

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

Diferenciação das espécies *Cryptococcus neoformans* e
Cryptococcus gattii utilizando a metodologia de PCR multiplex e
determinação do perfil epidemiológico de pacientes com
meningite criptocócica

Dissertação de Mestrado

ANA LUSIA LEAL

Porto Alegre 2006

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

Diferenciação das espécies *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* utilizando a metodologia de PCR multiplex e determinação do perfil epidemiológico dos pacientes com meningite criptocócica no Estado do Rio Grande do Sul

ANA LUSIA LEAL

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

Orientadora: Profa. Marilene Henning Vainstein

Porto Alegre, abril de 2006

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e no Instituto de Pesquisas Biológicas - Laboratório Central de Saúde Pública IPB-LACEN/RS, com apoio financeiro do CNPq e FEPPS.

AGRADECIMENTOS

À MARILENE HENNING VAINSTEIN PELA ORIENTAÇÃO E POR OPORTUNIZAR A REALIZAÇÃO DESTE TRABALHO.

À MARIA CRISTINA BASSANESI PELO INCENTIVO À PESQUISA, APOIO E AMIZADE INESTIMÁVEIS DESDE A GRADUAÇÃO.

AO COLEGA ALEXANDRE FUENTEFRIA PELA AMIZADE E DISPONIBILIDADE.

AO COLEGA JULIANO BOLDO PELO AUXÍLIO NAS ANÁLISES ESTATÍSTICAS.

A JOSIANE FAGANELLO E A WALQUÍRIA ARRUDA POR TODOS OS ENSINAMENTOS E PELA AMIZADE.

A MINHA FAMÍLIA POR TODO O AMOR, PACIÊNCIA E INCENTIVO AOS MEUS ESTUDOS.

AO ANGÉLICO PELO AMOR E POR FAZER TUDO PARECER MAIS SIMPLES.

AOS PROFESSORES E FUNCIONÁRIOS DO CENTRO DE BIOTECNOLOGIA.

A TODOS QUE CONTRIBUÍRAM PARA A REALIZAÇÃO DESTE TRABALHO.

Ao CNPQ E FEPPS PELO AUXÍLIO FINANCEIRO.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES	7
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	10
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
1. JUSTIFICATIVA.....	15
2. INTRODUÇÃO	17
2.1. CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS	17
2.2. CRIPTOCOCOSE	22
2.3. DIAGNÓSTICO	27
2.4. FATORES DE VIRULÊNCIA	34
2.5. EPIDEMIOLOGIA.....	37
3. OBJETIVOS.....	40
3.1. OBJETIVO GERAL	40
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
4. METODOLOGIA	41
4.1. AMOSTRAGEM.....	41
4.2. IDENTIFICAÇÃO POR COLORAÇÃO NEGATIVA	42
4.3. PRODUÇÃO DE MELANINA	42
4.4. PRODUÇÃO DE UREASE.....	43
4.5. CULTIVO EM ÁGAR CGB (ÁGAR CANAVANINA-GLICINA-AZUL DE BROMOTIMOL) ...	43
4.6. TESTE DE AGLUTINAÇÃO EM LÁTEX.....	44
4.7. SOROTIPAGEM	44
4.8. EXTRAÇÃO DE DNA.....	45
4.9. REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO	46
4.10. TESTE DE SENSIBILIDADE.....	47

4.11. TESTE DE ESPECIFICIDADE.....	47
4.12. REAÇÃO DE CLIVAGEM	47
4.13. DETERMINAÇÃO DO PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DOS CASOS NOTIFICADOS	48
4.14. TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS.....	49
4.15. ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
5. RESULTADOS.....	51
5.1. BANCO DE AMOSTRAS.....	51
5.2. IDENTIFICAÇÃO PELOS MÉTODOS TRADICIONAIS	61
5.3. SOROTIPAGEM	61
5.4. EXTRAÇÃO DE DNA.....	61
5.5. REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO.....	62
5.6. TESTE DE SENSIBILIDADE.....	65
5.7. TESTE DE ESPECIFICIDADE.....	65
5.8. REAÇÃO DE CLIVAGEM	66
5.9. ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA	67
5.9.1. <i>Freqüência de cor de pele dos pacientes.....</i>	<i>67</i>
5.9.2. <i>Freqüência do gênero dos pacientes</i>	<i>67</i>
5.9.3. <i>Infecção pelo HIV.....</i>	<i>68</i>
5.9.4. <i>Procedência</i>	<i>69</i>
5.9.5. <i>Faixas etárias.....</i>	<i>70</i>
5.9.6. <i>Sintomatologia</i>	<i>71</i>
5.10. TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AO FLUCONAZOL	73
5.11. TESTE DE KAPPA PARA COMPARAÇÃO ENTRE AS METODOLOGIAS DE PCR E CGB	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

µg	micrograma
µL	microlitro
µm	micrômetro
µM	micromolar
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CGB	ágar canavanina-glicina-azul de bromotimol
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CRS	Coordenadoria Regional de Saúde
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxirribonucleosídeo(s) trifosfato(s)
EDTA	ácido etileno diamianino tetracético
g	grama
GalXM	galactoxilomanana
GXM	glicuronoxilomanana
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
ITS	espaço transcrito interno
LCR	líquor
M	molar
mg	miligrama
MIC	Concentração inibitória mínima
mL	mililitro
mM	milimolar
MP	manoproteína

NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
n	número amostral
ng	nanograma
°C	graus Celsius
pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia da polimerase
pH	potencial hidrogeniônico
pmol	picomol
RAPD	<i>Random Amplification of Polymorphic DNA</i>
rpm	rotações por minuto
SDS	dodecilsulfato de sódio
SNC	sistema nervoso central
spp	espécies
TB	tuberculose
Tris	2-amino-2-hidroximetilpropano-1,3-diol
U	unidades
UFC	unidade formadora de colônia
var.	variedade

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** O complexo taxonômico *Cryptococcus neoformans*. **21**
- Figura 2.** Esquema da rota de infecção por *C. neoformans* e *C. gattii* mais aceita atualmente. **26**
- Figura 3.** Identificação de *C. neoformans* e *C. gattii* por PCR multiplex utilizando os *primers* CNA70A, CNA70S, CNB49A e CNB49S. **63**
- Figura 4a:** alinhamento da seqüência amplificada pelos *primers* CNB49S e CNB49A, específicos para *C. gattii*, com a seqüência correspondente em *C. neoformans* var. *neoformans* JEC21 (cromossomo 2, polimerase putativa). **63**
- Figura 4b:** alinhamento da região amplificada pelos *primers* CNA70S e CNA70A, específicos para *C. neoformans* com a região correspondente em *C. neoformans* var. *neoformans* JEC21 (cromossomo 3, aminotransferase putativa). **64**
- Figura 5.** Teste de sensibilidade da PCR multiplex utilizando os *primers* CNA70A, CNA70S, CNB49A e CNB49S. **65**
- Figura 6.** Teste de especificidade da PCR multiplex utilizando os *primers* CNA70A, CNA70S, CNB49A e CNB49S. **66**
- Figura 7.** Identificação dos amplicons gerados pelos *primers* CNA70A, CNA70S, CNB49A e CNB49S utilizando clivagem com a endonuclease de restrição EcoRI. **66**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características fenotípicas e moleculares dos isolados de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> e características dos pacientes.	52
Tabela 2. Comparação da média de rendimento dos protocolos de extração de DNA.	62
Tabela 3. Frequência de cor de pele dos pacientes com meningite criptocócica e dos pacientes do grupo controle.	67
Tabela 4. Frequência do gênero entre os pacientes com meningite criptocócica e dos pacientes do grupo controle.	68
Tabela 5. Frequência de indivíduos infectados pelo HIV entre os pacientes com meningite criptocócica e os pacientes do grupo controle.	68
Tabela 6. Procedência das amostras.	69
Tabela 7. Frequência de faixas etárias dos pacientes com meningite criptocócica e dos pacientes do grupo controle.	71
Tabela 8. Sintomatologia mais freqüente entre os pacientes com meningite criptocócica e os pacientes do grupo controle.	72
Tabela 9. Concentração inibitória mínima de fluconazol para as amostras testadas.	73
Tabela 10. Teste de Kappa para comparação do PCR e do CGB em relação a sorotipagem.	73

RESUMO

Cryptococcus neoformans é uma levedura oportunista que pode se alojar no sistema nervoso central causando meningite, meningoencefalite e encefalite principalmente em indivíduos com algum comprometimento do sistema imune. É responsável por 4,5% das infecções oportunistas que acometem pacientes portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV-positivos). *Cryptococcus gattii* é um patógeno primário responsável por uma alta incidência de criptococomas no pulmão e no cérebro e que apresenta uma alta morbidez neurológica e uma resposta retardada à terapia antifúngica. O diagnóstico da criptococose é, atualmente, baseado na detecção da levedura em amostras clínicas, no cultivo com posterior identificação bioquímica e na pesquisa de antígenos circulantes. A diferenciação entre as espécies *C. neoformans* e *C. gattii*, na maioria dos laboratórios, é realizada utilizando o meio de cultura ágar canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB) e demora em torno de sete dias.

Neste trabalho foi padronizada uma metodologia de PCR multiplex que pode vir a substituir as provas bioquímicas utilizadas atualmente para a identificação das espécies de *Cryptococcus*, reduzindo em 6 dias o tempo necessário para a identificação das espécies. A metodologia também se mostrou mais específica na identificação das espécies, concordando com os resultados das sorotipagens em todos os 132 isolados de *Cryptococcus* testados, enquanto o resultado obtido com o cultivo em ágar CGB foi discordante em 6 dos 132 isolados, sendo 5 falso-positivos e 1 falso negativo.

Foi também realizado o primeiro estudo epidemiológico do perfil de pacientes com meningite criptocócica no estado do Rio Grande de Sul notificados no Laboratório Central de Saúde Pública IPB-LACEN/RS no período de 2000 a

2005. A maioria dos pacientes é do sexo masculino (77,12%), branco (83,5%), na faixa etária entre 30 a 39 anos (46,24%) e infectados pelo HIV (95%).

ABSTRACT

Cryptococcus neoformans is an encapsulated yeast which can affect the Central Nervous System (CNS) causing meningitis, meningoencephalitis and encephalitis mostly in immunocompromised individuals. It is responsible for 4,5% of the opportunistic infections in the HIV (Human Immunodeficiency Vírus) infected patients. *Cryptococcus gattii* is a primary pathogen responsible for a high incidence of cryptococcomas in the lung and brain and shows a high neurologic morbidity and a delayed answer to the antifungic therapy.

Nowadays, the cryptococcosis diagnostic is based on the observation of the yeast in the clinical samples, on cultivation with biochemical identification and on cryptococcal antigen determination by latex agglutination test. The differentiation between the species *C. neoformans* e *C. gattii*, in the majority of laboratories, is done using the canavanine-glicine-bromotimol blue agar (CGB) and takes around seven days.

In this work we padronized a multiplex PCR methodology which may substitute the biochemical tests used to identify the species, reducing in 6 days the species identification.

The method also is more specific, and the results agreed with the serotyping method in all 132 samples tested, while the result obtained with the CGB agar have disagreed in 6 out of 132 samples, with 5 false-positives and 1 false-negative results.

This is the first report of epidemiological study of cryptococcal meningitis patients profile in Rio Grande do Sul State notified to the Laboratório Central de Saúde Pública IPB-LACEN/RS between 2000 to 2005. Most of patients are man

(77,12%), white (83,5%) median age between 30 to 39 years old (46,24%) and HIV positive (95%).

1. JUSTIFICATIVA

As infecções fúngicas podem ser consideradas como um pequeno desvio no ciclo vital natural de alguns fungos, os quais, na maioria das vezes, necessitam de determinantes que possibilitem seu desenvolvimento no hospedeiro. Esses determinantes são fatores de virulência que propiciam ao microrganismo transpor as defesas do hospedeiro.

Apesar do número relativamente pequeno de espécies envolvidas em infecções, a incidência de doenças causadas por fungos patogênicos e oportunistas tem aumentado ao longo da última década. Este aumento é principalmente decorrente da epidemia da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e dos avanços na medicina moderna que mantêm ou prolongam a vida de muitos pacientes imunodebilitados. Além disso, a real abrangência de doenças fúngicas é certamente subestimada devido a limitações de diversos métodos diagnósticos atuais.

A criptococose é a quarta causa mais freqüente de infecção oportunista em pacientes aidéticos. Dentre as infecções fúngicas, a criptococose é a principal responsável pela morbidade e mortalidade destes pacientes. Na maioria dos países a prevalência em pacientes aidéticos tem se mantido na faixa de 5 a 10%. (CASADEVALL & PERFECT, 1998). Somente após o surgimento da criptococose como micose letal em pacientes aidéticos é que a doença e seu agente etiológico geraram interesse considerável na comunidade médica. Antes de 1981, a criptococose era uma infecção rara e, já no início dos anos 90 tornou-se epidêmica em algumas regiões.

O recente surto de criptococose causado por *C. gattii* na região de clima temperado de Vancouver, em 2004, aumentou ainda mais o interesse das comunidades médica e científica neste patógeno, sugerindo que esta espécie está começando a ocupar novos nichos. Sendo este um patógeno primário, que não necessita imunodeficiência prévia do hospedeiro para causar infecção, é de grande importância monitorar onde e quantos casos de infecção por esta espécie estão ocorrendo, a fim de identificar novos possíveis surtos, mesmo em regiões com clima onde não seria esperado encontrar esta espécie.

C. neoformans é um patógeno oportunista enquanto *C. gattii* é um patógeno primário e as doenças causadas por estas espécies diferem em vários aspectos, sendo o mais importante deles as diferenças no tratamento. *C. gattii* em geral é menos susceptível aos antifúngicos, necessitando doses maiores das drogas e tratamentos mais prolongados. Além disso, lesões de massa (criptococomas) nos pulmões e no cérebro que necessitam intervenção cirúrgica, bem como a ocorrência de seqüelas neurológicas são mais frequentes na doença causada por *C. gattii*.

A identificação das espécies *C. neoformans* e *C. gattii* em laboratórios é feita por cultivo em meio agar CGB partindo do isolado primário. O total de tempo decorrido para a análise do resultado do cultivo em CGB é de sete dias e resultados falso-positivos tem sido relatados na literatura. O uso de um método rápido de extração de DNA aliado a metodologia de PCR multiplex são promissores para a rápida identificação das espécies, podendo agilizar a identificação das mesmas em laboratório, com maior especificidade.

2. INTRODUÇÃO

2.1. *Cryptococcus neoformans*

Cryptococcus neoformans é um basidiomiceto de forma esférica ou globosa, com diâmetro aproximado de 2-8 μm (FAGANELLO *et al.*, 2006) com uma cápsula mucopolissacarídica cujo tamanho varia de <5 μm até >30 μm (ZARAGOZA *et al.*, 2003). A cápsula apresenta três componentes principais, a glicuronoxilomanana (GXM), a galactoxilomanana (GalXM) e a manoproteína (MP) (FRIES *et al.*, 1999). A GXM consiste de ácido glicurônico, xilose e manose; a GalXM é composta de galactose, xilose e manose; e, a MP contém manose como carboidrato predominante, e, em menor quantidade, galactose e xilose (MCFADDEN & CASADEVALL, 2001).

Cerca de 90% do polissacarídeo capsular é GXM, e diferenças nessa estrutura são a base para a separação dos isolados de *C. neoformans* em quatro sorotipos: A, B, C, e D. Alguns isolados possuem características de ambos os sorotipos A e D, e têm sido classificados como um quinto sorotipo, o sorotipo híbrido AD (IKEDA *et al.*, 1985). Esta classificação está ainda sob avaliação e a designação correta para isolados do sorotipo AD ainda não está definida (DIAZ *et al.*, 2000; NAKAMURA *et al.*, 2000). Inicialmente, esses quatro sorotipos pertenciam a duas variedades: *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipos A, D e AD) e *C. neoformans* var. *gattii* (sorotipos B e C) (SORRELL *et al.*, 1996). Em 1999, foi sugerida uma nova classificação, sendo uma nova variedade, a variedade *grubii* reconhecida para isolados do sorotipo A, com base em características clínicas, moleculares e biológicas (FRANZOT *et al.*, 1999).

C. neoformans var. *gattii* foi reconhecido pela primeira vez em 1970 e tem sido diferenciado de *C. neoformans* var. *neoformans*, por características fenotípicas, habitat natural, epidemiologia, manifestações clínicas e resposta a terapias antifúngicas (SORRELL *et al.*, 2001). A substituição de 2 nucleotídeos no gene 16S e 10 nucleotídeos no gene 23S do rRNA foram relatadas por FAN *et al.* (1994). Importantes diferenças na composição de nucleotídeos do rDNA destas variedades foram encontradas (DIAZ *et al.*, 2000) e uma significativa divergência genética entre elas fez com que fosse proposta a separação destas em duas espécies, *C. neoformans* e *C. bacillisporus* (BOEKHOUT *et al.*, 2001), conforme proposto originalmente por KWON-CHUNG (1976). Diferenças nas características da cápsula entre as variedades foram observadas por microscopia eletrônica de varredura (FAGANELLO *et al.*, 2006).

Após analisar árvores filogenéticas construídas com base no sequenciamento de diversos genes de *C. neoformans* verificando que *C. neoformans* var. *neoformans* e *C. neoformans* var. *gattii* estavam em *clusters* monofiléticos separados, KWON-CHUNG *et al.* (2002) sustentaram a separação em duas espécies proposta em 2001 por Boekhout. Outro fator considerado para a separação das espécies foi a verificação de que não havia evidência de recombinação gênica na prole do cruzamento entre ambas. Neste trabalho foi proposto que se conservasse o nome da espécie como *Cryptococcus gattii* (KWON-CHUNG *et al.*, 2002).

A variedade *neoformans* é freqüentemente citada como sendo de distribuição mundial, em trabalhos que não consideram os sorotipos A e D como duas variedades distintas. Entretanto, o sorotipo A (*C. neoformans* var. *grubii*) é mais amplamente distribuído no mundo, enquanto o sorotipo D (*C. neoformans*

var. *neoformans*) está presente predominantemente em zonas temperadas (MARTINEZ *et al.*, 2001). Os sorotipos B e C (*C. gattii*) foram considerados restritos a países de clima tropical e subtropical até recentemente, quando foi relatada uma epidemia na região de clima temperado de Vancouver, Canadá (HOANG *et al.*, 2004; KIDD *et al.*, 2004; FRASER *et al.*, 2005).

Diferenças na tolerância térmica de isolados das variedades *grubii* e *neoformans* também foram observadas, sendo a segunda mais susceptível a altas temperaturas (MARTINEZ *et al.*, 2001). Provavelmente esta variação esteja relacionada com a distribuição geográfica mais ampla da variedade *grubii* e, possivelmente, também com a prevalência de infecções relacionadas à pele (tecido mais frio) pela variedade *neoformans*.

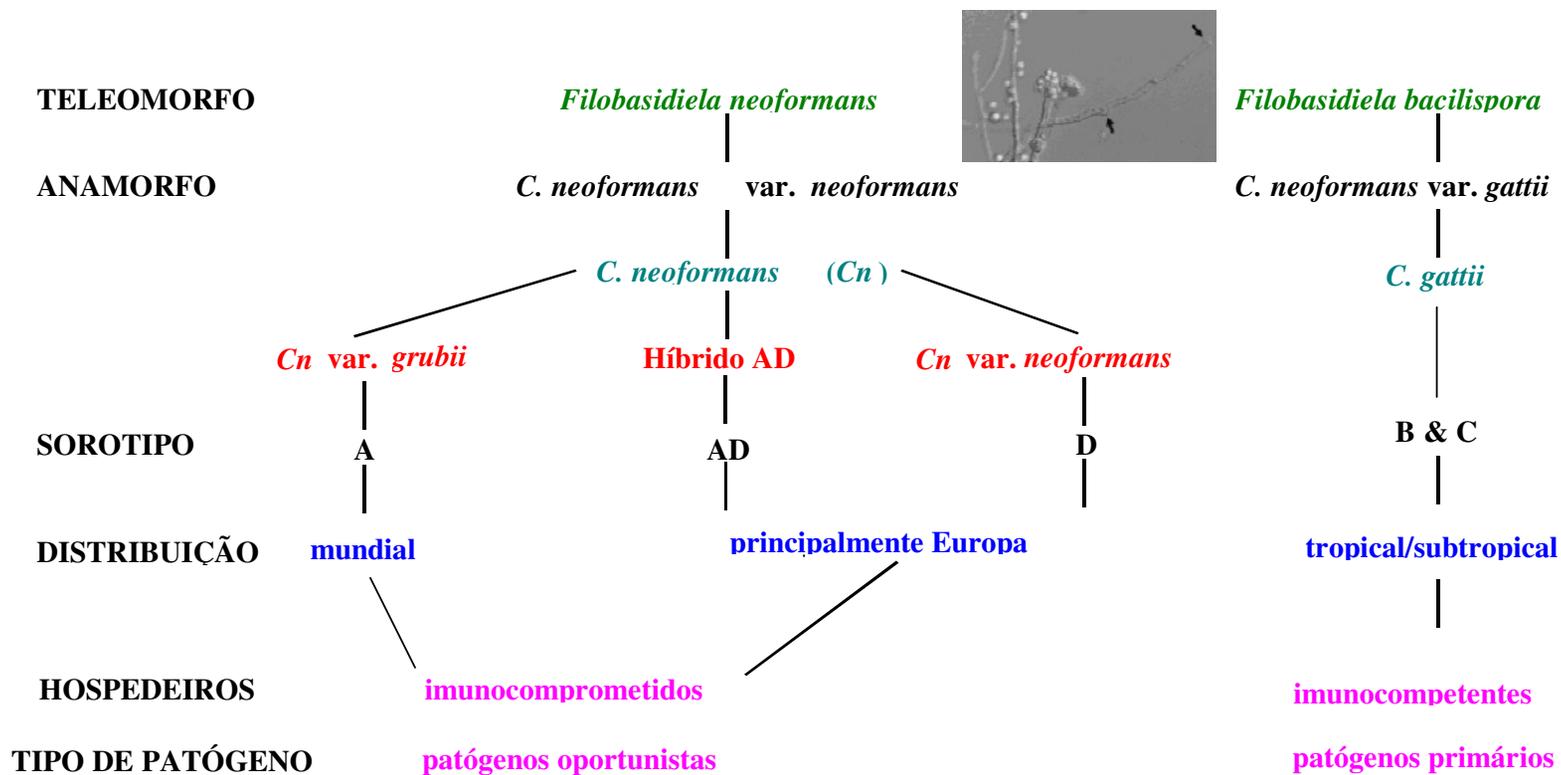
A fase teleomorfa do fungo, ainda não encontrada na natureza, e induzida em laboratório foi classificada por Kwon-Chung como *Filobasidiella neoformans*, correspondente ao anamorfo *C. neoformans* e *Filobasidiella bacillispora* correspondente ao *C. gattii* (KWON-CHUNG & BENNETT, 1992). No estado teleomórfico, são evidentes as diferenças fenotípicas entre as espécies. Em *F. neoformans*, os basidiosporos são esféricos, elípticos ou cilíndricos com paredes rugosas; em *F. bacillispora*, são baciliformes e com parede lisa.

A Figura 1 apresenta um resumo das principais características do complexo *C. neoformans*.

Recentemente, foi concluído o sequenciamento do genoma de dois isolados de *C. neoformans* sorotipo D: JEC 21, com 19-megabases, e B-3501A, com 18,5-megabases. A anotação completa foi realizada apenas para o isolado JEC21. O genoma possui aproximadamente 6500 genes estruturais com 5% de transposons e uma média de 4,5 íntrons por gene (TENNEY *et al.*, 2004; LOFTUS

et al., 2005). Outros três isolados estão sendo seqüenciados, incluindo um sorotipo A (H99), um sorotipo B ambiental (WM276) e um sorotipo B clínico (R265) da recente epidemia de Vancouver (IDNURM *et al.*, 2005).

Figura. 1: O complexo taxonômico *Cryptococcus neoformans*



2.2. Criptococose

A criptococose é uma micose sistêmica que se manifesta tanto como doença oportunista, em pacientes imunossuprimidos, como doença primariamente patogênica em indivíduos imunocompetentes, dependendo da espécie que infecta o paciente. Assim, *C. neoformans* var. *neoformans* e *C. neoformans* var. *grubii* são patógenos oportunistas e *C. gattii* é um patógeno primário (IDNURM *et al.*, 2005).

Além das espécies patogênicas *C. neoformans* e *C. gattii*, outras espécies de *Cryptococcus* tem sido encontradas em uma grande variedade de ambientes, como extremo frio da Antártica, em elevações como no Himalaia, e em águas salinas. Apesar da habilidade de adaptação climática, a maioria das espécies não sobrevive em tecidos de mamíferos devido à alta temperatura corporal e ao sistema de defesa imune do hospedeiro. Existem raros relatos de *Cryptococcus* não *neoformans* ou *gattii* tais como *C. laurentii*, *C. curvatus*, e *C. albidus* causando infecções em humanos, embora não existam provas histológicas (GORDON, 1972; KRUMHOLZ, 1972; GLUCK *et al.*, 1987; HOROWITZ *et al.*, 1993; CURTIS *et al.*, 1995; DROMER *et al.*, 1995). Apesar dos humanos estarem expostos a estas espécies, as quais são encontradas em vários ambientes, somente *C. neoformans* e *C. gattii* podem ser considerados como as espécies que consistentemente causam criptococose.

Com o surgimento da AIDS, na década de 80, a criptococose deixou de ser uma doença rara, passando a ocupar o 4º lugar entre as doenças infecciosas que acometem os indivíduos aidéticos (CASADEVALL & PERFECT, 1998). Além da AIDS, outros fatores que colaboraram para este aumento na incidência da doença

são o aumento do número de transplantes de órgãos e terapias imunossupressoras. Os tratamentos antiretrovirais e antifúngicos reduziram o número de mortes por criptococose, e, mesmo assim, em alguns países em desenvolvimento onde o tratamento é limitado, a mortalidade devido à criptococose em pacientes com AIDS pode ser maior do que 30% (IDNURM *et al.*, 2005).

C. neoformans é a causa mais comum de meningite fúngica (FRASER *et al.*, 2005). O processo de disseminação não é totalmente entendido. A forma de contágio é, provavelmente, a inalação de basidiósporos produzidos por frutificação haplóide ou *mating*. Os basidiósporos possuem tamanho de 1-2 μ m que permitem a deposição nos alvéolos pulmonares e parecem ser mais infecciosos do que a forma vegetativa da levedura, que possui tamanho de 2-4 μ m e podem possuir cápsula (HULL & HEITMAN, 2002). A Figura 2 demonstra a rota atualmente mais aceita de infecção.

Acredita-se que a rota da infecção inicia-se nos pulmões. Algumas evidências para este fato são: identificação de excretas de aves como reservatório ambiental e a descoberta, nestas, de partículas infecciosas com tamanho compatível com a deposição alveolar; reconhecimento da pneumonia criptocócica e descrição de nódulos subpleurais (CASADEVALL & PERFECT, 1998; HULL & HEITMAN, 2002; ABEGG *et al.*, 2006). O fungo pode migrar para outras partes do corpo, apresentando tropismo pelo sistema nervoso central (SNC), onde causa meningite, meningoencefalite e encefalite. A doença pulmonar progressiva e a disseminação ocorrem mais freqüentemente no cenário de imunodeficiência (VILCHEZ *et al.*, 2002; CASALI *et al.*, 2003).

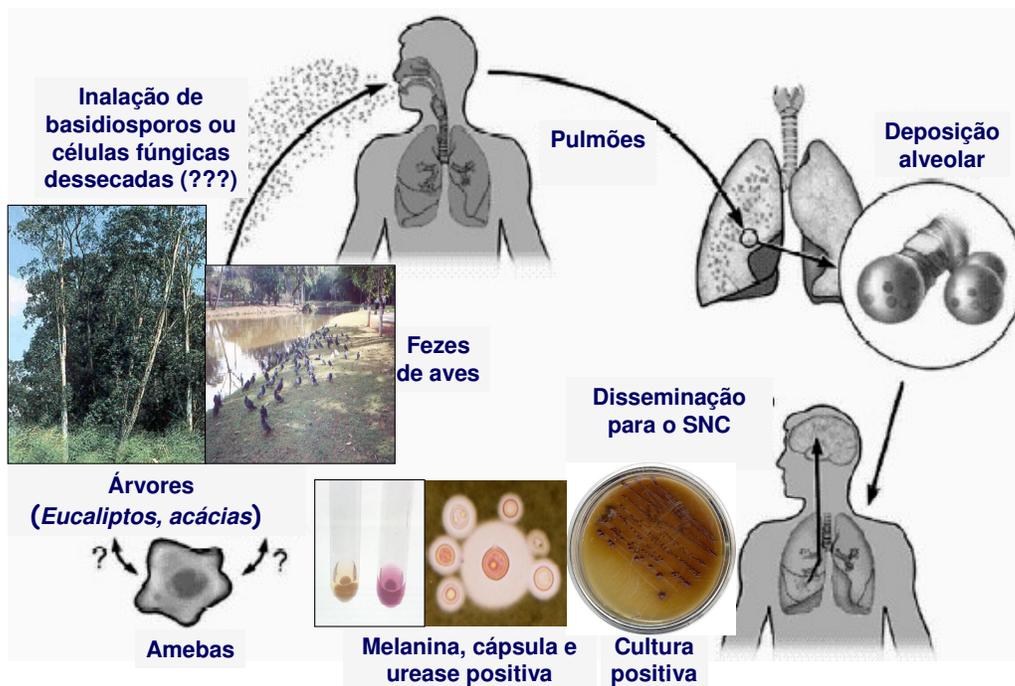
A preferência pelo SNC se deve à alta concentração, no líquido, de nutrientes assimiláveis pelo fungo (tiamina, ácido glutâmico, glutamina, carboidratos e minerais), à falta de atividade do complemento e a fraca ou ausente resposta inflamatória no tecido cerebral (SEVERO *et al.*, 1998). O cérebro é abundante em catecolaminas, que podem ser usadas pelo fungo para síntese de melanina, mas o fato de que este não pode usá-las como fonte exclusiva de carbono, sugere que o cérebro sirva como local de sobrevivência mais do que propriamente nutricional (RODRIGUES *et al.*, 1999).

Acredita-se que *C. neoformans* é um patógeno intracelular facultativo. TUCKER & CASADEVALL (2002) obtiveram resultados sugestivos de que o fungo sobrevive no meio intracelular (macrófagos) não sendo destruído durante a fagocitose. A ingestão é seguida por dano à membrana fagossomal resultando em continuidade com o citoplasma, acúmulo de vesículas contendo polissacarídeo e, possivelmente, produção de polissacarídeo estruturalmente diferente. Além disso, tem sido proposto que a interação do fungo com amebas e nematódeos presentes no ambiente como competidores permitiu ao patógeno desenvolver estratégias para sobreviver ao sistema imune de mamíferos (HULL & HEITMAN, 2002).

Algumas características importantes diferem as infecções causadas por *C. neoformans* daquelas causadas por *C. gattii*. Hidrocefalia e lesões cerebrais focais são mais comuns em infecções causadas por *C. gattii* (SEVERO *et al.*, 1999; SORRELL, 2001). Na infecção causada por *C. gattii* também é observada uma maior incidência de criptococomas no pulmão e cérebro, e uma resposta mais lenta aos antifúngicos, além de ocorrer mais seqüelas neurológicas e das intervenções neurocirúrgicas serem mais freqüentes (SORRELL, 2001). Um estudo realizado por TRILLES *et al.* (2004) comparou a susceptibilidade das

espécies a 9 agentes antifúngicos constatando que, para 7 dos 9 antifúngicos testados, *C. gattii* foi menos susceptível do que *C. neoformans*.

Um tipo de manifestação menos comum, que atinge cerca de 10 a 15% dos pacientes, é a criptococose cutânea. Este tipo de infecção é prevalente no norte da Europa e tem sido relacionada ao sorotipo D (MARTINEZ *et al.*, 2001). Recentemente foi realizado o primeiro isolamento de *C. neoformans* sorotipo D de eucaliptos no Brasil, no entanto serão necessários outros estudos para estabelecer a significância epidemiológica desses achados (RIBEIRO *et al.*, dados não publicados).



Hull & Heitman, 2002

Figura 2. Esquema da rota de infecção por *C. neoformans* e *C. gattii* mais aceita atualmente – A levedura permanece no ambiente associada a fezes de pombos (*C. neoformans*) e/ou determinadas árvores (*C. gattii*) e possivelmente interage com amebas e nematóides no solo. Acredita-se que a infecção ocorra quando basidiósporos ou partículas fúngicas dessecadas são inaladas nos pulmões, ficando o patógeno latente ou ocorrendo multiplicação e estabelecimento de infecção e disseminação ao Sistema Nervoso Central. Com a disseminação, células viáveis se multiplicam no líquido e são diagnosticados pela produção de melanina ou de cápsula (adaptado de HULL & HEITMAN, 2002).

2.3. Diagnóstico

Atualmente, o diagnóstico laboratorial da criptococose é baseado em três fundamentos: a demonstração da levedura no material clínico; o isolamento em cultura seguido de provas bioquímicas para a identificação final e a pesquisa de antígenos circulantes.

A pesquisa direta do fungo pode ser realizada em espécimes como: líquor, escarro, lavado brônquico, pus de lesões cutâneas mucosas, urina, macerados de tecidos obtidos por biópsia, secreção prostática, sangue e punção de medula óssea. Várias podem ser as técnicas empregadas para a pesquisa de estruturas fúngicas características de *C. neoformans* e *C. gattii*. Preparações com tinta da China (a nigrosina também pode ser utilizada como método alternativo) são utilizadas com materiais líquidos como líquor e escarro. Nestas preparações, a levedura apresenta-se como uma célula globosa ou em forma ovalada com uma cápsula polissacarídica. A pesquisa de *C. neoformans* em tecidos é feita com corantes específicos como mucicarmim e prata (LACAZ *et al.*, 2002; MENEZES *et al.*, 2002; NAMIQ *et al.*, 2005).

A pesquisa direta de *C. neoformans* através de preparações com tinta da China fornece um diagnóstico diferencial rápido e barato, sendo útil ao clínico especialmente na suspeita de meningite criptocócica. A sensibilidade analítica deste método é de 1000 a 10000 células por mL. Em função da elevada carga de leveduras verificada em amostras de pacientes de AIDS, a sensibilidade deste teste alcança 80% dos casos positivos de meningite criptocócica. Já em indivíduos hígidos, este percentual cai para 30-50% (CASADEVALL & PERFECT, 1998). A base para a visualização das leveduras por este método é que a cápsula

afasta as partículas da tinta, formando um halo claro em torno da mesma, isso torna mais difícil a visualização de linhagens acapsuladas. As leveduras isoladas de amostras clínicas geralmente apresentam brotamentos únicos ou duplos, sendo raros casos de múltiplos brotamentos. Raramente se apresentam sob forma filamentosa nas lesões.

O cultivo de *C. neoformans* em laboratório é simples, pois o fungo se desenvolve facilmente em meio Sabouraud formando colônias lisas ou mucóides de cor creme (FRIES *et al.*, 1999; FRIES *et al.*, 2001; LACAZ *et al.*, 2002;). Membros do gênero *Cryptococcus* geralmente são considerados como leveduras não fermentadoras, que assimilam inositol e produzem urease.

A produção de urease é uma prova bioquímica utilizada para identificação do gênero, pois as espécies de *Cryptococcus* são capazes de realizar hidrólise da uréia. Uma diferença entre as espécies é a inibição de urease pela presença de EDTA em *C. gattii*, mas não em *C. neoformans* (CASADEVALL & PERFECT, 1998; COX *et al.*, 2000; CASALI *et al.*, 2003).

As espécies *C. neoformans* e *C. gattii* são as únicas do gênero que podem produzir melanina, apresentando coloração marrom em meios de cultura com extratos de batata, cenoura ou extratos de sementes como *Vicia faba* ou *Guizottia abyssinica*. Isto se deve a presença, nestes meios, de tirosina e ácido clorogênico que são oxidados pela fenoloxidase produzida pela levedura (DENNING *et al.*, 1990; JACOBSON, 2000). Meios de cultura que induzem a produção de melanina são amplamente utilizados em laboratório para identificação da levedura e diferenciação entre *C. neoformans* e *C. gattii* de *cândida spp.* Os passos iniciais das rotas de biossíntese da hidroxifenilalanina-melanina são catalisados pela lacase, e estudos do gene da lacase (*CNLAC1*) vêm sendo realizados para

compreender por que algumas linhagens são deficientes em produzir melanina. Esta deficiência parece estar relacionada a uma baixa taxa de transcrição do gene *CNLAC1* (TANAKA *et al.*, 2005).

Apenas *C. gattii* é resistente a canavanina e utiliza glicina como fonte de carbono. O ágar canavanina-glicina-azul de bromotimol (ágar CGB) foi proposto em 1982 e vem sendo amplamente utilizado nos laboratórios para separação das espécies *C. gattii* e *C. neoformans* (KWON-CHUNG *et al.*, 1982; CANELO *et al.*, 1999; HORTA *et al.*, 2002; ABEGG *et al.*, 2006). Em 1998, foram descritas duas linhagens de *C. neoformans* sorotipo A isolados de fezes de pombos que se desenvolveram em meio de ágar CGB, com habilidade de resistir a altas concentrações de canavanina (NAKAMURA *et al.*, 1998). Da mesma forma, em 2003, foi relatado um caso de criptococose disseminada em paciente com AIDS devido a uma linhagem de *C. neoformans* var. *grubii* sorotipo A resistente a canavanina (KHAN *et al.*, 2003). Estes resultados sugerem que somente uma reação positiva em ágar CGB não é suficiente para fazer a distinção entre as espécies com segurança.

Culturas quantitativas de líquido não são empregadas rotineiramente na clínica médica, mas quando realizadas, a concentração média atinge 10^3 a 10^7 UFC/mL de líquido. O sangue contém menos que 10 UFC/mL e é possível que os freqüentes resultados negativos de cultura de urina se devam a concentrações inferiores a 10^3 UFC/mL (MITCHELL & PERFECT, 1995).

A cultura é tradicionalmente o padrão ouro dos métodos de diagnóstico laboratorial para *C. neoformans* e *C. gattii*, embora apresente como limitações o tempo necessário para o desenvolvimento e identificação dos microrganismos. As linhagens de *C. gattii* necessitam de um período de 5 a 7 dias para desenvolver-

se, sendo que uma cultura só deve ser descartada como negativa após 30 dias de incubação. A sensibilidade verificada na cultura é de 75% (MITCHELL & PERFECT, 1995). Em certas situações como, por exemplo, na meningite criptocócica crônica, o líquido pode resultar em cultura negativa devido à pequena carga de microrganismos viáveis que não atinge o saco lombar. A baixa na concentração de microrganismos viáveis é devida, nestes casos, a tratamento prévio e torna-se um problema no monitoramento dos pacientes crônicos. As preparações com tinta da China, por sua vez, permanecem positivas por meses após o tratamento e recuperação de pacientes crônicos. A permanência de células não viáveis levanta a hipótese de algum foco viável no sistema nervoso central que poderia estar viabilizando esta progenia. Assim, a possibilidade de relapso deve ser considerada, havendo pesquisa direta positiva, apesar da negatificação da cultura (CASADEVALL & PERFECT, 1998).

Durante a infecção, os polissacarídios capsulares de *C. neoformans* e *C. gattii* se solubilizam nos fluidos corporais e podem ser detectados e quantificados com anticorpos de coelho específicos anti-*Cryptococcus*. O método mais empregado para triagem e titulação é o teste de aglutinação em látex. Os reagentes para este teste são comercialmente disponíveis na forma de kits (Immy, Pastorex). As partículas de látex são revestidas com imunoglobulina de coelho específica. Os materiais biológicos utilizados para o teste são líquido, soro ou urina. Uma aglutinação positiva no título de 1:4 sugere fortemente uma infecção por *C. neoformans* ou *C. gattii*. Título maior ou igual a 1:8 indica doença em atividade sendo que a maioria dos pacientes de AIDS apresenta títulos mais altos. A detecção de antígeno polissacarídico pelos testes de aglutinação em látex chega à sensibilidade de 95% (MITCHELL & PERFECT, 1995; CASADEVALL &

PERFECT, 1998). No entanto, este teste pode produzir resultados espúrios em líquido ou soro. A maior parte dos resultados falso-positivos é originada pela presença de fator reumatóide. Reações cruzadas com a cápsula polissacarídica de *Trichosporon beigeli*, *Histoplasma capsulatum* e de outros microrganismos, embora mais rara, também ocorre. A contaminação dos espécimes com ágar ou agarose também pode ocasionar falsos positivos. Resultados falso-negativos, embora raros, são bem documentados: podem ser causados por baixos níveis de antígeno, pela presença de imuno-complexos, por altos títulos de antígeno (efeito pró-zona) ou por infecção por linhagens pouco capsuladas ou acapsuladas, especialmente em pacientes com AIDS (MITCHELL & PERFECT, 1995; SUGIURA *et al.*, 2005). Nos estágios mais avançados da AIDS, quando a imunidade humoral está muito deficiente, as leveduras deixam de produzir cápsulas como defesa contra a fagocitose, o que também pode vir a resultar em testes negativos.

O uso do teste de aglutinação em látex para acompanhamento da evolução de um tratamento requer o uso de um kit originário de um único fabricante uma vez que há diferenças na sensibilidade dos reagentes empregados. Ainda assim, alterações não previstas nos títulos antigênicos não deverão ser o único determinante na conduta clínica. Por outro lado, o uso dos testes de aglutinação em látex como triagem, embora controverso, tem se justificado pelo número de casos com evolução para criptococose após teste de aglutinação positivo, sem qualquer achado em lâmina ou cultura (CASADEVALL & PERFECT, 1998).

SUGIURA *et al.* (2005) relataram a dificuldade em diagnosticar um caso de meningite devido a uma linhagem de *Cryptococcus* deficiente na produção de cápsula. A punção lombar de líquido mostrou repetidos resultados negativos para

preparações com tinta da China, cultura e látex. O diagnóstico, neste caso, somente foi possível com a retirada de fluido ventricular, a partir de cateter inserido na região frontal.

Muitos métodos de identificação baseados em técnicas moleculares têm sido desenvolvidos para o diagnóstico e monitoramento de infecções fúngicas, bem como para tipificação dos isolados em estudos epidemiológicos. A reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido a principal ferramenta utilizada no desenvolvimento de protocolos de detecção de DNA de *C. neoformans*, *C. gattii* e de outras leveduras. As variantes do método são a *nested* PCR, a PCR multiplex e a PCR em tempo real. Um protocolo de *nested* PCR foi desenvolvido para detecção de *C. neoformans* em líquido, utilizando dois pares de *primers* baseados na região ITS do DNA ribossomal da levedura, o método apresentou resultado positivo para 21 amostras clínicas de pacientes com criptococose cujo líquido foi imediatamente incubado a -80°C após a punção, e negativo para 19 amostras de pacientes com meningite bacteriana ou viral (RAPPELLI *et al.*, 1998). Protocolos de *nested* PCR e PCR em tempo real foram desenvolvidos tendo como alvo o gene 18S do rRNA de *C. neoformans*, com o objetivo de detectar DNA deste patógeno em amostras de tecido (BIALEK *et al.*, 2002). PCR multiplex baseada na amplificação das regiões 1 e 2 do espaço transcrito interno (ITS) do gene rRNA foi utilizada para o diagnóstico de 7 espécies de *Candida spp* e *C. neoformans* isolados em hemoculturas (LI *et al.*, 2003).

As técnicas moleculares de tipificação incluem a PCR *fingerprinting* onde um locus de polimorfismo no DNA é amplificado gerando diferentes fragmentos que geram diferentes padrões de bandas de DNA e podem ser relacionados com uma espécie, variedade ou linhagem. A técnica de RAPD (*random amplified*

polymorphic DNA) é um *fingerprinting* que utiliza *primers* com seqüências arbitrárias que geram diferentes padrões de amplificação os quais permitem, no caso de *C. neoformans*, discriminar variedades e sorotipos e também são usados em estudos epidemiológicos (CHEN *et al.*, 1996; AOKI *et al.*, 1999). A técnica de RAPD também foi utilizada para comparar isolados de diferentes sítios corporais de um mesmo paciente, bem como comparar se o agente de infecção recidiva era o mesmo da infecção primária ou não (PINI *et al.*, 1998). Recentemente, foi proposta uma PCR multiplex para determinação do *mating type* de *C. neoformans* (sorotipos A, D e AD) como ferramenta para estudos epidemiológicos (ESPOSTO *et al.*, 2004).

Em 1998, AOKI *et al.* descreveram, pela técnica de RAPD, *primers* específicos para os sorotipos A e B (*C. neoformans* var. *grubii* e *C. gattii*). A relação entre a especificidade verificada nos *primers* e as diferenças antigênicas da cápsula polissacarídica que determinam a classificação em sorotipos não está clara. No entanto, como a subdivisão de *C. neoformans* em variedades está baseada em diferenças biológicas, estudos mais detalhados são necessários para elucidar a relação entre *primers* específicos e diferenças antigênicas. As seqüências originadas com os *primers* denominados A (CNa70S/CNa70A) (sorotipo A) e B (CNb49S/CNb49A) (sorotipo B) parecem estar relacionadas com aminotransferases bacterianas e fúngicas e com DNA polimerases de mamíferos e fungos (AOKI *et al.*, 1999).

Um estudo realizado em 124 isolados clínicos e ambientais do estado do Rio Grande do Sul baseando-se nesses mesmos *primers* A e B construídos por AOKI *et al.* (1999) observou, contrariamente, que os *primers* A são específicos

para *C. neoformans* variedades *grubbi* e *neoformans* (sorotipos A, D e o híbrido AD), e os *primers* B para *C. gattii* (sorotipos B e C) (CASALI *et al.*, 2003).

2.4. Fatores de virulência

Fatores de virulência são características que permitem ao microrganismo transpor as defesas do hospedeiro (CASADEVALL & PERFECT, 1998), e que só são expressas em hospedeiros susceptíveis (STEENBERGEN & CASADEVALL, 2003).

Como a virulência é um complexo fenotípico que quase sempre é mantido como resultado de seleção, a origem e manutenção da virulência em micróbios habitantes do solo tais como *C. neoformans* e *C. gattii* é enigmática (STEENBERGEN & CASADEVALL, 2003). Estas leveduras têm sido freqüentemente utilizadas em estudos de fatores de virulência em fungos por serem tanto patógenos primários quanto secundários, produzirem infecções em humanos e animais e já terem importantes características fenotípicas associadas a virulência estudadas (CASADEVALL & PERFECT, 1998).

A produção de cápsula polissacarídica foi o primeiro fator de virulência conhecido em *C. neoformans* e *C. gattii*, e vários mutantes que não produziam cápsula foram avirulentos em camundongos (BULMER *et al.*, 1967a; BULMER *et al.*, 1967b; KOZEL, 1995). Pelo menos quatro genes relacionados a produção da cápsula já foram caracterizados, CAP64 (CHANG *et al.*, 1996), CAP60 (CHANG & KWON-CHUNG, 1998), CAP59 (CHANG *et al.*, 1995) e CAP10 (CHANG & KWON-CHUNG, 1999), sendo todos eles necessários para virulência em camundongos. Não há relação entre tamanho da cápsula e virulência, e amostras com cápsulas muito pequenas têm sido isoladas de pacientes. Estando o paciente

com o sistema imunológico suficientemente debilitado, mesmo amostras acapsuladas podem causar doença, entretanto linhagens capsuladas disseminam mais facilmente para o cérebro e induzem resposta celular mais significativa nos pulmões (STEENBERGEN & CASADEVALL, 2003; CASADEVALL & PERFECT, 1998).

A virulência conferida a levedura pela cápsula pode se dever as suas propriedades biológicas, sendo a mais importante delas a inibição da fagocitose. Células acapsuladas da levedura, se cultivadas juntamente com glicuronoxilomanana (GXM), o principal componente da cápsula, também são resistentes a fagocitose, o que indica que esta resistência é diretamente mediada pela GXM (KOZEL, 1995). Na natureza, a cápsula parece proteger a levedura da desidratação (IDNURM *et al.*, 2005).

Melaninas são macromoléculas sintetizadas por polimerização oxidativa de compostos fenólicos, são hidrofóbicas e negativamente carregadas que resultam em pigmentos marrons ou pretos, principalmente (LANGFELDER *et al.*, 2003). Lacases são enzimas que efetivam a oxidação de dihidroxifenóis em quinonas e catalizam sua polimerização em melanina (JACOBSON, 2000). A produção de melanina pela lacase é outro importante fator de virulência em *C. neoformans* e *C. gattii*. A síntese de melanina tem sido associada à virulência e mutantes albinos são menos virulentos que os selvagens (WILLIAMSON, 1997). A produção de melanina pode usar como substrato neurotransmissores como dopamina e epinefrina, sendo esta uma possível explicação para o tropismo da levedura pelo sistema nervoso central (KOZEL, 1995; STEENBERGEN & CASADEVALL, 2003). Além disso, LIU *et al.* (1999) demonstraram que a lacase protege contra a morte mediada por macrófagos em *Cryptococcus*, utilizando linhagens congênicas

lacase-positiva e lacase-negativa para infecção em camundongos. A melanina pode proteger o fungo dos radicais livres tóxicos que são produzidos pelo sistema de defesa do hospedeiro, enquanto, na natureza, protege contra a radiação ultravioleta (IDNURM *et al.*, 2005).

Fosfolipases foram sugeridas como fatores de virulência em *Cryptococcus* pela primeira vez em 1997, através de inoculação em camundongos de linhagens de *Cryptococcus* com diferentes níveis de atividade de fosfolipases e posterior contagem das células da levedura nos pulmões e cérebro dos camundongos (CHEN *et al.*, 1997a). As fosfolipases são necessárias para o início da infecção pulmonar por *C. neoformans* e *C. gattii* e para a disseminação da levedura pelas vias linfática ou sanguínea. Provavelmente estas enzimas atuam pela destruição de componentes da membrana celular (CHEN *et al.*, 1997a; CHEN *et al.*, 1997b). CHEN *et al.*, 1997b definiram a natureza da atividade de fosfolipases de um isolado clínico de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* como fosfolipase B, lisofosfolipase e lisofosfolipase transacilase. COX *et al.* (2001) clonaram o gene codificante da fosfolipase (*PLB1*) e realizaram disrupção deste gene para construir mutantes *plb1*. Eles observaram que tanto o tipo selvagem quanto o mutante reconstituído foram mais virulentos em camundongos e coelhos do que os mutantes *plb1*. Recentemente um estudo demonstrou que a atividade de fosfolipase aumenta a aderência das células da levedura ao tecido epitelial pulmonar (GANENDREN *et al.*, 2006).

A urease é um importante fator de virulência em bactérias que catalisa a reação de conversão da uréia em amônia e carbamato. A importância da urease como fator de virulência em *C. neoformans* e *C. gattii* foi investigada por COX *et al.* (2000). Neste trabalho os autores construíram mutantes deficientes na

produção de urease e verificaram maior tempo de sobrevivência em camundongos infectados por estes mutantes em relação aos infectados com o tipo selvagem.

Outras características como *mating type*, produção de manitol e proteinases também tem sido associadas à virulência deste patógeno (STEENBERGEN & CASADEVALL, 2003; KOZEL, 1995).

2.5. Epidemiologia

A criptococose é a quarta causa mais freqüente de infecção oportunista em pacientes com AIDS. Dentre as infecções fúngicas, a criptococose é a principal responsável pela morbidade e mortalidade destes pacientes. Na maioria dos países a prevalência em pacientes de AIDS tem se mantido na faixa de 5 a 10% (CASADEVALL & PERFECT, 1998), enquanto este índice chega a 15-30% em alguns países africanos (MITCHELL & PERFECT, 1995).

No Brasil, dados do Ministério da Saúde no período de 1980-1999 mostram que 4,5% das infecções oportunistas associadas a pacientes portadores de HIV foram causadas por *C. neoformans* e/ou *C. gattii* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1999). No Rio Grande do Sul, 430 casos foram notificados entre 1999-2004, segundo a Secretaria Estadual de Saúde (comunicação pessoal). No entanto, como a criptococose não é uma doença de notificação compulsória, é provável que o número de casos seja ainda maior.

Em Vancouver, onde recentemente houve um surto de criptococose causado por *C. gattii*, a incidência de infecções por esta espécie, entre 1999 e 2003, esteve entre 8,5 e 37 casos por milhão de residentes por ano (KIDD *et al.*, 2004). Na Austrália, esta taxa foi citada como sendo 8,5 casos por milhão de habitantes por ano por SORRELL (2001), sendo maior do que a taxa total

(incluindo as duas espécies) no mesmo país entre 1994 e 1997, que foi de 6,6 casos por milhão de habitantes por ano (CHEN *et al.*, 2000). Neste mesmo trabalho, entre 1994 e 1997 também foi citada a taxa na Nova Zelândia, de 2,2 casos por milhão de habitantes por ano.

Um estudo epidemiológico realizado no norte da Califórnia (EUA) mostrou que, entre 1981 e 2000, a incidência de criptococose por milhão de pessoas por ano foi de 19,0 homens e 2,6 mulheres (FRIEDMAN *et al.*, 2005).

A maioria das infecções em imunocomprometidos em nível mundial é causada por *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A). Um estudo realizado em isolados de diversas partes do mundo permitiu agrupá-los, com base em técnicas de tipificação molecular, em quatro grandes grupos: VNI e VNII (sorotipo A), VNIII (sorotipo AD) e VNIV (sorotipo D). A maioria dos isolados (78%) pertencia ao grupo VNI, comparado com 18% para VNII, 1% para VNIII e 3% para VNIV (MEYER *et al.*, 1999).

Trezentos e quarenta isolados clínicos, veterinários e ambientais de países iberoamericanos foram tipificados em estudo que identificou a maioria dos isolados (68,2%) como VNI (variedade *grubii* sorotipo a); seguido de 5,6% VNII (variedade *grubii*, sorotipo A); 4,1% VNIII (híbrido AD); 1,8% VNIV (variedade *neoformans*, sorotipo D); 3,5% VGI; 6,2% VGII; 9,1% VGIII e 1,5% VGIV (MEYER *et al.*, 2003).

Um estudo envolvendo 467 isolados clínicos e ambientais de *C. neoformans* permitiu traçar o perfil epidemiológico deste agente no Brasil demonstrando as seguintes prevalências: sorotipo A (77,95%), sorotipo B (18,2%), sorotipo AD (1,3%), sorotipo D (0,4%), sorotipo C (0,2%) e não tipificáveis (1,93%). O sorotipo A prevalece nas regiões sul, sudeste e centro-

oeste enquanto o sorotipo B predomina nas regiões norte e nordeste (NISHIKAWA *et al.*, 2002).

No Rio Grande do Sul, um estudo verificou que dentre 93 isolados obtidos de pacientes HIV-positivo, 91 eram *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A), concordando com os dados nacionais e internacionais. Neste estudo todos os isolados de *C. gattii* (11 isolados, entre pacientes com e sem infecção pelo HIV) foram identificados como sorotipo B. Entre os isolados ambientais, os nove isolados provenientes de eucaliptos foram identificados como *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D) e nenhum isolado do sorotipo B foi obtido de fonte ambiental. (CASALI *et al.*, 2003). Outro estudo do mesmo grupo obteve 38 isolados de excretas de aves, destes, 33 foram identificados como *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A) e 5 como *C. gattii* (sorotipo B) sugerindo excretas de aves como fonte ambiental de infecção pelo sorotipo B neste estado (ABEGG *et al.*, 2006).

A prevalência da infecção por *C. neoformans* é diretamente relacionada com a condição imune do hospedeiro e com o grau de exposição à levedura. A maioria absoluta dos casos de criptococose sintomática ocorre em pacientes imunodebilitados, sendo a AIDS a causa mais freqüente de imunocomprometimento (IDNURM *et al.*, 2005).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Desenvolver e padronizar uma metodologia de PCR multiplex para a distinção entre as espécies *C. neoformans* e *C. gattii* e determinar o perfil de pacientes com meningite criptocócica.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar a frequência das espécies *C. neoformans* e *C. gattii* nos isolados obtidos no LACEN no período de 2000 a 2005.
- Analisar comparativamente os resultados obtidos pelo método de PCR em relação ao exame micológico convencional (preparação com tinta da Índia, cultivo, identificação bioquímica e pesquisa de antígenos circulantes);
- Analisar comparativamente os resultados obtidos pelo método de PCR e pela sorotipagem com o kit Crypto Check;
- Determinar o perfil epidemiológico dos casos clínicos atendidos no LACEN/FEPPS provenientes de hospitais da rede pública de saúde do estado do Rio Grande do Sul.

4. METODOLOGIA

4.1. Amostragem

Esta amostragem consta de materiais da Rede Pública de Saúde encaminhados com suspeita de criptococose ao Laboratório Central do Estado/Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (LACEN/FEPPS) no período de 2001 até 2005. Foram selecionadas 132 isolados de 126 pacientes que chegaram ao setor de micologia acompanhando fichas epidemiológicas, sendo 131 amostras de líquido e 1 amostra de biópsia hepática. Todas estas amostras tiveram exame direto e cultural positivos para *C. neoformans* ou *C. gattii*; 119 delas tiveram detecção de antígenos pela prova de látex a partir de líquido e, ainda, 18 tiveram também detecção de antígenos a partir do soro.

As leveduras foram mantidas viáveis na micoteca deste setor de três formas:

1. um cultivo em tubo de ensaio com Ágar Sabouraud em geladeira a 4°C;
2. um cultivo em frasco tipo penicilina com Ágar Sabouraud coberto com glicerina a temperatura ambiente;
3. um frasco tipo penicilina com água destilada estéril a temperatura ambiente.

Os tubos mantidos em geladeira foram fechados com bucha de algodão, papel de seda colado com gelatina anti-ácidos e parafilme, o que diminuía os riscos de contaminação. Os frascos mantidos a temperatura ambiente foram fechados com tampa de borracha e lacrados com selos de metal.

Os 132 isolados foram usados durante a padronização do método proposto para comparar a positividade e especificidade do mesmo em relação aos métodos tradicionais.

4.2. Identificação por coloração negativa

A presença das leveduras nas amostras de líquido foi observada ao microscópio óptico (objetiva de 40X, ocular 10X) por montagem convencional em lâmina com nigrosina. Nestas preparações, o corante é excluído pela cápsula, a qual fica evidenciada como área clara ao redor da célula leveduriforme evidenciando a cápsula polissacarídica.

4.3. Produção de melanina

O meio ágar-ácido cafeico (Sigma, Chemical Co., St Louis, U.S.A) foi utilizado para a identificação das espécies *C. neoformans* e *C. gattii*, pois estas são as únicas espécies do gênero que podem produzir melanina, apresentando coloração marrom em meios de cultura com extratos de batata, cenoura ou extratos de sementes como *Vicia faba* ou *Guizottia abyssinica*. Isto se deve a presença, nestes meios, de tirosina e ácido clorogênico que são oxidados pela fenoxidase produzida pela levedura. As amostras clínicas foram semeadas em ágar Sabouraud e incubadas por 30 dias ou até o desenvolvimento de colônias de leveduras de cor creme, sugestivas de *Cryptococcus*. Estas colônias foram, então, semeadas em meio ágar ácido cafeico e incubadas a 30°C. Após sete dias foi verificado o aparecimento de pigmentação (colônias se tornaram marrons) indicando que se tratava de *C. neoformans* ou *C. gattii*.

4.4. Produção de urease

A habilidade do fungo de utilizar uréia por ação da enzima urease foi verificada pela alcalinidade e resultante viragem do indicador de pH. Para tal foi utilizado o seguinte meio de cultura ágar uréia (peptona 1 g; glicose 1 g; NaCl 5 g; KH_2PO_4 2 g; uréia 20 g; vermelho de fenol 0,012 g; ágar 18 g; água destilada q.s.p 1000 mL; pH 6,8). Uma alça cheia (colônia pura) foi inoculada em toda a superfície do ágar inclinado, com subsequente incubação a 30°C e observação durante 7 dias. O resultado positivo foi evidenciado através da viragem do indicador da cor amarela inicial do meio para cor rosa ou vermelho-violeta final, sendo a intensidade da coloração final indicativa do grau de hidrólise da uréia e atividade de urease (COX *et al.*, 2000).

4.5. Cultivo em ágar CGB (ágar canavanina-glicina-azul de bromotimol)

O meio CGB é usado para diferenciar *C. neoformans* vars. *neoformans* e *grubii* de *C. neoformans* var. *gattii*. O meio consiste de 880 mL de água destilada, 20 mL de solução B - azul de bromotimol sódico 0,4%, mantida a 4°C ao abrigo da luz e 20 g de ágar bacteriológico, misturada após autoclavar a 100 mL de solução A - glicina-L-canavanina: 10 g de glicina; KH_2PO_4 1 g; MgSO_4 1g; tiamina-HCl 1 mg; sulfato de L-canavanina 30 mg (KWON-CHUNG *et al.*, 1982).

Utilizamos o meio CGB como verificação preliminar da variedade dos isolados. Pequeno inóculo fúngico foi semeado em tubos com meio CGB e estes foram incubados a 30°C por até 7 dias.

O teste CGB é baseado em dois parâmetros metabólicos observados em isolados da variedade *gattii*: assimilação de glicina como única fonte de carbono e resistência a canavanina. O teste positivo é observado quando a cor amarela-

esverdeada do meio torna-se azul-cobalto como resultado da alcalinização do meio através da amônia liberada durante a degradação da glicina (KWON-CHUNG *et al.*, 1982).

4.6. Teste de aglutinação em látex

Partículas de látex sensibilizadas com anticorpos contra antígenos da cápsula polissacarídica do *C. neoformans*, quando entram em contato com amostras que contêm estes antígenos realizam uma reação de aglutinação nos testes comerciais utilizados. Os mesmos detectam aproximadamente 3,2 ng/mL de antígenos capsulares em líquido ou soro.

Durante o período de identificação das amostras (2000 até 2006) foram utilizados dois diferentes kits de aglutinação em látex, conforme disponibilização pelo LACEN/RS, que realizou as compras através de licitação.

Os kits utilizados foram Immy (*Latex-Crypto Antigen Detection System* - Immuno Mycologics Inc. Norman, OK, USA) e Pastorex (Pastorex Cryptococcus; Sanofi-Diagnostics Pasteur, Marnes-la-Coquette, France) e os testes foram realizados a partir de líquido e/ou soro conforme instruções dos fabricantes.

4.7. Sorotipagem

A sorotipagem dos isolados foi realizada com o Kit Crypto Check (Iatron, Tóquio, Japão) (KABASAWA *et al.*, 1991), com o objetivo de servir como parâmetro para comparação entre os resultados da determinação da espécie pelo CGB (método convencionalmente utilizado) e pela PCR (método proposto neste trabalho). Foram misturados 10µL de suspensão da levedura em solução salina com 10µL de cada um dos cinco soros (1, 5, 6, 7 e 8) na placa de aglutinação e agitados manualmente por 10 minutos. Aglutinação com o soro 1 indicava que o

isolado era *C. neoformans* ou *C. gattii*. Os soros 5, 6, 7 e 8 correspondiam ao sorotipos B, C, A e D, respectivamente.

4.8. Extração de DNA

Inicialmente, foi utilizado um método mecânico de rompimento das células com pérolas de vidro (POETA *et al.*, 1999) e, posteriormente, adaptou-se um método de extração com lise por maceração com adição de nitrogênio líquido (ZHANG *et al.*, 1996) que consiste em:

- A. Inocular colônias de *C. neoformans* ou *C. gattii* em placa com ágar Sabouraud e incubadar por 2 a 3 dias a 30°C;
- B. Recolher e macerar as colônias após adição de nitrogênio líquido;
- C. Ressuspender em 0,2 mL de tampão (TRIS-HCl pH 7,5 0,2M; NaCl 0,5M; EDTA 0,01M; SDS 1%) em um microtubo de 2mL;
- D. Adicionar 0,2 mL de fenol-clorofórmio e agitar em vórtex por 1 minuto;
- E. Acionar 0,3 mL de tampão e 0,3 mL de fenol-clorofórmio e agitar em vortex por 4 minutos;
- F. Centrifugar por 5 minutos a 13.000 rpm e transferir o sobrenadante para um novo microtubo;
- G. Re-extrair DNA com 0,3 mL de fenol-clorofórmio e centrifugar por mais 5 minutos. Transferir o sobrenadante para um novo microtubo;
- H. Adicionar dois volumes de etanol absoluto. Precipitar DNA por incubação a -20°C por uma hora. Centrifugar por 15 minutos a 13.000 rpm;
- I. Lavar o sedimento com etanol 70% gelado, secar a temperatura ambiente e ressuspender em 100 a 200 µL de TE (TRIS pH 8,2 10 mM / EDTA pH 8 1mM);

J. Tratar com RNase A na concentração de 50 µg/mL por 30 minutos à 37°C.

A qualidade do DNA extraído foi verificada visualmente após migração por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com 0,5µg/mL de brometo de etídio e visualizado sob luz UV. Após a extração os DNAs foram mantidos a -20°C.

4.9. Reação de Amplificação

A reação de amplificação foi modificada a partir de AOKI *et al.* (1999). Foi utilizado um volume final de 25 µL contendo 10-20ng de DNA/ 10mM Tris HCl pH 8,3/ 50mM KCl/ 2,3 mM MgCl₂/ 200µM de cada desoxirribonucleotídeo, 25 pmol de cada primer e 1 U taq DNA polimerase (Cenbiot Enzimas). As condições de reação foram: desnaturação a 94°C /8 min, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C /1 min, anelamento a 65°C /1 min, extensão a 72°C /2 min, e extensão final a 72°C /8 min em um termociclador PTC-200 (Peltier Thermal Cycler - MJ Research). Os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose 1,5% corado com 0,5µg/mL de brometo de etídio e visualizados sob luz UV.

Os *primers* utilizados foram constituídos com base nos padrões de amplificação de *C. neoformans* e *C. gattii* por RAPD (Aoki *et al.*, 1999). São eles: CNA 70S (5'- attgcgtccaccaaggagctc-3') e CNA 70A (5', attgcgtccatgttacgtggc-3'), específicos para *C. neoformans*; e CNB 49S (5'attgcgtccaaggtgtgttg-3') e CNB 49A (5'attgcgtccatccaaccgttatc-3'), específicos para *C. gattii*.

Os controles positivos da reação foram DNAs extraídos das seguintes linhagens: WM 148 VNI, HC5 e ATCC 32045 para sorotipo A; AL33 sorotipo B; WM 779 VGIV sorotipo C; ATCC 28957 sorotipo D e ATCC 48184 sorotipo AD. As linhagens HC5 e AL33 faziam parte de trabalhos anteriores do grupo, tendo sido

previamente identificadas. A linhagem HC5 foi isolada de líquido proveniente do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e AL33 foi isolada de líquido proveniente da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre.

4.10. Teste de Sensibilidade

Para se avaliar a sensibilidade do método testado, foram feitas diluições seriadas (1:2) do DNA extraído de uma amostra controle, HC5 sorotipo A, sendo estas diluições submetidas à reação de PCR. As diluições foram feitas em tampão TE.

4.11. Teste de Especificidade

A especificidade dos primers foi testada submetendo à reação de PCR o DNA de possíveis agentes causadores de meningite em pacientes imunocomprometidos, como *Mycobacterium tuberculosis*, *Candida albicans*, *Neisseria meningitidis*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. O teste foi realizado também com DNA humano. Estas amostras de DNA foram gentilmente cedidas pelo LACEN/RS.

As seqüências amplificadas pela PCR multiplex também foram comparadas com os microrganismos citados acima e com DNA humano pelo banco de dados GenBank usando o programa BLASTN, no intuito de verificar se havia identidade entre as seqüências.

4.12. Reação de clivagem

A diferença entre os produtos de amplificação gerados com os dois pares de *primers* foi confirmada submetendo ambos os produtos a clivagem com a endonuclease de restrição EcoRI. Para este teste, foram utilizados seis isolados

de *C. gattii* e seis isolados de *C. neoformans* var. *grubii*, incluindo os isolados cuja identificação da espécie pelo agar CGB não concordou com a identificação pela PCR multiplex. A reação de clivagem foi feita em um volume final de 30 μ L contendo 20 μ L do produto de PCR a ser clivado (aproximadamente 1 μ g de DNA), 1U da enzima e 10% do volume final (3 μ L) do tampão React 3 (Invitrogen). O resultado foi analisado em gel de agarose 2% corado com 0,5 μ g/mL de brometo de etídio e visualizados sob luz UV após migração por eletroforese por 3 horas a 60V.

4.13. Determinação do perfil epidemiológico dos casos notificados

Para determinar o perfil epidemiológico dos casos notificados foram utilizadas as informações contidas nas fichas epidemiológicas enviadas à seção de Micologia do LACEN/FEPPS-RS juntamente com a requisição médica e o material do paciente. Os dados considerados foram sexo, raça, idade, presença de condição pré disponente à doença e sintomas. Foram utilizadas as fichas epidemiológicas de 126 pacientes com meningite criptocócica, excluindo destas análises os casos onde havia mais de um isolado do mesmo paciente e o caso onde o isolado foi realizado a partir de biópsia hepática e não de líquido. O n de cada análise variou de acordo com a disponibilidade de dados das fichas, já que a maioria delas não estava completamente preenchida.

Foram compilados os dados das fichas epidemiológicas de 220 pacientes, os quais foram encaminhados ao LACEN com suspeita de meningite, mas que tiveram exame direto, cultural e látex negativos para *C. neoformans* e *C. gattii*. Desta forma foi formado um grupo controle, o qual foi utilizado para comparação com os pacientes com criptococose nas análises estatísticas.

4.14. Teste de susceptibilidade aos antifúngicos

Oito isolados que foram obtidos de pacientes em vigência de tratamento para criptococose foram testados em relação à susceptibilidade ao fluconazol. O método utilizado foi o de microdiluição em caldo padronizado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), seguindo-se o protocolo do documento M27-A2 *National Commmittee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) de 2002.

Os isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* foram semeados em ágar Sabouraud por 48 h a 35°C e as cepas controles *Candida krusei* ATCC 6258 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019 por 24 h a 35°C. Foram realizados inóculos em RPMI contendo $0,5\text{--}2,5 \times 10^3$ UFC/mL e distribuídos 100 µL destes em cada poço da microplaca, correspondente a cada uma das concentrações do antifúngico e do controle de crescimento. As diferentes concentrações de antifúngico foram diluídas em meio RPMI 1640 tamponado com MOPS pH 7,0 e 100 µL desta diluição foram aplicados em cada poço da microplaca. Um controle de crescimento foi realizado com inoculação do meio líquido sem o antifúngico e um controle de esterilidade do meio foi realizado em poços onde não foram inoculadas leveduras.

As microplacas foram incubadas a 35°C em câmara úmida, e a leitura das concentrações inibitórias mínimas (MIC) das linhagens controles foi feita em 48 h, enquanto a dos isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* foi feita em 72 h. A leitura foi realizada visualmente, comparando-se o poço de controle de crescimento com os poços com antifúngico. A MIC foi considerada a menor concentração capaz de induzir inibição do crescimento em cerca de 50%, com relação ao poço controle.

As concentrações de fluconazol utilizadas foram: 0,125; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16; 32 e 64 µg/mL.

Como ainda não foram estabelecidos os pontos de corte que determinam resistência ou susceptibilidade para *C. neoformans* e *C. gattii*, neste trabalho foram considerados sensíveis os isolados com MIC ≤ 32 µg/mL.

4.15. Análise estatística

A análise estatística dos dados epidemiológicos e da comparação entre o PCR e o CGB foi feita aplicando-se os testes χ^2 com correção de Yates, quando necessário, ou com o teste Kappa, com o programa SPSS v 13.0.

5. RESULTADOS

5.1. Banco de amostras

A partir da análise dos dados contidos nas fichas epidemiológicas dos pacientes deste estudo, foi montada uma tabela, a qual permite uma visão geral dos casos atendidos. Nesta tabela, estão relacionados os principais dados dos isolados (data e procedência da amostra da qual foi obtido o isolado, identificação por preparação direta com nigrosina, por CGB, por PCR multiplex e por sorotipagem) e dos pacientes (cor, gênero, idade, Infecção por HIV, Condição pré disponente a doença e sintomas) (Tabela 1).

Tabela 1. Características fenotípicas e moleculares dos isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* e características dos pacientes.

Dados dos isolados							Dados dos Pacientes						
Nº	Data do isolamento	Procedência	CGB	Material	PCR	sorotipo	nigrosina	Cor	Gênero	Idade	HIV	Condição pré disponente	Sintomas
001	26.04.2000	H Vila Nova	Negativo	LCR	Cn	A	+	?	M	33	P	?	Febre
002	26.06.2000	H Municipal Getulio Vargas	Negativo	LCR	Cn	A	neg	?	M	40	P	?	Cefaléia, febre, vômitos, dilatação ventrículos
003	10.07.2000	H Vila Nova	Negativo	LCR	Cn	A	+	B	M	29	P	?	Alterações cognitivas
004	07.08.2000	H Vila Nova	Negativo	LCR	Cn	A	++	B	F	34	P	?	-
005	04.09.2000	H Vila Nova	Negativo	LCR	Cn	A	++	?	M	35	P	?	-
006	30.10.2000	H Vila Nova	Negativo	LCR	Cn	A	++	B	M	26	P	?	-
007	30.10.2000	H Vila Nova	Negativo	LCR	Cn	A	+++	B	M	39	P	?	-
008	20.12.2000	H Vila Nova	Negativo	LCR	Cn	A	+	N	M	34	P	Drogado	Cefaléia
009	21.12.2000	H Vila Nova	Negativo	LCR	Cn	A	++	B	M	39	P	Drogado	Cefaléia, alterações de comportamento
010	15.01.2001	H Vila Nova	Negativo	LCR	Cn	A	+	B	M	26	P	Drogado	Febre, hipertensão craniana
011	12.01.2001	H São Camilo	Negativo	LCR	Cn	A	+++	?	M	47	P	?	-
012	19.01.2001	H Vila Nova	negativo	LCR	Cn	A	+++	B	M	38	P	?	Cefaléia, deterioração do sensório
013	29.01.2001	H Vila Nova	negativo	LCR	Cn	A	+++	B	M	36	P	?	Confusão mental, sem força nos menbros inferiores
014	21.02.2001	H Centenário	Positivo	LCR	Cg	B	neg	?	M	?	?	?	-

Dados dos isolados							Dados dos Pacientes						
Nº	Data do isolamento	Procedência	CGB	Material	PCR	sorotipo	nigrosina	Cor	Gênero	Idade	HIV	Condição pré disponente	Sintomas
015	20.03.2001	H São Camilo	Negativo	LCR	Cn	A	+++	?	M	?	P	?	Cefaléia
016	24.06.2005	H Nossa Senhora das Graças	Negativo	LCR	Cn	A	++	B	M	?	P	?	Cefaléia
017	26.10.2001	2ª CRS H Municipal	Negativo	LCR	Cn	A	++	?	F	57	P	?	-
018	01.11.2001	Novo Hamburgo	Negativo	LCR	Cn	A	++	?	M	40	P	?	-
019	06.11.2001	H Vila Nova	Negativo	LCR	Cn	A	neg	B	M	?	P	?	Cefaléia
020	21.11.2001	10ª CRS	Negativo	LCR	Cn	A	++	?	M	36	P	?	-
021	10.12.2001	2ª CRS	Negativo	LCR	Cn	A	neg	B	F	44	P	?	-
022	17.12.2001	10ª CRS	Negativo	LCR	Cn	A	++	B	M	39	P	?	-
023	28.12.2001	H Vila Nova	Negativo	LCR	Cn	A	neg	B	M	23	P	?	-
024	11.01.2002	10ª CRS	Negativo	LCR	Cn	A	+++	B	F	41	?	?	-
025	05.02.2002	H Vila Nova	Positivo	LCR	Cn	A	+	N	F	?	P	?	Cefaléia, rigidez na nuca
026	21.12.2002	H Centenário	Negativo	LCR	Cn	A	+	N	M	?	P	?	-
027	01.03.2002	H Vila Nova	Negativo	LCR	Cn	A	++	B	M	38	P	?	-
028	01.03.2002	10ª CRS	Negativo	LCR	Cn	A	+++	B	F	23	?	?	-
029	04.03.2002	H Centenário	Positivo	LCR	Cg	B	+++	?	M	31	-	?	Lesão no SNC
030	20.05.2002	H Vila Nova	Negativo	LCR	Cn	A	neg	B	M	?	?	?	Rigidez de nuca
031	09.06.2005	5ª CRS	Negativo	LCR	Cn	A	+	B	M	37	P	?	Cefaléia
032	13.06.2002	3ª CRS	Negativo	LCR	Cn	A	++	B	M	30	P	?	-
033	17.06.2002	10ª CRS	Negativo	LCR	Cn	A	neg	N	M	34	?	?	-

Dados dos isolados						Dados dos Pacientes							
Nº	Data do isolamento	Procedência	CGB	Material	PCR	sorotipo	nigrosina	Cor	Gênero	Idade	HIV	Condição pré disponente	Sintomas
034	07.06.2005	H Nossa Senhora das Graças	Negativo	LCR	Cn	A	+++	B	M	?	P	?	Depressão de sensório, convulsões
035	07.06.2005	H Nossa Senhora das Graças	Positivo	LCR	Cg	B	++	B	M	53	-	?	Cefaléia
036	01.06.2005	5ª CRS	Negativo	LCR	Cn	A	+++	?	M	46	P	?	Cefaléia, febre, coma
037	18.07.2002	10ª CRS	Negativo	LCR	Cn	A	+++	?	M	32	?	?	-
038	24.05.2005	Sec Saúde Torres	Negativo	LCR	Cn	A	+++	?	F	?	P	Alcoólatra, drogada, fumante, TB pulmonar	Rigidez de nuca
039	23.08.2002	H Vila Nova	Negativo	LCR	Cn	A	++	B	F	37	P	?	Cefaleia, vômitos, confusão mental
040	04.05.2005	H Nossa Senhora das Graças	Negativo	LCR	Cn	A	++	B	F	?	P	?	Cefaleia intensa
041	30.08.2002	10ª CRS	Negativo	LCR	Cn	A	neg	?	M	38	?	?	-
042	20.04.2005	10ª CRS	Negativo	LCR	Cn	A	+++	?	M	45	?	?	Cefaléia, vômitos, mal estar, emagrecimento
043	29.03.2005	São Leopoldo	Negativo	LCR	Cn	A	+	B	M	34	P	?	-
044	25.07.2005	H Nossa Senhora das Graças	Negativo	LCR	Cn	A	+	B	M	?	P	?	Cefaléia
045	28.07.2005	13ª CRS	Negativo	LCR	Cn	A	+	N	M	41	?	?	-

Dados dos isolados						Dados dos Pacientes							
Nº	Data do isolamento	Procedência	CGB	Material	PCR	sorotipo	nigrosina	Cor	Gênero	Idade	HIV	Condição pré disponente	Sintomas
046	19.08.2005	6ª CRS	Negativo	LCR	Cn	A	++	B	M	20	?	?	Cefaléia, vômitos, rigidês na nuca
047	11.10.2002	H Vila Nova	Negativo	LCR	Cn	A	+	B	?	?	P	?	Cefaléia, depressão do sensório
048	14.10.2002	H Centenário	Negativo	LCR	Cn	A	+	?	M	?	P	?	-
049	24.10.2002	H Vila Nova	Negativo	LCR	Cn	A	+	B	F	?	P	?	Depressão de sensório
050	01.11.2002	H Vila Nova	Negativo	LCR	Cn	A	+++	B	M	37	P	?	-
051	01.11.2002	H Vila Nova	Negativo	LCR	Cn	A	++	B	F	34	P	?	-
052	01.11.2002	H Vila Nova	Negativo	LCR	Cn	A	+++	B	M	?	P	?	Cefaléia
053	02.12.2002	10ª CRS	Negativo	LCR	Cn	A	++	?	F	34	?	?	-
054	02.12.2002	10ª CRS	Negativo	LCR	Cn	A	+++	?	F	34	?	?	-
055	02.12.2002	H Centenário	Negativo	LCR	Cn	A	+++	B	M	69	P	Neoplasia / fumante	Hidrocefalia
056	23.12.2002	H Vila Nova	Negativo	LCR	Cn	A	neg	?	M	?	P	Drogado	-
057	02.09.2005	10ª CRS	negativo	LCR	Cn	A	+++	B	F	34	P	?	Cefaléia, vômitos, febre
058	06.03.2002	H Centenário	Positivo	LCR	Cg	B	++	?	M	31	-	?	-
059	07.03.2002	10ª CRS	Negativo	LCR	Cn	A	+++	B	M	44	?	?	-
060	04.04.2002	3ª CRS	Negativo	LCR	Cn	A	+	B	M	53	P	?	-
061	04.04.2002	H Vila Nova	Negativo	LCR	Cn	A	++	B	M	?	P	?	-
062	09.04.2002	Santa Casa	Negativo	LCR	Cn	A	neg	?	?	12	P	?	-
063	19.04.2002	5ª CRS	Negativo	LCR	Cn	A	+++	B	F	50	P	?	Cefaléia, vômitos
064	03.05.2002	H Vila Nova	Negativo	LCR	Cn	A	+++	N	M	39	P	Drogado	Cefaléia, vômitos

Dados dos isolados						Dados dos Pacientes							
Nº	Data do isolamento	Procedência	CGB	Material	PCR	sorotipo	nigrosina	Cor	Gênero	Idade	HIV	Condição pré disponente	Sintomas
065	03.05.2002	H Vila Nova	Negativo	LCR	Cn	A	neg	B	M	31	P	?	Dores nas extremidades, lentidão de raciocínio
066	10.01.2003	H Centenário	Negativo	LCR	Cn	A	++	N	M	?	P	?	-
067	31.01.2003	12ª CRS	Negativo	LCR	Cn	A	+++	?	?	39	?	?	-
068	17.02.2003	4ª CRS	Negativo	LCR	Cn	A	++	B	M	45	?	Trabalho em residência com muitos pombos	-
069	17.02.2003	10ª CRS	Negativo	LCR	Cn	A	neg	N	M	38	P	?	Cefaléia, febre, convulsões
070	13.03.2003	H Municipal Getúlio Vargas	Negativo	LCR	Cn	A	+	B	M	32	P	?	Emagrecimento, febre, tosse
071	14.03.2003	H Vila Nova	Negativo	LCR	Cn	A	++	B	M	21	P	?	Cefaléia
072	19.03.2003	H Vila Nova	Negativo	LCR	Cn	A	neg	B	M	?	P	?	Depressão do sensorio
073	15.04.2003	H Centenário	Negativo	LCR	Cn	A	neg	B	F	40	-	?	-
074	25.04.2003	H Pe Jeremias	Positivo	LCR	Cn	A	++	B	M	29	P	?	Cefaléia, prostração, convulsão
075	09.05.2003	H Vila Nova	Positivo	LCR	Cn	A	++	N	M	29	P	?	-
076	12.03.2003	1º CRS	Positivo	LCR	Cn	A	+++	B	M	24	P	?	Cefaléia, vômitos, fraquesa, convulsões, febre

Dados dos isolados							Dados dos Pacientes						
Nº	Data do isolamento	Procedência	CGB	Material	PCR	sorotipo	nigrosina	Cor	Gênero	Idade	HIV	Condição pré disponente	Sintomas
077	23.05.2003	6º CRS	Positivo	LCR	Cn	A	+++	B	M	40	?	?	Cefaléia, febre, rigides na nuca
078	18.06.2003	H Vila Nova	Negativo	LCR	Cn	A	neg	N	F	?	P	?	Tosse, febre, depressão do sensório
079	18.06.2003	10ª CRS	Negativo	LCR	Cn	A	+++	B	M	32	?	?	-
080	24.06.2003	H Vila Nova	Negativo	LCR	Cn	A	+	N	?	32	P	Drogado	-
081	24.06.2003	H Vila Nova	Negativo	LCR	Cn	A	++	N	F	?	P	?	Cefaléia, agitação
082	28.07.2003	3ª CRS	Negativo	LCR	Cn	A	++	?	F	?	?	?	-
083	31.07.2003	1ª CRS	Negativo	LCR	Cn	A	++	B	M	52	P	?	-
084	05.08.2003	10ª CRS	Negativo	LCR	Cn	A	+	B	M	22	P	?	Cefaleia, vômitos
085	06.08.2003	H Vila Nova	Negativo	LCR	Cn	A	++	N	?	?	P	?	Cefaléia
086	13.08.2003	13ª CRS	Negativo	LCR	Cn	A	+++	B	M	35	P	?	Cefaléia, rigidez na nuca
087	19.08.2003	10ª CRS	Negativo	LCR	Cg	B	++	B	M	43	?	?	-
088	28.08.2003	H São Camilo	Negativo	LCR	Cn	A	+	?	?	?	P	?	Cefaléia
089	10.09.2003	10ª CRS	Negativo	LCR	Cn	A	+++	B	M	44	P	?	-
090	12.09.2003	H Centenário	Negativo	LCR	Cn	A	+	B	M	40	P	?	-
091	15.09.2003	1ª CRS	Negativo	LCR	Cn	A	++	?	?	29	?	?	-
092	16.09.2003	H Dom João Becker	Negativo	Lcr	Cn	A	++	?	?	29	?	?	-
093	23.10.2003	H Vila Nova	Negativo	LCR	Cn	A	++	B	?	?	P	?	-
094	30.10.2003	H Centenário	Negativo	LCR	Cn	A	+++	B	M	31	P	?	-
095	12.11.2003	H Municipal Getúlio Vargas	Negativo	LCR	Cn	A	+++	B	F	33	P	?	Cefaléia, coma, diarreia

Dados dos isolados						Dados dos Pacientes							
Nº	Data do isolamento	Procedência	CGB	Material	PCR	sorotipo	nigrosina	Cor	Gênero	Idade	HIV	Condição pré disponível	Sintomas
096	06.11.2003	H Centenário	Negativo	LCR	Cn	A	neg	B	M	41	P	?	-
097	14.11.2003	10ª CRS	Negativo	LCR	Cn	A	++	B	F	30	P	Uso de antitumorais	Cefaléia, náuseas, diarreia
098	10.12.2003	13ª CRS	Negativo	LCR	Cn	A	+++	N	M	33	P	?	-
099	12.12.2003	6ª CRS	Negativo	LCR	Cn	A	neg	?	?	36	?	?	-
100	06.01.2004	1ª CRS	Negativo	LCR	Cn	A	neg	B	M	31	?	?	Cefaléia
101	16.01.2004	H Vila Nova	Negativo	LCR	Cn	A	neg	B	?	?	P	?	Cefaléia
102	16.01.2004	H Vila Nova	Negativo	LCR	Cn	A	+	B	?	?	P	?	Depressão do sensorio, cefaléia
103	19.01.2004	3ª CRS	Negativo	LCR	Cn	A	++	B	M	38	?	?	Cefaléia
104	22.01.2004	H Vila Nova	Negativo	LCR	Cn	A	+	N	F	34	?	?	Cefaléia, febre
105	13.02.2004	H Centenário	Negativo	LCR	Cn	A	neg	B	M	48	P	?	Cefaléia
106	19.02.2004	H Centenário	Negativo	LCR	Cn	A	+++	B	F	24	P	?	Cefaléia
107	27.02.2004	H Centenário	Negativo	LCR	Cn	A	+	B	M	48	P	?	-
108	01.04.2004	H Vila Nova	Negativo	LCR	Cn	A	+++	B	M	35	P	?	Cefaléia
109	15.04.2004	H Vila Nova	Negativo	LCR	Cn	A	++	B	F	17	P	?	Cefaléia
110	15.04.2004	H Vila Nova H Nossa	Negativo	LCR	Cn	A	++	B	M	35	P	?	Cefaléia
111	05.05.2004	Senhora das Graças	Negativo	LCR	Cn	A	+	B	F	53	P	?	Cefaléia, febre
112	11.05.2004	H Vila Nova	Negativo	LCR	Cn	A	+++	B	?	?	P	?	Cefaléia, náuseas, vômitos
113	11.05.2004	Santa Casa	Negativo	LCR	Cn	A	++	N	M	34	P	?	Cefaléia, rigidez na nuca
114	21.05.2004	H Centenário H Nossa	Negativo	LCR	Cn	A	neg	B	M	47	-	Desnutrição	-
115	25.06.2004	Senhora das Graças	Negativo	LCR	Cn	A	++	B	M	63	P	?	-

Dados dos isolados				Dados dos Pacientes									
Nº	Data do isolamento	Procedência	CGB	Material	PCR	sorotipo	nigrosina	Cor	Gênero	Idade	HIV	Condição pré disponível	Sintomas
116	22.07.2004	10ª CRS	Negativo	LCR	Cn	A	neg	B	M	31	P	?	Cefaléia, vômitos
117	22.07.2004	11ª CRS	Negativo	LCR	Cn	A	+++	B	M	26	P	?	Cefaléia, febre, sonolência
118	22.07.2004	H Vila Nova	Negativo	LCR	Cn	A	+	B	F	40	P	?	Cefaléia
119	05.08.2004	10ª CRS	Negativo	LCR	Cn	A	+++	B	M	57	?	?	Rigidez na nuca, febre, dispnéia
120	13.08.2004	6ª CRS	Negativo	LCR	Cn	A	++	B	M	25	P	?	Cefaléia, febre
121	13.08.2004	10ª CRS	Negativo	LCR	Cn	A	++	B	M	44	?	Desnutrição, convulsão	Convusão
122	17.08.2004	H Centenário	Negativo	LCR	Cn	A	++	B	F	41	-	?	-
123	27.08.2004	10ª CRS	Negativo	LCR	Cn	A	+++	B	M	24	?	?	Cefaléia, vômitos, febre
124	30.11.2004	H Centenário	Negativo	LCR	Cn	A	+++	B	F	?	P	?	Cefaléia
125	20.12.2004	H Centenário	Negativo	LCR	Cn	A	neg	N	M	43	P	?	-
126	30.12.2004	H Nossa Senhora das Graças	Negativo	LCR	Cn	A	+++	B	M	?	P	?	Deprssão do sensório, cefaléia
127	11.01.2005	H São Camilo	Positivo	LCR	Cg	B	+	B	M	35	?	?	Cefaléia
128	11.01.2005	H Centenário	Negativo	LCR	Cn	A	neg	B	F	40	P	?	-
129	11.02.2005	Santa Casa	Negativo	LCR	Cn	A	neg	?	M	?	P	Drogado, alcoólatra, HCV, cirrose	Cefaléia, confusão do sensório
130	12.09.2005	Santa Casa	Negativo	biopsia hepática	Cn	A	+	B	M	?	P	?	

Dados dos isolados				Dados dos Pacientes									
Nº	Data do isolamento	Procedência	CGB	Material	PCR	sorotipo	nigrosina	Cor	Gênero	Idade	HIV	Condição pré disponente	Sintomas
131	13.09.2005	5ª CRS	negativo	LCR	Cn	A	+++	B	M	38	P	Alcoólatra	Cefaléia, convulsões, confusão mental
132	13.09.2005	H Nossa Senhora das Graças	Negativo	LCR	Cn	A	+++	N	M	?	P	?	Depressão do sensório

B = branco; N = não branco; LCR = líquido; CRS = coordenadoria regional de saúde; Cn = *C. neoformans*; Cg = *C. gattii*; HIV = Vírus da imunodeficiência humana; M = masculino; F = feminino, H = hospital; ? = dado não informado; + = fracamente positivo; ++ = positivo; +++ = fortemente positivo; - = negativo; P = positivo.

5.2. Identificação dos isolados pelos métodos tradicionais

Todos os 132 isolados apresentaram reação positiva para as provas de urease e produção de melanina em ácido cafeico. Dez isolados (7,58%) apresentaram reação positiva em ágar CGB sendo, por este teste, identificados como *C. gattii*, enquanto 122 (92,42%) apresentaram reação negativa, e foram identificados como *C. neoformans*.

5.3. Sorotipagem

Na sorotipagem com o kit Crypto Check (Iatron, Tóquio, Japão), seis isolados aglutinaram com os soros 1 e 5, sendo classificados como sorotipo B, ou seja, *C. gattii* (4,55%), enquanto 126 aglutinaram com os soros 1 e 7, sendo classificadas como sorotipo A, *C. neoformans* var. *grubii* (95,45%).

5.4. Extração de DNA

No método de extração utilizado primeiramente, onde a lise era feita com pérolas de vidro, o sedimento de DNA foi suspenso em 100 μL de TE, e o rendimento variava em torno de 10 a 40 $\text{ng}/\mu\text{L}$. No novo protocolo adaptado neste trabalho, com lise por maceração em presença de nitrogênio líquido, o DNA extraído de cada amostra macerada foi suspenso em 600 μL de TE, e o rendimento foi de aproximadamente 20 a 80 $\text{ng}/\mu\text{L}$, um rendimento aproximadamente trinta vezes maior partindo-se da mesma quantidade inicial de células que foi utilizada com o protocolo de lise por pérolas de vidro. O rendimento foi medido visualmente através de comparação com DNA controle.

A Tabela 2 apresenta as amostras utilizadas como controle para a reação de PCR para comparar a média de rendimento dos dois protocolos de extração de DNA utilizados.

Tabela 2. Comparação da média de rendimento dos protocolos de extração de DNA.

ISOLADOS	QUANTIDADE TOTAL DE DNA POR EXTRAÇÃO (µg)	
	Lise por pérolas de vidro	Lise por maceração
HC5 sorotipo A	1,1	30,0
AL33 sorotipo B	1,0	20,5
779 VGIV sorotipo C	1,2	24,0
28957 sorotipo D	0,9	30,0
48184 sorotipo AD	1,0	36,0

5.5. Reação de amplificação

A metodologia de PCR multiplex desenvolvida gerou um amplicon de 695 pb para *C. neoformans* e um amplicon de 448 pb para *C. gattii*. De acordo com os tamanhos dos amplicons, seis isolados foram identificados como *C. gattii*, (4,55%), enquanto 126 isolados (95,45%) foram identificadas como *C. neoformans* (Figura 3).

A comparação das seqüências amplificadas com o isolado seqüenciado *C. neoformans* var. *neoformans* JEC21 através do programa BLASTN mostrou que a região amplificada de *C. neoformans* corresponde a uma região do cromossomo 3 da levedura que codifica para uma aminotransferase, enquanto a região amplificada em *C. gattii* corresponde a uma região do cromossomo 2 da levedura que codifica para uma polimerase (Figura 4 a e b). Na figura, estão com

sombreamento preto as regiões que não possuem identidade de seqüências e as regiões correspondentes aos *primers* estão sublinhadas em vermelho.

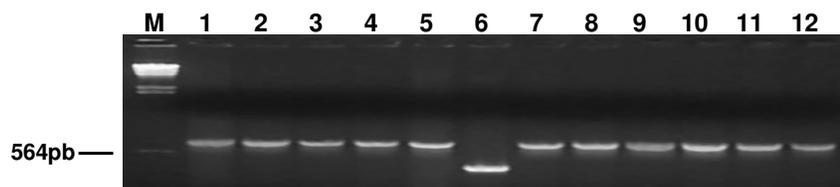


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose 1,5% contendo os produtos amplificados por PCR multiplex utilizando os *primers* CNA70A, CNA70S, CNB49A e CNB49S para identificação de *C. neoformans* e *C. gattii*. M: marcador de tamanho molecular λ /Hind3. Canaletas 1 a 5 e 7 a 12: *C. neoformans*; canaleta 6: *C. gattii*.

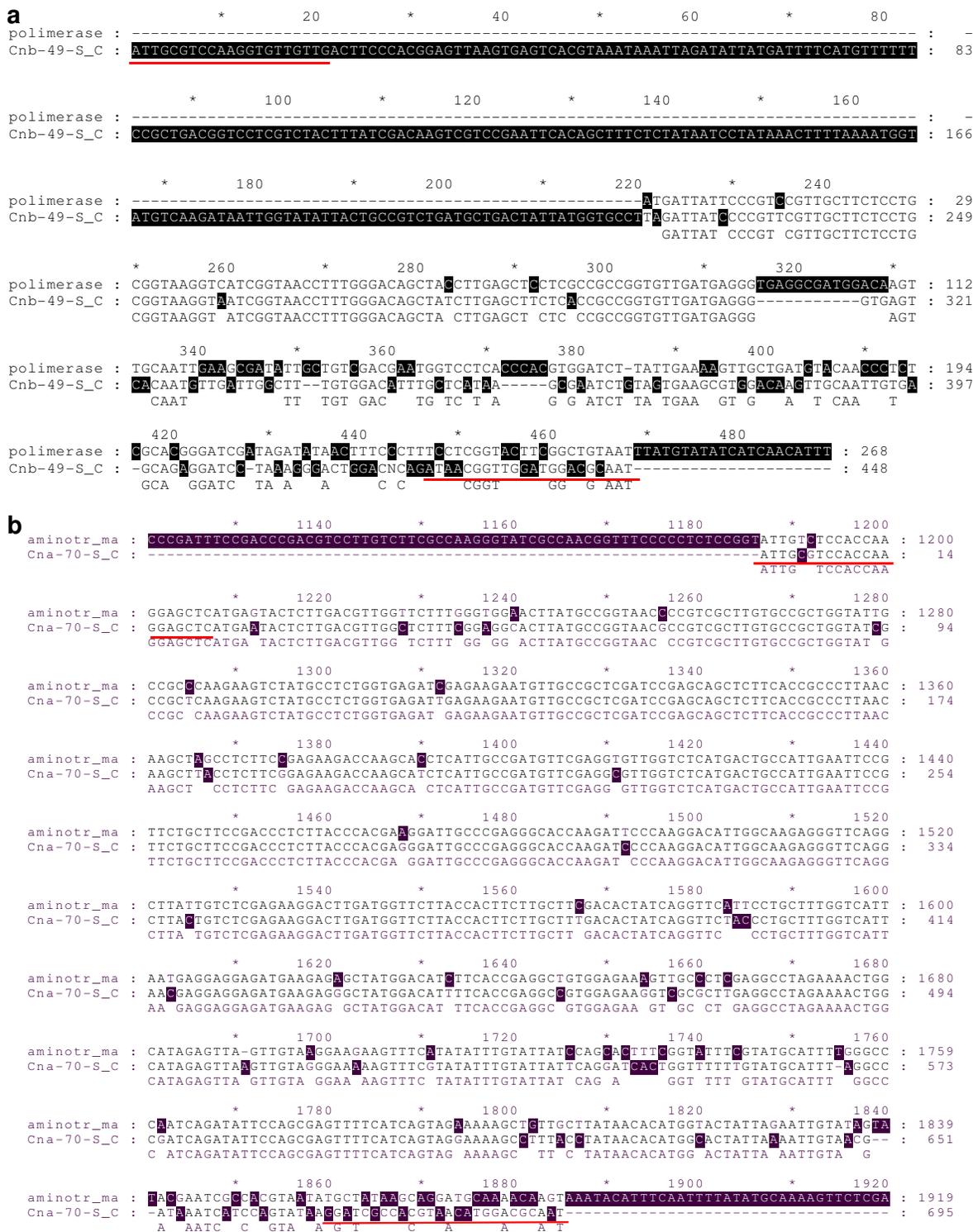


Figura 4: Alinhamento das seqüências amplificadas pela PCR multiplex com a seqüência correspondente em *C. neoformans* var. *neoformans* JEC21. As regiões dos primers estão sublinhadas em vermelho. Os nucleotídios com identidade entre as duas seqüências estão sem sombreado, enquanto os que não possuem identidade estão com sombreado preto. **a.** seqüência amplificada pelos primers CNB49S e CNB49A, específicos para *C. gattii*, com a seqüência correspondente em *C. neoformans* var. *neoformans* JEC21 (cromossomo 2, polimerase putativa). **b.** seqüência amplificada pelos primers CNA70S e CNA70A, específicos para *C. neoformans* com a região correspondente em *C. neoformans* var. *neoformans* JEC21 (cromossomo 3, aminotransferase putativa).

5.6. Teste de Sensibilidade

Entre as concentrações de DNA testadas, a concentração mínima amplificada pela PCR multiplex foi de 1,25ng (Figura 5).

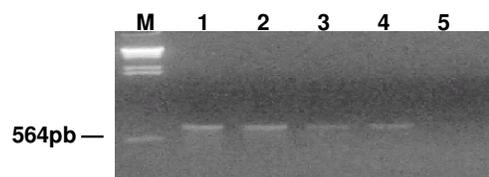


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose 1,5% com os produtos amplificados pela PCR multiplex utilizando os *primers* CNA70A, CNA70S, CNB49A e CNB49S para teste de sensibilidade do método. M: marcador de tamanho molecular. Canaletas 1 a 5: PCR utilizando amostra padrão HC5, sorotipo, A nas concentrações de 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625ng/ μ L, respectivamente.

5.7. Teste de Especificidade

O teste de especificidade foi realizado submetendo à mesma reação de PCR o DNA dos seguintes microrganismos, *Mycobacterium tuberculosis*, *Candida albicans*, *Neisseria meningitidis*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, possíveis causadores de meningite em pacientes imunocomprometidos, bem como, DNA humano. Nenhuma destas amostras foi amplificada pela PCR, nas condições testadas (Figura 6).

As seqüências amplificadas pela PCR multiplex foram comparadas com os microrganismos citados acima e com DNA humano utilizando o programa BLASTN, não sendo encontrada identidade significativa entre nenhuma das seqüências.

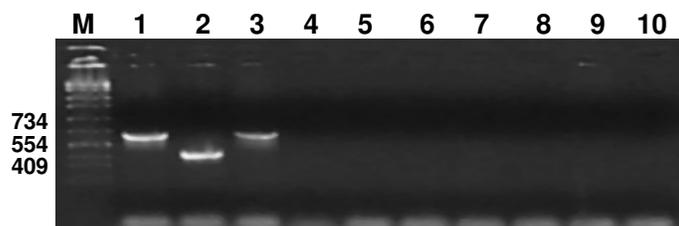


Figura 6. Eletroforese em gel de agarose 1,5% com os amplicons gerados pela PCR multiplex utilizando os *primers* CNA70A, CNA70S, CNB49A e CNB49S para teste de especificidade do método. M: marcador de tamanho molecular. Canaletas 1: controle *C. neoformans* var. *grubii*; 2: controle *C. gattii*; 3: controle *C. neoformans* var. *neoformans*; 4: *S. aureus*; 5: *M. tuberculosis*; 6: *C. albicans*; 7: *E. coli*; 8: *N. meningitidis*; 9: DNA humano; 10: controle negativo.

5.8. Reação de clivagem

A reação de clivagem com a endonuclease de restrição EcoRI gerou fragmentos de 447 e 248pb para *C. neoformans* e 324 e 124pb para *C. gattii*, como esperado, de acordo com as seqüências mostradas na Figura 4 e conforme gel de agarose 2% mostrado na Figura 7.

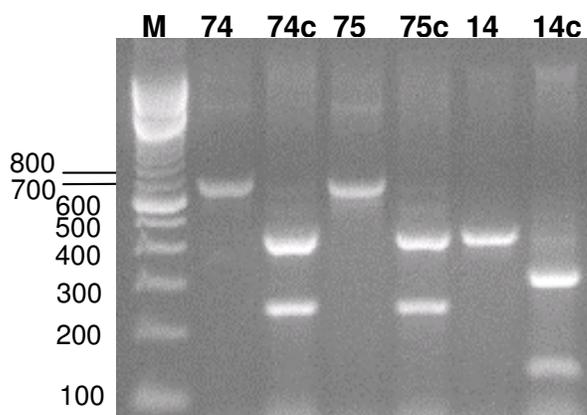


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose 2% com os produtos da PCR multiplex utilizando os *primers* CNA70A, CNA70S, CNB49A e CNB49S clivados com a enzima de restrição EcoRI. M: marcador de tamanho molecular. Canaletas: produtos de PCR não clivados e clivados, respectivamente. Amostras 74 e 75: *C. neoformans*; amostra 14: *C. gattii*.

5.9. Análise epidemiológica

5.9.1. Freqüência de cor de pele dos pacientes

Quanto à raça, as fichas epidemiológicas dividiam os pacientes em “brancos” e “não brancos”. Foram consideradas para esta análise apenas as 103 (82,4%) fichas que continham esta informação sobre os pacientes, e 217 controles. Havia 86 pacientes brancos (83,5%) e 17 não brancos (16,5%), enquanto entre os controles a freqüência foi de 142 (65,44%) brancos e 75 (34,56%) não brancos. Esta diferença foi estatisticamente significativa de acordo com o teste de χ^2 . A freqüência de cor de pele dos pacientes com meningite criptocócica e dos pacientes do grupo controle está mostrada na Tabela 3.

Tabela 3. Freqüência de cor de pele dos pacientes com meningite criptocócica e dos pacientes do grupo controle.

	Pacientes		Controles	
	n	%	n	%
Brancos*	86	83,50	142	65,44
Não-brancos	17	16,50	75	34,56
Total	103	100	217	100

* Valores diferem estatisticamente de acordo com o teste do χ^2 ($p < 0,0001$).

5.9.2. Freqüência do gênero dos pacientes

O gênero não foi informado em 7 fichas epidemiológicas (5,6%), dos informados, 27 pacientes eram mulheres (22%) e 90 eram homens (68,2%). Considerando apenas os 119 casos cujas fichas continham esta informação, as mulheres foram 22,88% dos casos, enquanto os homens foram 77,12%. Os

dados referentes ao gênero dos pacientes com meningite criptocócica e dos pacientes do grupo controle estão mostrados Tabela 4.

Tabela 4. Freqüência do gênero entre os pacientes com meningite criptocócica e dos pacientes do grupo controle.

	Pacientes		Controles	
	n	%	n	%
Masculino	91	77,12	137	62,56
Feminino	27	22,88	82	37,44
Total	118	100	219	100

5.9.3. Infecção pelo HIV

O número de fichas sem esta informação foi 25 (20% dos pacientes). Havia 95 pacientes HIV positivos (76%) e 5 pacientes HIV negativos (4%). Considerando apenas os 100 casos onde o resultado do teste para HIV foi informado nas fichas, 95% eram positivos e 5% negativos. Entre os pacientes do grupo controle, 86,67% eram HIV positivo. Esta diferença foi estatisticamente significativa de acordo com o teste de χ^2 com correção de Yates. A Tabela 5 mostra os dados referentes à freqüência de infecção pelo HIV entre os pacientes.

Tabela 5. Freqüência de infecção pelo HIV entre os pacientes com meningite criptocócica e os pacientes do grupo controle.

	doentes		controles	
	n	%	n	%
Negativo	5	5,00	20	13,33
Positivo*	95	95,00	130	86,67
Total	100	100	150	100

* Valores diferem estatisticamente de acordo com o teste do χ^2 com correção de Yates ($p < 0,0001$).

5.9.4. Procedência

As amostras foram enviadas ao LACEN por diversos hospitais de Porto Alegre e do interior do estado ou diretamente pelas Coordenadorias Regionais de Saúde (CRS). Cada CRS compreende um grupo de cidades do interior do estado, não se podendo identificar a cidade dos pacientes que chegaram ao setor por esta via. A relação completa de procedências está apresentada na Tabela 6. Na tabela, a cidade citada ao lado de cada CRS representa a cidade sede da mesma, e ao lado dos nomes dos hospitais estão os nomes de suas respectivas cidades.

Tabela 6. Procedência das amostras.

Procedência	Número	Percentual (%)
10ª CRS - Uruguaiana	22	16,67
11ª CRS - Erechim	1	0,76
12ª CRS - Santo Ângelo	1	0,76
13ª CRS - Santa Cruz do Sul	3	2,27
1ª CRS - Porto Alegre	4	3,03
2ª CRS - Porto Alegre	2	1,52
3ª CRS - Pelotas	4	3,03
4ª CRS - Santa Maria	1	0,76
5ª CRS - Caxias do Sul	4	3,03
6ª CRS - Passo Fundo	4	3,03
H. Dom João Becker - Gravataí	1	0,76
H. Pe. Jeremias - Cachoeirinha	1	0,76
H. São Camilo - Esteio	4	3,03
H. Centenário - São Leopoldo	19	14,39

Procedência	Número	Percentual (%)
H. Municipla Getúlio Vargas - Sapucaia do Sul	3	2,27
H. Municipal Novo Hamburgo - Novo Hamburgo	1	0,76
H. Nossa Sra das Graças - Canoas	9	6,82
H. Vila Nova - Porto Alegre	42	31,82
H. Santa Casa - Porto Alegre	4	3,03
São Leopoldo - Epidemiologia	1	0,76
Secretaria Saúde - Torres	1	0,76
Total	132	100

5.9.5. Faixas etárias

A idade, ou data de nascimento foi informada em 93 fichas (73,8% dos 126 pacientes analisados para este dado). A média geral foi de 36,34 anos, sendo que entre as mulheres foi de 36,86 anos e entre os homens, 37,17 anos. A faixa etária mais atingida foi entre 30 e 39 anos, com 43 casos (46,24%); em seguida estavam os pacientes entre 40 e 49 anos, com 24 casos (25,81%); entre 20 e 29 anos havia 15 pacientes (16,13%); entre 50 e 59 anos havia 7 pacientes (7,53%); entre 60 e 69 anos havia 2 pacientes (2,15%) e, entre 10 e 19 anos também havia 2 pacientes (2,15%). Os dados referentes às faixas etárias dos pacientes estão listados na Tabela 7.

Tabela 7. Frequência de faixas etárias dos pacientes com meningite criptocócica e dos pacientes do grupo controle.

	Doentes		Controles	
	n	%	n	%
De 10 a 19 anos	2	2,15	5	2,86
De 20 a 29 anos	15	16,13	50	28,57
De 30 a 39 anos*	43	46,24	63	36,00
De 40 a 49 anos	24	25,81	36	20,57
De 50 a 59 anos	7	7,53	14	8,00
De 60 a 69 anos	2	2,15	7	4,00
Total	93	100	175	100,00

* Valores diferem estatisticamente de acordo com o teste do χ^2 com correção de Yates ($p < 0,0001$).

5.9.6. Sintomatologia

A sintomatologia de 70 pacientes foi descrita nas fichas epidemiológicas e comparada à sintomatologia de 135 pacientes do grupo controle. A sintomatologia mais freqüente entre os pacientes foi cefaléia (80%), seguida de febre (22,86%) e vômitos (17,14%). A freqüência dos sintomas está descrita na Tabela 8. Cefaléia, depressão do sensório e rigidez na nuca foram os únicos sintomas que diferiram estatisticamente dos sintomas apresentados pelos pacientes do grupo controle de acordo com o teste de χ^2 com correção de Yates ($p < 0,0001$).

Tabela 8. Sintomatologia mais freqüente entre os pacientes com meningite criptocócica e os pacientes do grupo controle.

Sintomas⁺	% pacientes com meningite criptocócica (n=70)	% casos controle (n=135)
Febre	22,86	29,63
Cefaléia*	80,00	40,74
Vômitos	17,14	18,52
Dilatação dos ventrículos	1,43	0,74
Altrações cognitivas	1,43	1,48
Altrações de comportamento	1,43	1,48
Hipertensão craniana	1,43	0,00
Depressão do sensorio*	14,29	5,93
Confusão mental	5,71	2,96
Sem força nos membros inferiores	1,43	0,00
Rigidez na nuca*	11,43	6,67
Lesão no SNC	1,43	0,74
Convulsão	8,57	8,15
Coma	2,86	5,93
Mal estar	1,43	0,00
Emagrecimento	2,86	0,00
Hidrocefalia	1,43	2,22
Dores nas extremidades	1,43	1,48
Tosse	2,86	0,74
Prostação	1,43	0,00
Agitação	1,43	1,48
Diarréia	2,86	0,74
Sonolência	1,43	1,48
Dispneia	1,43	0,00
Náusea	2,86	0,00

* Valores diferem estatisticamente de acordo com o teste do χ^2 com correção de Yates ($p < 0,0001$).

⁺ Cada paciente pode apresentar mais de um sintoma.

5.10. Teste de susceptibilidade ao fluconazol

Os oito isolados que foram obtidos de pacientes em vigência de tratamento para criptococose foram testados em relação a susceptibilidade ao fluconazol. Todos eles foram sensíveis ao fluconazol, apresentando concentração inibitória mínima (MIC) entre 0,25 e 4,0, conforme Tabela 9.

Tabela 9. Concentração inibitória mínima de fluconazol para as amostras testadas.

Amostra	MIC fluconazol
008	2,0
010	4,0
012	2,0
061	2,0
095	2,0
107	0,25
130	0,25
131	2,0
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	2,0
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	32

5.11. Teste de Kappa para comparação entre as metodologias de PCR e CGB

Os resultados obtidos para comparação das metodologias de PCR multiplex e cultivo em CGB em relação a sorotipagem pelo teste de Kappa é mostrado na Tabela 10.

Tabela 10. Teste de Kappa para comparação do PCR e do CGB em relação a sorotipagem.

	Valor teste de kappa	Número de casos
PCR X Sorotipagem	1,000	132
CGB X Sorotipagem	0,509	132

6. DISCUSSÃO

O cultivo em ágar CGB é um método tradicionalmente utilizado para identificação das espécies *C. neoformans* e *C. gattii* em laboratórios desde que foi proposto em 1982 (KWON-CHUNG *et al.*, 1982; CANELO *et al.*, 1999; CHATURVEDI *et al.*, 2005). Ao degradar a glicina, o fungo libera amônia, alcalinizando o meio que passa de sua cor inicial, amarelo-esverdeado, para azul, o que caracteriza a reação positiva para *C. gattii*. Um inconveniente desta prova bioquímica é a possibilidade de reações duvidosas, inviabilizando um diagnóstico seguro no caso de o laboratório contar apenas com este método de identificação. Além disso, resultados falso-positivos vêm sendo descritos na literatura, sugerindo que este não é um método seguro para identificação das espécies (NAKAMURA *et al.*, 1998, KHAN *et al.*, 2003). Em nosso trabalho, os resultados obtidos pelo CGB apresentaram uma concordância de 95,45% (126 das 132 amostras) com a sorotipagem, sendo cinco resultados falso-positivos e um falso-negativo, confirmando a necessidade do uso de outras técnicas para uma identificação mais fidedigna.

Técnicas moleculares vêm sendo utilizadas para tipificar as espécies, especialmente para estudos epidemiológicos, tais como PCR *fingerprinting*, RAPD ou RFLP (MEYER *et al.*, 1999; CHEN *et al.*, 2000; MEYER *et al.*, 2003; ABEGG *et al.*, 2006). A PCR multiplex proposta em nosso trabalho é uma técnica simples e rápida, e mostrou especificidade, não amplificando DNAs de outros microrganismos ou DNA humano, e identificando corretamente as amostras testadas. A concordância entre os resultados da identificação por PCR e pela sorotipagem com o kit Crypto Check, neste trabalho utilizado como padrão, foi de 100% das 132 amostras. Tendo a PCR sido mais específica do que o CGB na

identificação das espécies em 6 (4,55%) das 132 amostras, esta se mostrou um método eficiente para este fim. Recentemente o kit Crypto Check (Iatron, Tóquio, Japão) deixou de ser comercializado, considerando que não existe nenhum similar no mercado, isso tornou ainda mais importante o desenvolvimento de técnicas mais seguras do que apenas o cultivo em agar CGB para identificação das espécies. Também é importante salientar que a utilização da técnica de PCR reduz em seis dias o prazo final para identificação da espécie em laboratório, quando comparado ao CGB. Esta característica é muito importante devido a gravidade da doença e a urgência para iniciar a terapia.

Os resultados apresentados por DE BEDOUT *et al.* (1999) indicam que os antifúngicos usados regularmente no tratamento da criptococose não possuem *in vitro* uma ação inibitória tão forte sobre *C. gattii*, quanto sobre *C. neoformans*, o que reflete a dificuldade do tratamento de infecções por esta espécie e a necessidade de uma terapia mais prolongada. Presença de hidrocefalia, lesões cerebrais focais, maior incidência de criptocomas no pulmão e cérebro necessitando intervenções cirúrgicas e, ainda, maior índice de seqüelas neurológicas também são características observadas na infecção causada por *C. gattii* que diferem daquela causada por *C. neoformans* (SEVERO *et al.*, 1999; SORREL, 2001), o que justifica a necessidade de uma correta identificação das mesmas em laboratório.

Outro aspecto importante do nosso trabalho está no fato de ser este o primeiro estudo determinando o perfil epidemiológico dos pacientes com meningite criptocócica no estado do Rio Grande do Sul. Esta é uma importante contribuição para os conhecimentos em epidemiologia desta doença, pois até então, no estado, havia apenas relatos de alguns casos isolados (SEVERO *et al.*,

1999; LOPES *et al.*, 1997; FONTANA *et al.*, 1987) ou estudos focados principalmente em características epidemiológicas das leveduras, muito mais do que nos próprios pacientes. Estes estudos anteriores avaliaram características como *mating type*, padrões de PCR *fingerprinting* e RAPD, atividade de fosfolipase, formação de cápsula, assimilação de carbonos, testes de urease, nitrato e ágar CGB (HORTA *et al.*, 2002; CASALI *et al.*, 2003; ABEGG *et al.*, 2006). Apesar de um estudo anterior ter citado idade, sexo e presença ou não de HIV entre pacientes (CASALI *et al.*, 2003), nosso estudo é o primeiro a analisar características de um número tão relevante de pacientes com meningite criptocócica em um período contínuo de cinco anos com amostras de várias cidades, traçando um perfil dos pacientes desta doença no Rio Grande do Sul.

A frequência das espécies foi determinada, encontrando-se 126 isolados (95,45%) identificados como *C. neoformans var. grubii* e 6 isolados (4,55%) identificados como *C. gattii*. Estes dados concordam com a literatura mundial que mostra predomínio da infecção pela variedade *grubii* (MITCHEL & PERFECT, 1995; CASADEVALL & PERFECT, 1998; IDNURM *et al.*, 2005). Não foi encontrado nenhum isolado sorotipo D, prevalente em regiões de clima temperado. Estudo anterior feito no RS (CASALI *et al.*, 2003) mostrou prevalência de 89,52 e 10,48% para as variedades *grubii* e *gattii*, respectivamente, no entanto, a percentagem de *C. gattii* neste estudo parece ter sido superestimada, devido ao fato de que um dos laboratórios do estado cedeu à autora apenas isolados desta espécie, sendo improvável que não houvessem também isolados *C. neoformans* em tal laboratório.

Quanto à análise do perfil epidemiológico dos pacientes, 95% de 100 pacientes eram HIV-positivo, mostrando, novamente, a infecção por HIV como

principal fator de risco para criptococose. A frequência de infecção pelo HIV foi significativamente maior entre os pacientes com meningite criptocócica do que entre aqueles do grupo controle ($p = 0,0001$).

Este estudo também concordou com a literatura em relação à prevalência da criptococose entre os sexos, sendo os pacientes homens 77,12% do total, enquanto as mulheres representaram 22,88% do total. Um estudo realizado na França, com 2125 casos mostrou uma taxa homens:mulheres de 6,8 entre os pacientes infectados pelo HIV e 1,7 entre os não infectados (DROMER *et al.*, 2004), contrariamente, na Austrália, estudo retrospectivo com casos de 1994 a 1997 mostrou o sexo masculino como sendo fator de risco apenas entre os pacientes imunocompetentes (CHEN *et al.*, 2000). Outro estudo com 77 casos das regiões da Áustria, Alemanha e Suíça também apresentou prevalência entre os homens, sendo eles 66,23% dos casos contra 33,77% de mulheres (TINTELNOT *et al.*, 2003). Na África, estudo com 36 pacientes não infectados pelo HIV mostrou resultados semelhantes, 66,67% homens e 33,33% mulheres (MILLOGO *et al.*, 2004). Estudo publicado pelo *IberoAmerican Cryptococcal Study Group* também mostrou resultados semelhantes com isolados de nove países, incluindo o Brasil, com 5,1 vezes mais homens infectados do que mulheres (MEYER *et al.*, 2003).

Parece claro que existe uma predominância de infecção por *C. neoformans* e *C. gattii* em homens. Tal predominância também ocorre em outras micoses sistêmicas, como por exemplo, a paracoccidiodomicose, onde estudos já mostraram a influência dos hormônios femininos no curso da infecção.

Para *Paracoccidioides brasiliensis* foi demonstrado que a taxa de infecção subclínica é a mesma entre homens e mulheres, no entanto, a progressão para

doença é maior em homens. Camundongos machos e fêmeas foram infectados com conídios (forma infecciosa), e nas primeiras 48 horas após a infecção estes conídios já estavam se transformando em leveduras (forma patogênica) nos machos, mas não nas fêmeas (ARISTIZABAL *et al.*, 1998; BORGES-WALMSLEY *et al.*, 2002).

É possível que os hormônios femininos também tenham papel importante na defesa contra a criptococose, já que já foi demonstrado em camundongos que as fêmeas infectadas com *Cryptococcus neoformans* produziram maiores níveis de citocinas no plasma do que os machos, além apresentarem níveis maiores de TNF- α e IFN- γ no sangue e no baço (LORTHOLARY *et al.*, 2002).

A faixa etária mais atingida entre os pacientes do nosso estudo esteve entre 30 e 39 anos, representando 46,24% do total e apresentando diferença estatística em relação ao grupo controle ($p = 0,0001$). Dados semelhantes foram encontrados na região da Áustria, Alemanha e Suíça, onde a faixa etária dos homens esteve entre 31 e 40 anos, enquanto entre as mulheres a faixa etária esteve entre 21 e 30 anos (TINTELNOT *et al.*, 2003). Também na França, DROMER *et al.* (2004) apresentaram predomínio da faixa etária entre os 26 e os 35 anos nos pacientes HIV-positivos e mais de 46 anos em pacientes HIV-negativos. A média das idades dos pacientes deste estudo foi de 36,63 anos, semelhante a estudos realizados na África (34,25 anos) (MILLOGO *et al.*, 2004) e França (33 anos entre as mulheres e 36 anos entre os homens) (DROMER *et al.*, 2004). Na Austrália dois estudos independentes mostraram diferenças entre a média das idades dos homens e das mulheres, sendo 39 anos entre os homens e 46 anos entre as mulheres em um estudo que contou apenas com 18 pacientes (JENNEY *et al.*, 2004) e 36,8 anos entre os homens e 47,7 anos entre as

mulheres em estudo com 350 pacientes (CHEN *et al.*, 2000). A maior média foi encontrada na Tailândia, 49 anos. No entanto, este estudo teve um diferencial, pois se tratavam de 40 pacientes HIV-negativos (KIERTIBURANAKUL *et al.*, 2006). Os dados da literatura sugerem que a média de idade dos pacientes infectados com criptococose é maior entre as mulheres do que entre os homens e maiores entre os não infectados pelo HIV do que entre os infectados.

Além da infecção pelo HIV, outros fatores foram também relatados nas fichas epidemiológicas como sendo pré-disponentes a criptococose. Em primeiro lugar se destacou o uso de drogas (8 pacientes), seguido de alcoolismo, tabagismo e desnutrição (2 pacientes cada); e tuberculose, neoplasia, uso de antitumorais, hepatite C, cirrose e trabalho em residência com muitos pombos (1 paciente cada). De um dos pacientes com desnutrição e um que relatou trabalhar em residência com muitos pombos, não foi obtido o resultado do exame de HIV. As demais condições relatadas estavam todas associadas à AIDS, exceto por um paciente, sabidamente HIV negativo, que apresentava como única condição pré disponente a desnutrição.

CHEN *et al.*, (2000) sugeriram a necessidade de explorar fatores de risco ainda não explorados como susceptibilidade genética, status sócio-econômico e status nutricional, no entanto, não foram encontrados na literatura outros relatos de desnutrição como único fator pré disponente para infecção por *C. neoformans* var. *grubii*. Câncer, cirrose, alcoolismo, uso de drogas antitumorais, tuberculose, infecção pelo vírus da hepatite C e desnutrição já foram relacionados à criptococose em pacientes com ou sem AIDS (FRIEDMAN *et al.*, 2005; EL-SERAG *et al.*, 2003; AWASTHI *et al.*, 2000). KIERTIBURANAKUL *et al.* (2006) mostraram em pacientes HIV-negativos as terapias imunossupressoras como

principal fator pré disponente (41%), seguido de lupus eritematoso sistêmico e câncer (16% cada), desmielinização, inflamação crônica e cirrose (5% cada). TINTELNOT *et al.* (2004) também apresentaram como principal fator pré disponente além da AIDS o uso de terapias com corticosteróides, seguida de câncer, transplante de órgãos e contato com pássaros.

Em relação à frequência de cor da pele dos pacientes, houve um claro predomínio de brancos, correspondendo a 83,5% do total e sendo estatisticamente diferente do grupo controle ($p = 0,0001$). Essa diferença estatística poderia colocar a raça branca como sendo fator de risco para criptococose, entretanto, nossos dados discordam daqueles obtidos por Hajjeh *et al.* (1999) que no ano de 1993, em quatro regiões dos Estados Unidos, mostraram uma taxa de criptococose significativamente maior entre os afro-americanos (31/1000) do que entre os brancos (23/1000) com AIDS. Entre os pacientes não infectados pelo HIV, a taxa de afro-americanos foi levemente maior, mas não chegou a ser estatisticamente significativa. Os autores discutem que, apesar do número de afro-americanos com criptococose ser maior do que o número de brancos, o estudo de casos controle não mostrou relação entre criptococose e raça, sugerindo que deva haver outras condições relacionadas à doença nestes pacientes (HAJJEH *et al.*, 1999).

Estudo posterior do mesmo grupo mostrou também um maior índice de infecção entre os afro-americanos do que brancos com AIDS, e o contrário em pacientes sem AIDS. Neste trabalho, eles sugerem que a prevalência de afro-americanos não esteja diretamente relacionada à criptococose, mas sim, relacionada a falta de acesso destes pacientes aos cuidados adequados para a AIDS, já que a maioria dos isolados era proveniente de hospitais públicos (MIRZA

et al., 2003). Na verdade, não há relação clara entre raça e infecção por criptococose.

Quanto a sintomatologia, dentre os muitos sintomas citados nas fichas epidemiológicas, apenas 3 foram significativamente diferentes daqueles relatados pelos pacientes do grupo controle ($p = 0,0001$), são eles cefaléia (80%), depressão do sensório(14,29%) e rigidez na nuca (11,43%). Febre e vômitos foram relatados em muitos pacientes com criptococose, porém, o mesmo ocorreu entre os pacientes do grupo controle. Em estudo realizado na Bahia avaliando 104 prontuários de pacientes com criptococose, foram encontrados como sintomas mais freqüentes a cefaléia (92,7%), febre (84,4%) e rigidez na nuca (83,2%) (DARZÉ *et al.*, 2000).

Um fator inesperado encontrado como obstáculo neste estudo foi a precariedade do preenchimento das fichas epidemiológicas nos hospitais e até mesmo nas Coordenadorias Regionais de Saúde deste estado. Muitas amostras que fazem parte da micoteca do setor de Micologia do LACEN não fizeram parte deste estudo por não possuírem fichas epidemiológicas, enquanto as fichas que foram utilizadas neste trabalho estavam, em sua maioria, preenchidas de forma incompleta. Essa deficiência pode ser observada nas tabelas, que mostraram um n diferente para cada característica analisada ao invés do n de 126 pacientes com meningite criptocócica e 220 indivíduos do grupo controle. Mesmo assim, os resultados obtidos em nosso estudo acrescentam informações importantes sobre a epidemiologia da doença no estado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEGG, M. A.; CELLA, F. L.; FAGANELLO, J.; VALENTE, P. SHRANK, A. & VAINSTEIN, M. H. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolated from the excreta os Psittaciformes in a Southern Brazilian Zoological Garden. *Mycopathologia*, 2006; 161:83-91, 2006.

AOKI, F. H.; AMAI, T. TANAKA, R.; MIKAMI, Y.; TAGUCHI, H.; NISHIMURA, M. F.; NISHIMURA, K.; MIYAJI, M.; SCHREIBER, A. Z. & BRANCHINI, M. L. New primer pairsspecific for *Cryptococcus neoformans* serotype A or B prepared on the basis of random amplified polymorfic DNA fingerprinting pattern analyses. *J Clin Microbiol*, 37:315-320, 1999.

ARISTIZABAL, B. H.; CLEMONS, K. V.; STEVENS, D. A. & RESTREPO, A. Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: in vivo inhibition in females. *Infect immun*, 66(11):5587-5591, 1998.

AWASTHI, M.; PATANKAR, T.; SHAH, P.; CASTILLO, M. Cerebral cryptococcosis: atypical appearances on CT. *Br J Radiol*, 74:83-85, 2001.

BIALEK, R.; WEISS, M.; BEKURE-NEMARIAM, K.; NAJVAR, L. K.; ALBERDI, M. B.; GRAYBILL, J. R. & REISCHL, U. Detection of *Cryptococcus neoformans* DNA in Tissue Samples by Nested and Real-Time PCR Assays. *Clin Diagn Lab Immunol*, 9:461-469, 2002.

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

BOLANO, A.; STINCHI, S.; PREZIOZI, R.; BALDELLI, F.; MARTINI, A. & CARDINALI, G.; Rapid methods to extract DNA and RNA *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Yeast Res*, 1:221-224, 2001.

BORGES-WALMSLEY, M. I.; CHEN, D.; SHU, X. & WALMSLEY, A. R. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Trends microbiol*, 10(2):80-87, 2002.

BULMER, G. S. & SANS, M. D. *Cryptococcus neoformans* II. Phagocytosis by Human Leukocytes. *J Bacteriol*, 94:1480-1483, 1967b.

BULMER, G. S.; SANS, M. D. & GUNN, C. M. *Cryptococcus neoformans* I. Nonencapsulated Mutants. *J. Bacteriol.*, 94:1475-1479, 1967a.

CANELO, C.; NAVARRO, A.; GUEVARA, M.; URCIA, F.; ZURITA, S. & CASQUERO, J. Determinación de la Variedad de Cepas de *Cryptococcus neoformans* Aisladas de Pacientes con SIDA. *Rev Med Exp*, XV (1-2), 1999.

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

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

CHANG, Y. C. & KWON-CHUNG, K. J. Isolation, Characterization, and Localization of a Capsule-Associated Gene, *CAP10*, of *Cryptococcus neoformans*. *J Bacteriol*, 181(18):5636-5643, 1999.

CHANG, Y. C. & KWON-CHUNG, K.J. Isolation of the Third Capsule-Associated Gene, *CAP60*, Required for Virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*, 66(5):2230-2236, 1998.

CHANG, Y. C.; PENOYER, L. A. & KWON-CHUNG, K. J. The Second Capsule Gene of *Cryptococcus neoformans*, *CAP64*, Is Essential for Virulence. *Infect Immun*, 64(6):1977-1983, 1996.

CHANG, Y. C.; WICKES, B. L. & KWON-CHUNG, K. J. Further analysis of the CAP59 locus of *Cryptococcus neoformans*: structure defined by forced expression and description of a new ribosomal protein-encoding gene. *GENE*, 167(1-2):179-183, 1995.

CHATUVERDI, S.; DYAVAIAH, M.; LARSEN, R. A. & CHATUVERDI, V. *Cryptococcus gattii* in AIDS Patients, Soutern California. *Emerg Infect Dis*, 11(11):1686-1692, 2005.

CHEN, S. C. A.; BROWNLEE, A. G.; SORRELL, T. C.; RUMA, P.; ELLIS, D. H.; PFEIFFER, T.; SPEED, B. R. & NIMMO, G. Identification by Random Amplification of Polymorphic DNA of a Common Molecular Type of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in Patients with AIDS or Other Immunosuppressive Conditions. *The J Infect Dis*, 173: 754-8, 1996.

CHEN, S. C. A.; WRIGHT, L. C.; SANTANGELO, R. T.; MULLER, M.; MORAN, V. R.; KUCHEL, P. W. & SORRELL, T. C. Identification of extracellular phospholipase B, lysophospholipase and acyltransferase produced by *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*, 65:405-411, 1997b.

CHEN, S. C.; MULLER, M.; ZHOU, J. Z.; WRIGHT, L. C. & SORRELL, T. C. Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*: a new virulence factor? *J Infect Dis*, 175(2):414-420, 1997a.

CHEN, S.; SORRELL, T.; NIMMO, G.; SPEED, B.; CURRIE, B.; ELLIS, D.; MARRIOTT, D.; PFEIFFER, T.; PARR, D.; BYTH, K. & AUSTRALASIAN CRYPTOCOCCAL STUDY GROUP. Epidemiology and Host- and Variety-Dependent Characteristics of Infection Due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zealand. *Clinical Infectious Diseases*, 2003; 31:499-508.

COX, G. M.; MCDADE, H. C.; CHEN, S. C. A.; TUCKER, S. C.; GOTTFREDSSON, M.; WRIGHT, L. C.; SORRELL, T. C.; LEIDICH, S. D.; CASADEVALL, A.; GHANNOUM, M. A. & PERFECT, J. R. Extracellular

phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol*, 39(1):166-175, 2001.

COX, G. M.; MUKHERJEE, J.; COLE, G. T.; CASADEVALL, A. & PERFECT, J. R. Urease as a Virulence Factor in Experimental Cryptococcosis. *Infect Immun*, 68(2): 443-448, 2000.

CURTIS, P. H.; HALLER, J. A. & DE JUAN, E. An unusual case of cryptococcal endophthalmitis. *Retina*, 15:300-304, 1995.

DARZÉ, C.; LUCENA, R.; GOMES, I. & MELO, A. Características clínicas e laboratoriais de 104 casos de meningoencefalite criptocócica. *Rev Soc Bras Med Trop*, 33(1):21-26, 2000.

DE BEDOUT, C.; ORDÓNEZ, N.; GÓMEZ, L. B.; RODRÍGUEZ, M. C.; ARANGO, M.; RESTREPO, A. & CASTAÑEDA, E. In vitro antifungal susceptibility of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *Rev Iberoam Micol*, 16:36-39, 1999.

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

DENNING, D. W.; STEVENS, D. A. & HAMILTON, J. R. Comparison of *Guizotia abyssinica* Seed Extract (Birdseed) Agar with Conventional Media for Selective Identification of *Cryptococcus neoformans* in Patients with Acquired Immunodeficiency Syndrome. *J Clin Microbiol*, 28(11):2565-2567, 1990.

DIAZ, M. R.; BOEKHOUT, T.; THEELEN, B. & FELL, J. W. Molecular sequence analyses of the intergenic spacer (IGS) associated with rDNA of the two varieties of the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *System Appl Microbiol*, 23:535-545, 2000.

DROMER, F.; MATHOULIN-PÉLISSIER, S.; FONTANET, A.; RONIN, O.; DUPONT, B. & LORTHOLARY, O. Epidemiology of HIV-associated cryptococcosis in France (1985-2001): comparison of the pre- and post-HAART eras. *AIDS*, 18(3):555-562, 2004.

DROMER, F.; MOULIGNIER, A.; DUPONT, B. GUEHO, E. BAUDRIMONT, M.; IMPROVISI, L.; PROVOST, F. & GONZALEZ-CANALI, G. Myeloradiculitis due to *Cryptococcus curvatus* in AIDS. *AIDS*, 9(4):395-6, 1995.

EI-SERAG, H. B.; ANAND, B.; RICHARDSON, P. & RABENECK, L. Association between hepatitis C infection and other infectious diseases: a case for targeted screening? *Am J Gastroenterol*, 98:167, 2003.

ESPOSTO, M. C.; COGLIATI, M.; TORTORANO, A. M. & VIVIANE, M. A. Determination of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* mating type by multiplex PCR. *Clin Microbiol Infect*, 10 (12):1092-1094, 2004.

FAGANELLO, J.; ARRUDA, W.; SCHRANK, A & VAINSTEIN, M. H. An alternative method to prepare samples of the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans* for scanning electron microscopy analysis. *J Microbiol Methods*,64(3):416-419, 2006.

FAN, M.; CURIE, B. P.; GUTELL, R. R.; RAGAN, M. A. & CASADEVALL, A. The 16S-like, 5.8S and 23S-like rRNAs of the two varieties of *Cryptococcus neoformans*: sequence, secondary structure, phylogenetic analysis and restriction fragment polymorphisms. *J Med Vet Mycol*, 32:163-180, 1994.

FONTANA, M. H.; COUTINHO, M. F.; CAMARGO, E. S.; SOVIERO, B.; LIMA, S. S.; MATUSIAK, R. & DIAS, C. G. Neurocryptococcosis in childhood. Report of 3 cases in the 1st decade of life. *Arq Neuropsiquiatr*, 45(4): 403-411, 1987.

FRANZOT, S. P.; FRIES, B. C.; CLEARE, W. & CASADEVALL, A. Genetic Relationship between *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* Strains of Serotypes A and D. *J Clin Microbiol* 1998, 36(8):2200-2204.

FRANZOT, S. P.; SALKIN, I. F. & CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: Separate Varietal Status for *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* Serotype A Isolates. *J Clin Microbiol*, 37(3):838-840, 1999.

FRASER, J. A.; GILES, S. S.; WENINK, E. C.; GEUNES-BOYER, S. G.; WRIGHT, J. R.; DIEZMANN, S.; ALLEN, A.; STAJICH, J. E.; DIETRICH, F. E.; PERFECT, J. R. & HEITMAN, J. Same-sex mating and origin of the Vancouver Island *Cryptococcus gattii* outbreak. *Nature*, 437:1360-1364, 2005.

FRIEDMAN, G. D.; FESSEL, W. J.; UDALSOVA, N. V. & HURLEY, L. B. Cryptococcosis: the 1981-2000 epidemic. *Mycoses*, 48:122-125, 2005.

FRIES, B. C.; GOLDMAN, D. L.; CHERNIAK, R.; JU, R. & CASADEVALL, A. Phenotypic Switching in *Cryptococcus neoformans* Results in Changes in Cellular Morphology and Glucuronoxylomannan Structure. *Infect Immun*, 67(11):6076-6083, 1999.

FRIES, B. C.; TABORDA, C. P.; SERFASS, E. & CASADEVALL, A. Phenotypic Switching of *Cryptococcus neoformans* occurs in vivo and influences the outcome of infection. *J Clin Invest*, 108(11):1639-48, 2001.

GANENDREN, R.; CARTER, E.; SORRELL, T.; WIDMER, F. & WRIGHT, L. Phospholipase B activity enhances adhesion of *Cryptococcus neoformans* to a human lung epithelial cell line. *Microbes Infect*, 2006 (*in press*).

GLUCK J. L.; MVERS, J.P. & PASS, L.M. Cryptococcemia due to *Cryptococcus albidus*. *South Med J*, 80(4):511-513, 1987.

GORDON, M. A. Pulmonary cryptococcosis. A case due to *Cryptococcus albidus*. *Am Rev Respir Dis*, 106(5):786-7, 1972.

HAIJEH, R. A.; CONN, L. A.; STEPHENS, D. S.; BAUGHMAN, W.; HAMILL, R.; GRAVISS, E.; PAPPAS, P. G.; THOMAS, C.; REINGOLD, A.; ROTHROCK, G.; RUTWAGNER, L. C.; SCHUCHAT, A.; BRANDT, M. E.; PINNER, R. W. & CRYPTOCOCCAL ACTIVE SURVEILLANCE GROUP. Cryptococcosis: Population-Based Multistate Active Surveillance and Risk Factors in Human Immunodeficiency Virus-Infected Persons. *J Infect Dis*, 179:449-454, 1999.

HOANG, L. M. N.; MAGUIRE, J. A.; DOYLE, P.; FYFE, M. & ROSCOE, D. L. *Cryptococcus neoformans* infections at Vancouver Hospital Sciences Centre (1997-2002): epidemiology, microbiology and histopathology. *J Med Microbiol*, 53:935-940, 2004.

HOROWITZ, I. D.; BLUMBERG, E. A. & KREVOLIN, L.. *Cryptococcus albidus* and mucormycosis empyema in a patient receiving hemodialysis. *South Med J*, 86(9):1070-1072, 1993.

HORTA, J. A.; STAATS, C. C.; CASALI, A. K.; RIBEIRO, A. M.; SCHRANK, I. S.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Epidemiological aspects of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. *Med Mycol*, 40:565-571, 2002.

HULL, C. M. & HEITMAN, J. Genetics of *Cryptococcus neoformans*. *Annu Rev Genet*, 36:557-615, 2002.

IDNURM, A.; BAHN, Y. S. NIELSEN, K.; LIN, X.; FRASER, J. A. & HEITMAN, J. Deciphering the Model Pathogenic Fungus *Cryptococcus neoformans*. *Nat Rev Microbiol*, 3:753-764, 2005.

IKEDA, R. NISHIKAWA, A. SHINODA, T. & FUKASAWA, Y. Chemical characterization of polysaccharide from *Cryptococcus neoformans* serotype A-D. *Microbiol Immunol*, 29(10):981-991, 1985.

JACOBSON, E. S. Pathogenic Roles for Fungal Melanins. *Clin Microbiol Rev*, 13(4):708-717, 2000.

JENNEY, A.; PANDITHAGE, K.; FISHER, D. A. & CURRIE, B. J. *Cryptococcus* Infection in Tropical Australia. *J. Clin. Microbiol*, 2004; 42(8):3865-3868.

KABASAWA, K.; ITAGAKI, H.; IKEDA, R.; SHINODA, T.; KAGAYA, K. & FUKASAWA, Y. Evaluation of a New Method for Identification of *Cryptococcus neoformans* which Uses Serologic Tests Aided by Selected Biological Tests. *J. Clin. Microbiol.*, Dec. 29 (12):2873-2876, 1991.

KHAN, Z. U.; AL-ALNEZI, A. A.; CHANDY, R. & XU, J. Disseminated cryptococcosis in an AIDS patient caused by a canavanine-resistant strain of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*. *J Med Microbiol*, 2002:271-275, 2003.

KIDD, S. E.; HAGEN, F.; TSCHARKE, R. L.; HUYNH, M.; BARLETT, K. H.; FYFE, M.; MACDOUGALL, L.; BOEKHOUT, T.; KWON-CHUNG, K. J. & MEYER, W. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *Proc Natl Acad Sci USA*, 101 (49):17258-17263, 2004.

KIERTIBURANAKUL, S.; WIROJTANANUGOON, S.; PRACHARKTAM, R. & SUNGKANUPARPH, S. Cryptococcosis in human immunodeficiency virus-negative patients. *Int J Infect Dis*, 10:72-78, 2006.

KOZEL, T. R. Virulence factors of *Cryptococcus neoformans*. *Trends in Microbiology*, 3(8):295-298, 1995.

KRUMHOLZ, R. A. Pulmonary cryptococcosis. A case due to *Cryptococcus albidus*. *Am Rev Respir Dis*, 105(3):421-424, 1972.

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

KWON-CHUNG, K. J. A new species of *Filobasidiella*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans* B and C serotypes. *Mycologia*, 68:942-946, 1976.

KWON-CHUNG, K. J.; BOEKHOUT, T.; FELL, J. W. & DIAZ, M. Proposal to conserve the name *Cryptococcus gatti* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus*. *Taxon*, 51: 804-806, 2002.

KWON-CHUNG, K. J.; POLACHEK, I. & BENNETT, J. Improved Diagnostic Medium for Separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (Serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (Serotypes B and C). *J Clin Microbiol*, 15 (3):535-537, 1982.

KWON-CHUNG, K. J.; SORRELL, T. C.; DROMER, F.; FUNG, E. & LEVITZ, S. M. Cryptococcosis: clinical and biological aspects. *Med Mycol*, 38:205-213, 2000.

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

LANGFELDER, K. ; STREIBEL, M.; JAHN, B. HAASE, G. & BRAKHAGE A. A. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genet Biol*, 38:143-158, 2003.

LI, Y. L.; LEAW, S. N.; CHEN, J. H.; CHANG, H. C. & CHANG, T. C. Rapid Identification of Yeasts Commonly Found in Positive Blood Cultures by Amplification of the Internal Transcribed Spacer Regions 1 and 2. *J Clin Microbiol Infect Dis*, 22:693-696, 2003.

LIU, L.; TEWARI, R. P. & WILLIAMSON, P. R. Laccase protects *Cryptococcus neoformans* from antifungal activity of alveolar macrophages. *Infect Immun*, 67(11):6034-6039, 1999.

LOFTUS, B. J.; FUNG, E.; RONCAGLIA, P.; ROWLEY, D.; AMADEO, P.; BRUNO, D.; VAMATHEVAN, J.; MIRANDA, M.; ANDERSON, I. J.; FRASER, J. A.; ALLEN, J. E.; BOSDET, I. E.; BRENT, M. R.; CHIU, R.; DOERING, T. L.; DONLIN, M. J.; D'SOUZA, C. A.; FOX, D. S.; GRINBERG, V.; FU, J.; FUKUSHIMA, M.; HAAS, B. J.; HUANG, J. C.; JAMBON, G.; JONES, S. J. M.; KOO, H. L.; KRZYWINSKI, M. I.; KWON-CHUNG, J. K.; LENGELER, K. B.; MAITI, R.; MARRA, M. A.; MARRA, R. E.; MATHEWSON, C. A.; MITCHELL, T. G.; PERTEA, M.; RIGGS, F. R.; SALZBERG, S. L.; SCHEIN, J. E.; SHVARTSBEYN, A.; SHIN, H.; SHUMWAY, M.; SPECHT, C. A.; SUH, B. B.; TENNEY, A.; UTTERBACK, T. R.; WICKES, B. L.; WORTMAN, J. R.; WYE, N. H.; KRONSTAD, J. W.; LODGE, J. K.; HEITMAN, J.; DAVIS, R. W.; FRASER, C. & HYMAN, R. W. The Genome of the Basidiomycetous Yeast and Human Pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Science*, 307:1321-1324, 2005.

LOPES, J. O.; COSTA, J. M.; STREHER, L. A.; CLOCK, C.; PINTO, M.S. & ALVES, S. H. Criptococose não associada à AIDS no Rio Grande do Sul: relato de oito casos e revisão da literatura Sul-Riograndense. *Rev Soc Bras Med Trop*, 30(5):369-372, 1997.

LORTHOLARY, O.; IMPROVISI, L.; FITTING, C., CAVAILLON, M. & DROMER, F. Influence of gender and age on course of infection and cytokine responses im mice

with disseminated *Cryptococcus neoformans* infection. *Clin Microbiol Infect*, 8:31-37, 2002.

MARTINEZ, L. R.; GARCIA-RIVERA, J. & CASADEVALL A. *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (Serotype D) Strains Are More Susceptible to Heat than *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (Serotype A) Strains. *J Clin Microbiol*, 39(9):3365-3367, 2001.

MCFADDEN, D. C. & CASADEVALL, A. Capsule and melanin synthesis in *Cryptococcus neoformans*. *Med Mycol*, 39:19-30, 2001.

MENEZES, E. A.; MONTEIRO, M. N. R.; ANGELO, M. R. F.; SANTOS, C. D.; FREIRIE, C. C. F. & CUNHA, F. A. *Cryptococcus neoformans* causing meningitis in AIDS patients. *Rev Soc Bras Med Trop*, 35(5):537-539, 2002.

MEYER, W.; CASTAÑEDA, A.; JACKSON, S.; HUYNH, M.; CASTAÑEDA, E. & IBEROAMERICAN CRYPTOCOCCAL STUDY GROUP. Molecular Typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerg Infect Dis*, 9(2):189-195, 2003.

MEYER, W.; MARSZEWSKA, K.; AMIRMOSTOFIAN, M.; IGREJA, R. P.; HARDTKE, C.; METHLING, K.; VIVIANI, M. A.; CHINDAMPORN, A.; SUKROONGREUNG, S.; JOHN, M. A.; ELLIS, D. H & SORRELL, T. C. Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic

DNA, a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. *Electrophoresis*, 20: 1790-1799, 1999.

MILLOGO, A.; KI-ZERBO, G. A.; ANDONABA, J. B.; LANKOANDE, D.; SAWADOGO, A.; YAMEOGO, I. & SAWADOGO, A. B. Cryptococcal meningitis in HIV-infected patients at Bobo-Dioulasso hospital (Burkina Faso). *Bull Soc Pathol Exot*, 97(2):119-21, 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Programa nacional de doenças sexualmente transmissíveis, Brasília. Brasil Bol Epidemiol AIDS. Ano I (01):44, 1999.

MIRZA, S. A.; PHELAN, M.; RIMLAND, D.; GRAVISS, E.; HAMILL, R.; BRANDT, M. E.; GARDNER, T.; SATTAH, M.; DE LEON, G. P.; BAUGHMAN, W. & HAJJEH, R. A. The Changing Epidemiology of Cryptococcosis: An Update from Population-Based Active Surveillance in 2 Large Metropolitan Areas, 1992-2000. *Clin Infect Dis*, 36:789-794, 2003.

MITCHELL, T. G. & PERFECT, J. R. Cryptococcosis in the era of AIDS - 100 years after discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Rev Clin Microbiol*, 515-548, 1995.

MUÑOZ, C. A. J.; TUR, C.; ESTIVILL, D.; MONTSANT, L.; CARCELLER, A.; HERNADEZ-MOLINA, J. M. & TORRES-RODRIGUEZ, J. M. Resistencia in vitro al fluconazol e itraconazol en aislamientos clínicos de *Candida* spp y *Cryptococcus neoformans*. *Rev Iberoam Micol*, 14:50-54, 1997.

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

NAKAMURA, Y.; KANO, R.; WATANABE, Y. & HASEGAWA, S. Molecular analysis of CAP59 gene sequences from five serotypes of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol*, 38(3):992-5, 2000.

NAMIQ, A. L.; TOLLEFSON, T. & FAN, F. Cryptococcal parotitis presenting as a cystic parotid mass: Report of a case diagnosed by fine-needle aspiration cytology. *Diagn Cytopathol*, 33(1):36-8, 2005.

NISHIKAWA, M. M.; LAZERA, M. S.; BARBOSA, G. G.; TRILLES, L.; BALASSIANO, B. R.; MACEDO, R. C. L.; BEZERRA, C. C. F.; PÉREZ, M. A.; CARDARELLI, P. & WANKE, B. Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Brazil: Analysis of Host and Regional Patterns. *J Clin Microbiol*, 41: 73-77, 2002.

PINI, G.; FAGGI, E.; CAMPISI, E. & GARGANI, G.34. Typing of *Cryptococcus neoformans* Strains by Random PCR. *J Mycol Méd*, 8:7-12, 1998.

RAPELLI, P.; ARE, R.; CASU, G.; FIORI, P. L.; CAPPUCINELLI, P. & ACETI, A. Developmente os a Nested PCR for Detection of *Cryptococcus neoformans* in Cerebrospinal Fluid. *J. Clin. Microbiol.*, 36:3438-3440, 1998.

REY, M. C. W.; LEIRIA, T. L. L.; ANSEMI, C. E.; FLORES, A.; MEZZARI, A.; WIEBBELLING, A. P. & ANTUNES, H.B. *Cryptococcus neoformans*: Epidemiologia, microbiologia, clínica e terapêutica. *Pesqui. Med*, 33(1)-33(2):61-67, 1999.

RODRIGUES, M. L.; ALVIANO, C. S. & TRAVASSOS, L. R. Pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*: virulence factors and immunological mechanisms. *Microbes infect*, 1:293-301, 1999.

SEVERO, L. C.; OLIVEIRA, F. M. \$ SILVA, V. B. Diferenças clínicas, epidemiológicas e ecológicas entre as duas variedades de *Cryptococcus neoformans*. *Rev Médica Sta Casa Porto Alegre*, 9 (16):1672-1686, 1998.

SEVERO, L. C.; OLIVEIRA, F. M. & LONDERO, A. T. Cryptococcosis due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Brazilian patients with AIDS. Report of three cases. *Rev Iberoam Micol*, 16:152-154, 1999.

SORRELL, T. C. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. *Med Mycol*, 39:155-168, 2001.

STEENBERGEN, J. N. & CASADEVALL, A. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Microbes Infect*, 5:667-675, 2003.

SUGIURA, Y.; HOMMA, M. & YAMAMOTO, T. Difficulty in diagnosing chronic meningitis caused by capsule-deficient *Cryptococcus neoformans*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 76:1460-1461, 2005.

TANAKA, E.; ITO-KUWA, S.; NAKAMURA, K.; AOKI, S.; VIDOTTO, V. & ITO, M. Comparisons of the Laccase Gene among Serotypes and Melanin-Deficient Variants of *Cryptococcus neoformans*. *Microbiol. Immunol.*, 49 (3):209-217, 2005.

TENNEY, A. E.; BROWN, R. H.; VASKE, C.; LODGE, J. K.; DOERING, T. L. & BRENT, M. R. Gene prediction and verification in a compact genome with numerous small introns. *Genome Res*, 14:2330-2335, 2004.

TINTELNOT, K.; LEMMER, K.; LOSERT, H.; SCHÄR, G. & POLAK, A. Follow-up of epidemiological data of cryptococcosis in Austria, Germany and Switzerland with special focus on the characterization of clinical isolates. *Mycoses*, 47:455-464, 2004.

TRILLES, L.; FÉRNANDEZ-TORRES, B.; LAZÉRA, M. R.; WANKE, B. & GUARRO, J. In Vitro Antifungal Susceptibility of *Cryptococcus gattii*. *J Clin Microbiol*, 42(10):4815-4817, 2004.

TUCKER, S. C. & CASADEVALL, A. Replication of *Cryptococcus neoformans* in macrophages is accompanied by phagosomal permeabilization and accumulation of vesicles containing polysaccharide in the cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(5):3165-3170, 2002.

VILCHEZ, R. A.; FUNG, J. & KUSNE, S. Cryptococcosis in organ transplant recipients: an overview. *Am J Transplant*, 2: 575-580, 2002.

WILLIAMSON, P. R. Laccase and melanin in the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *Front Biosci*, 2:e99-107, 1997.

ZARAGOZA, O.; FRIES, B. C. & CASADEVALL, A. Induction of Capsule Growth in *Cryptococcus neoformans* by Mammalian Serum and CO₂. *Infect Immun*, 71(11):6155-6164, 2003.

ZHANG, D.; YANG, Y.; CASTLEBURY, L. A. & CERNIGLIA, C. E. A method for the large scale isolation of high transformation. *FEMS microbiol lett*, 145(2): 261-265, 1996.