patients with acquired immunodeficiency syndrome. **Am. J. Med.**, 81: 19 – 23, 1986.
42. ERKE, R. H. K.; SCHNEIDAU, Jr., J. D. – Relationship of some *Cryptococcus neoformans* hypha-forming strains to standard strains and to other species of yeasts as determined by deoxyribonucleic acid bases and homologies. **Infect. Immunol.**, 7: 941 – 948, 1973.
43. ESPINEL-INGROFF, A.; KISH, Jr. C. W.; KERKERING, T. M.; FROMTILING, R. A.; BARTIZAL, Jr. K.F.; GALGIANI, J. N.; VILLAREAL, K.; PFALLER, M.A.; GERARDES, T.; RINALDI, M.G.; FOTHERGILL, A. W. – Collaborative

- comparison of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests. **J. Clin. Microbiol.**, 30: 3138 – 3145 , 1992.
44. FARMER, S. G.; KOMOROVSKI, R. A. – Histologic response to capsule deficient *Cryptococcus neoformans*. **Arch. Pathol.**, 96: 383 – 387 , 1973.
 45. FERNANDES-BORDIGNON, G.; MURO, M. D.; DUPONT, B.; QUEIROZ-TELLES, F. – Quimiotipagem e sorotipagem de *Cryptococcus neoformans* In: Encontro Internacional sobre Paracoccidioidomicosis, 6, Montevideo, 21 a 24 Março, 1996. **Abstracts.**, Montevideo, 1996. P.94.
 46. FRIES, B.; CHEN, F.; CURRIE, B.; CASADEVALL, A. – Karyotype instability in *Cryptococcus neoformans* infections. **J. Clin. Microbiol.**, 34: 1531 – 34 , 1996.
 47. 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. Epidemiol.**, 35: 2243 – 2251, 1997.
 48. FROMTILING, R.A.; GALGANI, J.N.; PFALLER, M. A.; ESPINEL-INGROFF, A.; BARTIZAL, Jr., K. F.; BARTLET, M. S.; BODY, B.A.; FREY, C. L.; HALL, G. S.; ROBERTS, G. – Multicenter evaluation of broth macrodilution antifungal susceptibility test for yeasts. **Antim. Agents Chemot.**, 37: 39 – 45 , 1993.
 49. FROMTILING, R.A.; SHADOMY, H. J.; JACOBSON, E. S. – Decreased virulence in stable , acapsular mutants of *Cryptococcus neoformans*. **Mycopathologia.**, 79: 23 – 29 , 1982.
 50. GHANNOUM, M. A.; IBRAHIM, A. S.; FU, Y.; SHAFING, M. C.; EDWARDS, Jr., J. F.; CRIDLE, R. S. – Susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans*: a microdilution technique. **J. Clin. Microbiol.**, 30: 2881 – 2886, 1992.
 51. GHANNOUM, M. A.; PFALLER, M.; TUMBERLAND, M.; MBIDDE, E. K.; MESSER, S.; BELANGER, P.; JESSUP, C. J. – *Cryptococcus neoformans* susceptibility testing comparison between M27 – T Standard Method and Yeast Nitrogen Base Microtiter Method. In : INTERNATIONAL CONFERENCE ON ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, 37, Toronto, September 28 – October 1, 1997. **Abstracts.** American Society for Microbiology, 1997.(Abstract poster, D – 140)
 52. GOERING, R. V. – Molecular epidemiology of nosocomial infection. Analysis of chromosomal restriction fragment patterns by Pulsed Field Gel Electrophoresis. **Infect. Control and Hospital Epidemiology.**, 14: 595 - 600, 1993.
 53. GOODWIN, P. H.; ANNIS, L. S. – Rapid identification of genetic variation and pathotype of *Leptopharia maculans* by random polymorphic DNA assay. **Appl. Environ. Microbiol.**, 57: 2482 – 2456, 1991.

54. GORDON, M. A.; LAPA, E. – Elimination of rheumatoid factor in the latex test for cryptococcosis. **Am. J. Clin. Pathol.**, 60: 488 – 494 , 1974.
55. GRANGER, D. L.; PERFECT, J. R.; DURACK, D. T. – Virulence of *Cryptococcus neoformans* regulation of capsule synthesis by carbon dioxide. **J. Clin. Invest.**, 76: 50 – 516 , 1991
56. GRAY, L. D.; ROBERTS, G. D. – Experience with the use of pronase to eliminate interference factors in the latex agglutination test for cryptococcal antigen. **J. Clin. Microbiol.**, 26: 2450 – 2451 , 1988.
57. HAMILTON, A.J.; NOBLE, A.; DENNING, D. W.; STEVENS, D. A. – Performance of cryptococcal antigen latex agglutination kits on serum and cerebrospinal fluid specimens of Aids patients before and after pronase treatment. **J. Clin. Microbiol.**, 29: 333 – 339 , 1991.
58. HOFFMANN, S.; STENDERUP, J.; MATHIESEN, L.R. – Low yield of screening for cryptococcal antigen by latex agglutination assay on serum and cerebrospinal fluid from Danish patients with Aids or ARC. **Scand. J. Infect. Dis.**, 23: 697 – 702 , 1991.
59. HYNES, K. A.; SULLIVAN, D.J.; COLEMAN, D. J.; CLARKE, J. C. K.; EMIHANUS, R.; ATKISON, C.; CANN, K. J. – Involvement of multiple *Cryptococcus neoformans* strains in a single episode of cryptococcosis and reinfection with novel strains in recurrent infection demonstrated by RAPD and DNA fingerprinting. **J. Clin. Microbiol.** – 33: 99 – 102, 1995
60. IKEDA, R.; SHINODA, R.; MORITA, T.; JACOBSON, E. S. – Characterization of a phenol oxidase from *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* . **Microbiol. Immunol.**, 37: 759 – 764 , 1993.
61. ISHAQ, C. M.; BULMER, G. S.; FELTON, F. G. – An evaluation of various environmental factors affecting the propagation of *Cryptococcus neoformans*. **Mycopathologia. Mycol. Appl.**, 5: 81 –90 , 1967.
62. JACOBSON, E. S. – Antioxidant function of cryptococcal melanin . (abstr. OC2 p. 130) 2nd Int. Conf. *Cryptococcus cryptococcosis* . **International Society of Human and Animal Mycology . Milan.**, 1993.
63. JACOBSON, E. S.; JENKINS, N. D.; TODD, J. M. – Relationship between superoxide dismutase and melanin in a pathogenic fungus. **Infect. Immunol.**, 62: 4085 – 4086 , 1994.
64. JACOBSON, E. S.; TINNEL, S.B. – Antioxidant function of fungal melanin. **J. Bacteriol.**, 175: 7102 – 7104, 1993.
65. JUST-NÜBLING, G.; HEISE, W.; GÄNGER, G.; DIECKMANN, S.; ENZENBERGER, W.; L'AGE M.; HELM, E. B.; STILLE, W. Initial triple

- combination of amphotericin B, Fluocytosine and Fluconazole in AIDS patients with acute cryptococcal meningitis(abstr.P7-6, p.130) **2nd Int. Conf. Cryptococcus Cryptococcosis International Society of Human and Animal Mycology**, Milan, 1993.
66. KELLER, R. G.; PFROMMER, G. S. T.; KOZEL, T. R. – Occurrences, specificities and functions of ubiquitous antibodies in human serum that are reactive with the *Cryptococcus neoformans* cell wall. **Infect. Immunol.**, 62: 315 – 230, 1994.
 67. KENT, T. H.; LAYTON, J. M. – Massive pulmonary cryptococcosis. **Am. J. Clin. Pathol.**, 38: 596 – 604 , 1962.
 68. KERKERING, T. M.; DUMA, R. J.; SHADOMY, S. – The evolution of pulmonary cryptococcosis. Clinic implications from a study of 41 patients with and without compromising host factors. **Ann. Intern. Med.**, 94: 611 – 614, 1981.
 69. KOVACS, J. A.; KOVACS, A. A.; POLIS, M.; WRIGHT W. C.; GILL, V. J.; TUAZON, C. U.; GELMANN, E. P.; LANE, H. C.; LONGFIELD, R.; OVERTURF, G.; MURCHER, A. M.; FAUCI, A. S.; PARRILLO, J. E.; BENNETT, J. E.; MASUR, H. – Cryptococcosis in the acquired immunodeficiency syndrome. **Ann. Int. Med.**, 103: 533 – 538, 1985.
 70. KOZEL, T. R.; CAZIN, Jr., J. – Nonencapsulated variant of *Cryptococcus neoformans*. I. Virulence studies and characterization of soluble polysaccharide. **Infect. Immunol.**, 3: 287 – 294 , 1971.
 71. KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. – Epidemiological differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. **Am. J. Epidemiol.**, 120: 123 – 130 , 1984.
 72. KWON-CHUNG, K. J.; VARMA, A.; HOWARD, D. H. – Ecology of *Cryptococcus neoformans* and prevalence of its two varieties in Aids and non – Aids associated cryptococcosis. p. 103 – 113. In H. Van den Bossche, D. W. R. Mackenzie, G. Gauwenbergh, J. Van Cutsen, E. Drouhet, and B. Dupont (ed.), **Mycoses of Aids patients.**, Plenum Press, New York , N.Y., 1990.
 73. KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. – Cryptococcosis. (p. 397 – 446) . In **Medical Mycology . 16th ed.** Lea & Fehinger , Philadelphia , 1992.
 74. KWON-CHUNG, K. J.; WICKES, B. L.; STOCKMAN, ROBERTS, G. D.; ELLIS, D.; HOWARD, H. H. – Virulence, serotype and molecular characteristics of environmental strains of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* . **Infect. Immunol.**, 1869 – 1874, 1992.
 75. LAZERA, M. S.; WANKE, B.; NISHIKAWA, M. M. – Isolation of both varieties of *Cryptococcus neoformans* from saprophytic sources in the city of Rio de Janeiro , Brasil. **J. Med. Vet. Mycol.** 31: 449 – 454 , 1993.

76. LEVINSON, D. J.; SILCOX, D. C.; RIPPON, J. W.; THONSEN, S. – Septic arthritis due to nonencapsulated *Cryptococcus neoformans* with coexisting sarcoidosis. **Arthritis Rheum.**, 17: 1037 – 1047, 1974.
77. LEVITZ, S. M. The ecology of *Cryptococcus neoformans* and the epidemiology of cryptococcosis. **Rev Infect. Dis.**, 13: 1163 – 1169, 1991.
78. LITTMAN, M. L. – Capsule synthesis by *Cryptococcus neoformans*. **Trans. N. Y. Acad. Sci.**, 20: 623 – 648, 1958.
79. LO PASSO, C.; PERNICE, I.; GALLO, M.; BARBARA, C.; LUCK, F. T.; CRISEO, G.; PERNICE, A. – Genetic relatedness and diversity of *Cryptococcus neoformans* strains in the Maltese islands. **J. Clin. Microbiol.**, 35: 751 – 755, 1997.
80. MAKIMURA, K.; MURAYAMA, S. Y.; YAMAGUCHI. – Detection of a wide range of medically important fungi by the polymerase chain reaction. **J. Med. Microbiol.** 40(5):358 – 64, 1994.
81. MEDOFF, G.; KOBAYASHI, G. S.; KWAN, C. N.; SCHLESSINGER, D.; VENKOV, P. – Potentiation of rifampicin and 5-fluorcytosin as antifungal antibiotics by amphotericin B. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA** 69 – 196 – 199, 1972.
82. MELO, N. T.; LACAZ, C. S.; CHARBEL, C. E.; PEREIRA, A. D.; HEINS - VACCARI, E. M.; FRANÇA-NETO, A. S.; MACHADO, L. R.; LIVRAMENTO, J. A. – Quimiotipagem de *Cryptococcus neoformans*. Revisão da literatura. Novos dados epidemiológicos sobre a criptococose. Nossa experiência com o emprego do meio CGB no estudo daquela levedura. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.**, 35: 469 – 478, 1993.
83. MEYER, W.; MITCHELL, T. G. – Polymerase chain reaction fingerprinting in fungi using single primers specific to minisatellites and simple DNA repetitive DNA sequences : strain variation in *Cryptococcus neoformans*. **Electrophoresis**, 16: 1648 – 1656, 1995.
84. MEYER, W.; MITCHELL, G.; FREEDMAN, E.; VILGALYS, R. – Hybridization Probes for conventional DNA fingerprinting used as a single primer in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. **J. Clin. Microbiol.**, – 31: 2274 – 80, 1993
85. MICHGRUB, S.; VISCONTI, E.; AVELLINI, J. – Granulomatous prostatitis induced by capsule-deficient cryptococcal infection. **J. Urol.**, 143: 365 – 366, 1990.
86. MILLER, M. F.; MITCHELL, T. G.; STORKUS, W. J.; DAWSON, J. R. – Human natural killer cells do not inhibit growth to *Cryptococcus neoformans* in the absence of antibody. **Infect. Immunol.**, 58: 639 – 645, 1990.

87. 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.
88. MITCHELL, T. S.; FREEDMAN, E. Z.; WHITE, T. J.; TAYLOR, J. W. – Unique oligonucleotide primers in PCR for identification of *Cryptococcus neoformans*. **J. Clin. Microbiol.**, 32: 253 – 255, 1994.
89. MIYAGAWA, T.; HAMAGAMI, S.; OCHI, T.; OSUGI, T.; KIKUI, M.; TAKAHASHI, H. – Japanese summer type hypersensitivity pneumonitis : studies using *Cryptococcus* antigen. **Clin. Allergy**, 12: 343 – 354 , 1982.
90. MOORE, T. D. E.; EDMAN, J. C. – The α mating type locus of *Cryptococcus neoformans* contains a peptide pheromone gene. **Mol. Cell. Biol.**, 13: 1962 – 1970, 1993.
91. MOREIRA, C. L. N.; FRANZOT, S. P.; HAHN, R. C.; PRÍMOLA, N.S.; MORAES, E. M. P.; HAMDAN, J. S. – Epidemiologia das amostras de *Cryptococcus neoformans* isoladas em Belo Horizonte e no Rio de Janeiro: sorogrupagem, sorotipagem e tipagem bioquímica. In CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA, 2, Rio de Janeiro, 17 a21 de abril de 1998. **Temas Livres**. Rio de Janeiro, Sociedade brasileira de Micologia, 1998. P. 97. (Resumo A 110).
92. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of Yeasts : Approved standard . **National Committee for Clinical Laboratory Standards**. M27 – A Vol. 17 nº 08 Replaces M27 – T Vol. 15 Nº 10 , 1997.
93. NEILSON, M. R.; FROMTLING, R. A.; BULMER, G. S. – *Cryptococcus neoformans* : size range of infectious particles from aerosolized soil. **Infect. Immunol.**, 17: 634 – 638, 1977.
94. ORNI-WASSERLAUF, R.; SIEGMAN-IGRA, Y.; IZHAKOV, E.; BASH, I.; POLACHEK, I.; GILADI, M. – Fluconazole-Resistant *Cryptococcus neoformans* Isolated from an Immunocompromised Patient without Prior Exposure to Fluconazole. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, 38, San Diego, 24-27 September, 1998. **Abstracts**. American Society for Microbiology, 1998. P.458.(Abstract, J-24).
95. PAULA, C. R.; ITO, C. H.; PURCHIO, A.; GAMBALE, W.; CORREA, B.; MINAMI, P.S. – Biochemical serotyping and other physiological characteristics of 40 *Cryptococcus neoformans* samples isolated from clinical materials in Brazil. **Rev. Ibérica Micol.**, 5(supl.1) : 105, 1988.

96. PERFECT, J. R.; KETABCHI, N.; COX, G.M.; IMGRAM, C. W.; BEISER, C. – Karyotyping of *Cryptococcus neoformans* as an epidemiological tool. **J. Clin. Microbiol.**, 31: 3305 – 3309, 1993.
97. PERFECT, J. R.; MAGEE, B. B.; MAGEE, P.T. – Separation of chromosomes of *Cryptococcus neoformans* by pulsed field gel electrophoresis. **Infect. Immunol.**, 57: 2624 – 2627, 1989.
98. PFALLER, M. A.; BALE, M.; BUSCHELMAN, B.; LANCASTER, M.; ESPINEL-INGROFF, A.; REX, J. H.; RINALDI, M. G.; COOPER, C.R.; McGinnis, M. R. – Quality Control Guidelines for National Committee for Clinical Laboratory Standards Recommended Broth Macrodilution Testing of Amphotericin B, Fluconazole, and Flucytosine. **J. Clin. Microbiol.**, 33: 1104-07, 1995.
99. PFEIFFER, T. J.; ELLIS, D.H. – Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from California. **J. Infect. Dis.**, 163: 929 – 930, 1991.
100. PFEIFFER, T. J.; ELLIS, D.H. – Serotypes of Australia environmental and clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. **J. Med. Vet. Mycol.**, 31: 401 404, 1993.
101. POLACHECK, I.; LEBENS, G. A. – Electrophoretic karyotype of the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. **J. Gen. Microbiol.**, 135: 65 –71, 1989.
102. POLACHECK, I.; LEBENS, G. A.; HICKS, J. B. – Development of DNA probes for early diagnosis and epidemiological study of cryptococcosis in Aids patients. **J. Clin. Microbiol.**, 30: 925 – 930, 1992.
103. POLAK, A. – 5 – Fluorcytosine and its combination with other antifungal agents. p. 77 – 85. *In* Yamaguchi, H.; Kobayashi, G. S.; Takahashi (ed.) **Recent progress in antifungal chemotherapy.**, Marcel Decker , New York , 1992.
104. POLAK, A.; SHOLER, H. J.; WALL, M. – Combination therapy of experimental candidiasis cryptococcosis and aspergillosis in mice. **Chemotherapy** , 28: 461 – 479 , 1992
105. POONWAN, N.; MIKAMI, Y.; POONSUWAN, S.; BONG-LONG, J.; MEKHA, N.; KUSUN, M.; YAZAWA, K.; TANAKA R.; NISHIMURA, K.; KONIYAMA, K.- Serotyping of *Cryptococcus neoformans* strains isolated from clinical specimens in Thailand and their susceptibility to various antifungal agents. **Eur. J. Epidemiol.**, 13: 335 – 340, 1997.
106. POWDERLY, W. G. – Cryptococcal meningitis and Aids. **Clin. Infect. Dis.**, 17: 837 – 842, 1993.

107. POWELL, K.; DAHL, B. A.; WEEKS, R. J.; TOSH, F. E. – Airborne *Cryptococcus neoformans* : particles from pidgeon excreta compatible with alveolar deposition. **J. Infect. Dis.**, 124: 412 – 415, 1972.
108. POWER, E. G. M. – RAPD typing in microbiology – a technical review. **J. Hosp. Infect.** 34: 247 – 65, 1996.
109. PRARIVACHATIGUL, C.; CHAIPRASERT, A.; MEEVOOTISOM, V.; PATTANAKITASAKUL, S. – Assesment of PCR technique for the detection and identification of *Cryptococcus neoformans* . **J. Med. Vet. Mycol.**, 34: 1253 – 1260, 1996.
110. RODRIGUES DE MIRANDA, L. – *Cryptococcus* Kützing emend. Phaff et Spencer. P. 845 – 871. *In* N. J. W. Kreger Van Rijj (ed.) . **The yeasts : a Taxonomy study**, 3rd ed. Elsevier. Amsterdan, 1984.
111. ROZEMBAUM, R.; RIO GONÇALVES, A. J. – Clinical epidemiological study of 171 cases of cryptococcosis. **Clin. Infect. Dis.**, 18: 369 – 380, 1994.
112. RUIZ, A.; BULMER, G.S. – Particle size of airborne *Cryptococcus neoformans* in a tower. **Appl. Environm. Microbiol.**, 41: 1225 – 1229, 1980.
113. RHUMA, P.; CHEN, S. C.; SORRELL, T. C.; BROWNLEE, A.G. – Characterization of *Cryptococcus neoformans* by random DNA amplification. **Let. Appl. Microbiol.**, 23: 312 – 316, 1996.
114. SANDHU, G. S.; KLINE, B. C.; STOCKMAN, A. L.; ROBERTS, G. D. – Molecular probes for diagnosis of fungal infections. **J. Clin. Microbiol.**, 33: 2913 – 2919 , 1995.
115. SANT'ANNA, J. V.; MARTINS, M. A.; PUKINSKAS, S. R. B. S.; MELHEM, M. S. C. – Varieties of *Cryptococcus neoformans* in the state of São Paulo , Brazil. *In* : CONGRESS OF INTERNATIONAL SOCIETY FOR HUMAN AND ANIMAL MYCOLOGY, 13, Parma, 8 –13 June, 1997. **Abstracts**.
116. SCHATZ, D. C. & CANTOR, C. R. – Separation of Yeast Chromosome-Sized DNAs by Pulsed Field Gradient Gel Electrophoresis. **Cell**, 37:67-75, 1984.
117. SHADOMY, S.; PFALLER, M. A. - Laboratory studies with antifungal agents :susceptibility tests and quantitation in body fluids. p. 1173 – 1183. *In* A. Ballows, A.; Hausler Jr., W. J.; Hermann, K. L.; Iseberg H.D.; Shadomy H.J (ed.). **Manual of clinical microbiology** . 5th ed. American Society for Microbiology, Washington , D.C
118. SILVA, V.; FISCHMAN, O.; REYES, E.; GOMES,G.; CAMARGO, Z. P. – DNA molecular study from *Cryptococcus neoformans*. *In*: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR HUMAN AND ANIMAL MYCOLOGY, 13,

- Parma, 8-13 June, 1997. **Abstracts.** Parma. Federazione Italiana Micopatologia Umana ed Animale. 1997. P.125.(Abstract poster, P 185).
119. SORRELL, T. C.; CHEN, S. C.; RUMA, P.; PFEIFFER, T. J.; ELLIS, D. H.; BROWNLEE, A. G. – Concordance of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* by random amplification of polymorphic DNA analysis and PCR fingerprinting . **J. Clin. Microbiol.**, 34: 1253 – 1260, 1996.
 120. SPITZER, E. D.; SPITZER, S. G.; FREUNDLICH, L. F.; CASADEVALL, A. – Persistent of initial infection in recurrent *Cryptococcus neoformans* Meningitis. **Lancet** , 341: 595 – 596, 1993.
 121. STANSELL, J. D. – Pulmonary fungal infection in HIV – infected persons. **Semin. Resp. Infect.**, 8: 116 – 123 , 1993.
 122. SUGAR, A.M. – No, They Still Incite as Much grief as Previously. *In* FOCUS ON FUNGAL INFECTIONS, 8 , Orlando, 4 – 6 March, 1998. **Abstracts**, Georgia,Imedex, 1998. P. 23.
 123. SULLIVAN,D.; HAYNES, K.; MORAN, G.; SHANLEY, D.; COLEMAN, D. – Persistence, Replacement and Microevolution of *Cryptococcus neoformans* Strains in recurrent Meningitis in Aids Patients. **J. Clin. Microbiol.**, 34: 1739 – 44, 1996.
 124. SWINNE, D.; DEPPNER, M.; LAROCHE, R.; FLOCH, J. J.; KADENLE, P.; Isolation of *Cryptococcus neoformans* from houses of Aids-associated cryptococcosis patients in Bujumbura (Burindi). **AIDS** , 3: 389 – 390, 1989.
 125. TAELEMAN, H.; BOGAERTS, J.; BATUNGWANAYO, J.; VAN DE PERRE , P.; LUCAS, S.; ALLEN, S.- Failure of the cryptococcal serum antigen test to detect primary pulmonary cryptococcosis in patients infected with human Immunodeficiency virus. **Clin. Infect. Dis.**, 18: 119 – 120, 1994.
 126. TRILLES,L.; LAZERA, M.; WANKE, B.; CAMARGO, Z.P.;GOMES, G.; BEZERRA, C. F.; MACEDO, R.; NISHIKAWA, M. M.; CAVALCANTI, M., A. - Epidemiologia molecular de *Cryptococcus neoformans* no Brasil. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA, 2 , Rio de Janeiro, 17 a 21 abril 1998. **Temas livres**, Rio de Janeiro, Sociedade Brasileira de Micologia, 1998. P. 179(Resumo G 37).
 127. TARRANT, J. J.; GUILLOT, C.; WENGLAR, M.; JACKSON, J.; LEJENEUSSE, D. J.; ROLS, K. V. I. – Clinical comparison of the resin-containing BACTEC 26 Plus and the isolator 10 blood culturing systems.**J. Clin. Microbiol.**, 29: 2245 – 2249, 1991.
 128. UTZ, J. P.; GARRIGUES, L. L.; SANDE, M. A.; WARNER, J.F.; MANDELL, G. L.; McGEHEE, K. F.; DUMA, R. J.; SHADOMY, S. - Therapy of

- cryptococcosis with a combination of Fluocytosine and Amphotericin B. **B. J. Infect. Dis.**, 132: 368 – 373, 1975.
129. UTZ, J. P.; SHADOMY, S.; McGEHEE, K. F. – Fluocytosine : experience in patients with pulmonary and other forms of cryptococcosis. **B. J. Infect. Dis.**, 132: 368 – 373, 1975.
 130. 118. UTZ, J. P.; SHADOMY, S.; McGEHEE, K. F. – Fluocytosine . **N. Engl. J. Med.**, 286: 777 – 778, 1972.
 131. VAN BELKUN, A. – DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR. **Clin. Microbiol. Rev.**, 7: 174 – 184, 1994.
 132. VAN DER HORST, C. M.; SAAG, M.; CLOUD, G.; HAMILL, R.; GRAYBILL, J. R.; SOBEL, J. D.; JOHNSON, P. C.; TUAZON, C. U.; KERKERING, T.; MOSKOVITZ, B. I.; POWERLY, W. G.; DISMUKES, W. E.; THE NATIONAL INSTITUTE OF ALLERGY AND INFETIOUS DISEASES MYCOSES STUDY GROUP; AIDS CLINICAL TRIALS GROUP. – Treatment of cryptococcal meningitis associated with the acquired Immunodeficiency syndrome. **N. Engl. J. Med.**, 337: 15 – 21, 1997.
 133. VARMA, A.; KWON-CHUNG, K. J. – Restriction fragment poltmorphism in mitochondrial DNA of *Cryptococcus neoformans* . **J. Gen. Microbiol.**, 135: 3353 – 3362 , 1989.
 134. VARMA, A.; KWON-CHUNG, K. J. – DNA probe for strain of *Cryptococcus neoformans*. **J. clin. Microbiol.**, 39: 2960 – 2697, 1992.
 135. VARMA, A.; SWINNE, D., STAIB, F.; BENNETT, J. E.; KWON-CHUNG, K. J. – Diversity of DNA fingerprintings in *Cryptococcus neoformans*. **J. Clin. Microbiol.**, 33: 1807 – 1814 , 1995.
 136. VARTIVARIAN, S.E.; ANAISIE, E. J.; COWART, R. E.; SPRING, H. A.; TINGLER, M. J.; JACKSON, E. S. – Regulation of cryptococcal capsular polyssacharide by iron. **J. Infect. Dis.**, 167: 186 – 190, 1993.
 137. WEN, H.; CALDARELLI – STEFANO, R.; ROVERSELLI, A.; CAGLIATI, A.; FERRANTE, P.; TORTORANO, A. M.; VIVIANI, M. A. – Molecular typing of *Cryptococcus neoformans* serotype AD. *In*: Congress of the International Society for human and animal mycology, 13, Parma, 8 – 13 June, 1997.
 138. WICKES, B. L.; MOORE, T. D. F.; KWON-CHUNG, K. J. – Camparison of electrophoretic karyotypes and chromossomal location of tern genes in two varieties of *Cryptococcus neoformans*. 140: 543 – 550, 1994.
 139. WILLIAMS, J.; KUBELIK, A., LIVAK, K.; RAFALSKY, A.; TINGEY, S. – DNA polynorphisms amplified by arbitrary are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Res.**, 18: 6531 – 35, 1990.

140. WILLIAMSOM, P.R. – Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxydase of *Cryptococcus neoformans*: identification as a lacase. **J. Bacteriol.**, 176: 656 – 664, 1994
141. WITT, M.; LEWIS, R.; LARSEN, R.; MILEFCHIK, E.; LEAL, M. A., HAUBRICH, R. H.; RICHIE, J. A., EDWARDS, J. E. Jr., GHANNOUM, M.A. – Identification of Patients with acute AIDS – Associated Cryptococcal meningitis Who Can Be Effectively Treated with Fluconazole: The Role of Antifungal Susceptibility Testing. **Clin. Infect. Dis.**, 22: 322-28, 1996.
142. YAMAMOTO, Y.; KOHNO, S.; KOGA, H.; KAKAYA, H.; TMONO, K.; KAKU, M.; YAMAZAKI, T.; ARISAWA, M.; HARA, K. – Random amplified polymorphic DNA analysis of clinically and environmentally isolated *Cryptococcus neoformans* in Nagasaki. **J. Clin. Microbiol.**, 33: 3328 – 3332, 1995.
143. ZHU, H.; QU, F.; ZHUL, L. H. – Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride. **Nucleic Acids Res.**, 21: 5279 – 5280, 1993.
144. ZUGER, A.; LOUIE, E.; HOLTZMAN, R. S.; SIMBERKOFF, M. S.; RAHAL, J. J. – Cryptococcal disease in patients with the Acquired Immunodeficiency Syndrome : diagnostic features and outcome of treatment. **Ann. Intern. Med.**, 104: 234 – 240, 1986.

FONTES CONSULTADAS

HERANI, M. L. G. – Normas para apresentação de dissertações e teses. São Paulo. **BIREME**. 1990, 46p.

Summary

1. The cryptococcosis, a cosmopolitan disease, caused by *Cryptococcus neoformans*, a fungus, has been known about one century. The immunosuppression that occurs by the consequence with steroids treatments and other kinds of drugs, degeneratives and infectious diseases, facilitates the proliferation and the development of these infectious agents, that permit to this disease be transformed itself in an important disease, particularly, on these cases.
2. The appearance of AIDS at the 70's end has facilitated the proliferation of cryptococcosis, since one of the effects of this syndrome is the great immunocompromise of the patients immunological defenses.
3. In this work 33 strains of *Cryptococcus neoformans* were isolated from 24 patients treated at the Hospital of Clinics from The State University of Campinas – State of São Paulo, Brazil. The isolation of these strains were obtained from skin, blood and specially from Central Nervous System Fluid(CNSF).
4. The 33 strains of *Cryptococcus neoformans* were, innitially, submitted to an identification by serotyping technique using the comercial kit named Cryptocheck(latron, Japan). Twenty four strains, from nineteen AIDS patients, were characterized like serotype A. Considering the rest of the samples, nine were from patients without AIDS, and from these nine, seven were characterized as serotype A and 2 as serotype B.
5. *C. neoformans* strains serotype A and B were tested by PCR method with randomized commercial primers denominated R1, R2 and R3 to the determination of the genomic profile (RAPD). Using that profile, a exclusive 695 bp band were selected from the serotype A strains and other with 448 bp, beeing exclusive too in the serotype B strains. These

amplicons were sequenced and, after that, there was a developing of two primer pairs to be tested to the characterization of serotype A and B.

6. These two primer pairs were tested in the 33 strains of *C. neoformans*, previously determined like serotype A and B by the agglutination test. In the serotype A case, from all reference strains tested, as well strains isolated from clinical cases, there was amplification of typical sequence of this serotype(695 bp band). Similarly, in the serotype B strains, a 448 bp band were amplified. The amplification of these specific sequences, using primers studied for both serotypes was specific and sensitive, compared with the agglutination test.
7. For minimal inhibitory concentraion(MIC) study, 33 strains of *C. neoformans* were tested with amphotericin B, Itraconazole, Fluconazole, 5- Fluorcytosin and commercial Amphotericin B(Fungison®), according the "National Comittee for Clinical and Laboratorial Standards"(NCCLS) proceedings.
8. The MIC of the various studied drugs, using RPMI 1640 medium for 33 strains of *C. neoformans* were: Amphotericin B: 0,25 to 2 µg/ml; Fungison®: 0,03 to 2 µg/ml; Fluconazole:0,5 to 32 µg/ml; Itraconazole: 0,06 to 2 µg/ml; 5 – Fluorcytosin: 1 to 16 µg/ml.
9. The results of this study showed a new approach to the characterization of *C. neoformans* serotype A and B based in the Protein Chain Reaction(PCR) technic, to the knowledge of *C. neoformans* strains sensibility collected from patients against antifungal agents and to the worried presence of strains SDD(Sensibility Dose Dependent) to the Fluconazol in patients with and without HIV infection.