

Lílian Stefani Barboza

**“ESTUDO MICROBIOLÓGICO: AMOSTRAGEM DE
Cryptococcus sp EM SÃO JOSÉ DO RIO PRETO/SP ”**

São José do Rio Preto

2011

Lílian Stefani Barboza

**“ESTUDO MICROBIOLÓGICO: AMOSTRAGEM DE
Cryptococcus sp EM SÃO JOSÉ DO RIO PRETO/SP ”**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Área de Concentração – Biologia e Fisiologia de Microrganismos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

**São José do Rio Preto
2011**

Barboza, Lílian Stefani

Estudo microbiológico: amostragem de *Cryptococcus* sp em São José do Rio Preto/SP"/ Lílian Stefani Barboza. - São José do Rio Preto: [s.n.], 2011.

71 f.: il. 6 ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Micologia médica. 2. Fungos patogênicos. 3. *Cryptococcus neoformans*. 4. *Cryptococcus gattii*. 5. AIDS (Doença). I. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 616-022.1

Lílian Stefani Barboza

**“ESTUDO MICROBIOLÓGICO: AMOSTRAGEM DE
Cryptococcus sp EM SÃO JOSÉ DO RIO PRETO/SP ”**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Área de Concentração – Biologia e Fisiologia de Microrganismos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. JOÃO CLAUDIO THOMEO (UNESP/SJRP)
(Presidente)

Prof^a. Dr^a. DANIELA A. BOCCHINI MARTINS
(UNESP/ARARAQUARA)
1^o Examinador

Prof^a. Dr^a TATIANE IEMBO (UNIV. PAULISTA/SJRP)
2^o Examinador

São José do Rio Preto, 11 de abril de 2011.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade e pela força incrível que me foi dada nessa difícil jornada e por não me deixar desistir em nenhum momento, pois foi um caminho com muitas pedras. Por me fazer acreditar na minha capacidade, apesar de tudo e de algumas pessoas que infelizmente passaram pela minha vida. Estou aqui hoje mostrando do que sou capaz, dizendo a todos que venha o que vier, batalharei sempre, dizendo obrigada Senhor porque eu VENCI.

Aos meus pais Sandra e Adair pelo incentivo, principalmente a minha mãe pela compreensão nas horas de desabafo e nervosismo.

À minha irmã Larissa pela ajuda nas coletas e apoio.

Ao meu namorado querido Celson Elias Jr. por me ajudar e sempre estar ao meu lado.

Às minhas queridas amigas que conquistei durante esses anos e que amo muito, Tatiana Colombo, colega de mestrado e a técnica do laboratório de microbiologia Luceli Souza. Obrigada a vocês duas, pela ajuda durante a prática laboratorial e também como ombros amigos que muito precisei. Amo vocês demais!

À minha amiga de trabalho Patrícia Campos por me ouvir e me apoiar.

À Prof.^a Dr.^a Luciane Storti-Melo, amiga e companheira de trabalho pela revisão final no texto.

À Vigilância Epidemiológica de São José do Rio Preto, ao supervisor Sigmar Souza, à coordenadora Amena Alcântara e à diretora Dr.^a Maria Rita Cury pelo auxílio nas coletas.

Às instituições IBILCE- Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto e FAMERP- Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto.

“A pedra colocada em disciplina é o agente que te assegura firmeza na construção”. (Emmanuel)

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xi
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	2
1.1 Definições e histórico.....	2
1.2 Criptococose e AIDS.....	3
1.3 Gênero <i>Cryptococcus</i>	5
1.3.1 Ciclo reprodutivo.....	5
1.3.2 Caracterização micológica.....	6
1.3.3 Patogenia.....	9
1.3.4 Eco-epidemiologia.....	10
1.3.5 <i>Cryptococcus neoformans</i>	10
1.3.6 <i>Cryptococcus gattii</i>	12
1.3.7 Outras espécies.....	13
1.3.8 Virulência.....	14
1.3.9 Diagnóstico laboratorial.....	16
1.3.10 Aspectos clínicos.....	17
1.3.11 Tratamento.....	18
1.3.11.1 Anfotericina B.....	19
1.3.11.2 Fluconazol.....	19
1.3.11.3 Itraconazol.....	20
1.3.11.4 5-Fluorocitosina.....	20
1.3.11.5 Resistência às drogas.....	20
1.3.12 Avaliação da susceptibilidade antimicrobiana.....	21
2. JUSTIFICATIVA.....	23
3. OBJETIVOS.....	24

3.1	Objetivo geral.....	25
3.2	Objetivos específicos.....	25
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1	Origem das amostras clínicas.....	27
4.2	Origem dos isolados ambientais.....	27
4.3	Caracterização morfológica e bioquímica.....	28
4.3.1	Caracterização morfológica.....	28
4.3.2	Provas bioquímicas.....	28
4.3.3	Hidrólise da ureia.....	28
4.3.4	Assimilação de carboidratos.....	29
4.3.5	Assimilação de nitrogênio.....	30
4.3.6	Cultivo em agar CGB.....	30
4.4	Teste de suscetibilidade antifúngica.....	30
5.	RESULTADOS.....	33
5.1	Caracterização amostras clínicas.....	34
5.2	Caracterização amostras ambientais.....	34
5.3	Perfis de suscetibilidade.....	34
5.3.1	Suscetibilidade amostras clínicas.....	35
5.3.2	Suscetibilidade amostras ambientais.....	35
6.	DISCUSSÃO.....	37
7.	CONCLUSÃO.....	43
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
	ANEXO.....	71

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Representação esquemática do ciclo reprodutivo (sexuada/assexuada) de <i>Cryptococcus neoformans</i> ...	6
Figura 2	Teste da urease (rosa) mostrando positividade para o gênero <i>Cryptococcus</i> sp.....	7
Figura 3	Aspecto macroscópico de colônias de <i>C. neoformans</i> e <i>C.gattii</i> em meio Níger.....	8
Figura 4	Meio CGB, diferenciando <i>C. neoformans</i> (verde) de <i>C. gattii</i> (azul-cobalto).....	8
Figura 5	Técnica da tinta da China, mostrando a formação do halo ao redor da cápsula que repele a tinta.....	16
Figura 6	Técnica de auxanograma mostrando positividade em assimilação de açúcar através da formação do halo em torno do mesmo.....	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição dos valores de CIMs e perfis de suscetibilidade de isolados clínicos de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> frente a 5-FC; FZ; IZ e Anfo B.....	36
Tabela 2	Distribuição dos valores de CIMs e perfis de suscetibilidade de isolados ambientais de <i>C. albidus</i> e <i>C. laurentii</i> frente a 5-FC; FZ; IZ e Anfo B.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
Anfo B	Anfotericina B
ABCD	Anfotericina B dispersão coloidal
ABLC	Anfotericina B lipossomal complexo lipídico
AmBisome	Anfotericina B lipossomal
ATCC	American Type Collection Culture
BHI	Infusão cérebro-coração
CDC	Center of Disease Control
CIM	Concentração inibitória mínima
CGB	Cavanina-glicina-bromotimol
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
CNRE-1	Elementos Repetitivos de <i>Cryptococcus neoformans</i> -1
CO ₂	Dióxido de carbono
DMSO	Dimetilsufóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DST	Doenças sexualmente transmissíveis
ELISA	Imunoensaio Enzimático (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>)
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FCZ	Fluconazol
5-FC	5-fluorocitosina
g	Gramma
h	Hora
HE	Hematoxilina-eosina
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
ICZ	Itraconazol
IgG	Imunoglobulina G
Kg	Kilograma

KNO ₃	Nitrato de potássio
LCR	Líquido cefaloraquidiano; líquor
M	Molar
mg	Miligrama
mm	Milímetro
m	Metro
MAT	Tipos de reação sexual - <i>mating types</i>
mL	Mililitro
MOPS	Ácido 3[N-morfolino] propoanossulfônico
nm	Nanômetro
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
PCR	Reação da Polimerase em Cadeia (do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
pH	Potencial hidrogeniônico
RNM	Ressonância nuclear magnética
RFLP	Fragmentos de DNA gerados por enzimas de restrição (<i>Restriction Fragment Length Polymorphisms</i>)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute.
SNC	Sistema nervoso central
spp	Espécies
sp	Espécie
TC	Tomografia computadorizada
UV	Radiação ultravioleta
UFC	Unidade formadora de colônias
µL	Microlitro
µg	Micrograma
°C	Graus Celsius
%	Por cento

RESUMO

A criptococose é uma micose sistêmica que afeta principalmente o sistema nervoso central, causando meningite. Causada pela inalação de propágulos de fungos do gênero *Cryptococcus* sp, *C. neoformans* acomete hospedeiros com imunodepressão celular, cujo maior contingente é representado por indivíduos com AIDS. A fonte principal de aquisição desta levedura são fezes de aves, principalmente pombos (*Columba livia*). *C. gattii* infecta indivíduos aparentemente imunocompetentes, sendo isolado principalmente em espécies de eucaliptos. *C. albidus* e *C. laurentii* aparece em casos de meningites, fungemias, pneumonias, abscessos pulmonares e infecções cutâneas. *C. uniguttulatus* é encontrado no trato gastrointestinal, fezes de pássaros e contaminante de leitões de animais e habitats de roedores. Termo-tolerância, parede celular, cápsula, adesão, e produção de enzimas são fatores importantes de virulência do gênero. São José do Rio Preto é a 5ª cidade entre os 100 municípios do estado de São Paulo em de casos de AIDS. Analisou-se morfológicamente e bioquimicamente 48 amostras clínicas e 155 ambientais. Amostras de líquido resultaram em 30 isolados da espécie *C. neoformans*, 17 de *C. gattii* e um de *C. luteolus*. Foram identificados 26 isolados de *C. albidus*, 22 de *C. laurentii*, 9 de *C. neoformans*, 5 de *C. gattii* e um de *C. uniguttulatus* nas amostras ambientais. A concentração inibitória mínima para antifúngicos foi determinada para todos os isolados por meio do teste de microdiluição em caldo padronizado pelo NCCLS. Os resultados obtidos mostraram resistência à anfotericina B e itraconazol nas cepas clínicas de *C. neoformans* e *C. gattii*, e as cepas de *C. albidus* e *C. laurentii* apresentaram resistência a 5-fluorocitosina, itraconazol e anfotericina B.

Palavras-chaves: Criptococose, Suscetibilidade, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*.

ABSTRACT

Cryptococcosis is a systemic mycosis that mainly affects the central nervous system, causing meningitis. Caused by inhalation of seedlings of fungi of the genus *Cryptococcus* sp, *C. neoformans* affects hosts with immunosuppression cellular, whose largest contingent is represented by individuals with AIDS. The main source of acquiring this yeast is feces of birds, especially pigeons (*Columba livia*). *C. gattii* infects individuals apparently immunocompetent, being isolated mainly in species of eucalyptus. *C. albidus* and *C. laurentii* appear in cases of meningitis, nosocomial fungemia, pneumonia, lung abscesses and skin infections. *C. uniguttulatus* is found in the gastrointestinal tract and feces of birds and contaminant of beds of animals and habitats of rodents. Thermo-tolerance, cell wall, capsule, accession, and production of enzymes are important factors in the virulence of the genus. São José do Rio Preto is the 5th city among the 100 cities in the state of São Paulo in cases of AIDS. We analyzed morphologically and biochemically 48 clinical samples and 155 environmental. Liquor samples resulted in 30 isolates of the species *C. neoformans*, 17 of *C. gattii* and one of *C. luteolus*. We identified 26 isolates of *C. albidus*, 22 of *C. laurentii*, 9 of *C. neoformans*, 5 of *C. gattii* and one of *C. uniguttulatus* in environmental samples. The minimal inhibitory concentration for antifungal agents was determined for all isolates by means of the test of broth microdilution standardized by the NCCLS. The results obtained showed resistance to amphotericin B and itraconazole in clinical strains of *C. neoformans* and *C. gattii*, *C. albidus* and *C. laurentii* exhibited resistance to 5-fluorocytosine, itraconazole and amphotericin B.

Keywords: Cryptococcosis, Susceptibility, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Definições e histórico

Criptococose (torulose, blastomicose européia, doença de Busse-Buschke) é uma micose de natureza sistêmica causada pela inalação de fungos capsulados do complexo *Cryptococcus* spp, provocando principalmente meningoencefalite em indivíduos hígidos. Embora se manifeste como uma doença primária, a maioria de ocorrência é em pacientes imunocomprometidos, como doença oportunista (CASADEVALL e PERFECT, 1998; LACAZ et al., 2002; ALSPAUGHT e PERFECT JR., 2002; LIN X e HEITMAN, 2006; FAVALESSA et al., 2009).

O gênero *Cryptococcus* inclui aproximadamente 39 espécies inseridas no Reino Fungi; Filo Eumycota; Classe Blastomycetes; Família Cryptococcaceae; Gênero *Cryptococcus* (fase anamórfica); Reino Fungi; Filo Basidiomycota; Classe Heterobasidiomycetes; Família Filobasidiacea; Gênero *Filobasidiella* (fase teleomórfica) (KWON-CHUNG e BENNETT, 1992; LACAZ et al., 2002).

Embora *C. albidus*, *C. laurentii*, *C. uniguttulatus*, *C. grubii* e *C. luteolus* estejam envolvidos na criptococose, *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* são as principais espécies responsáveis por esta infecção (KANTARCIOGLU et al., 2007). Podem ser encontradas em diversos ambientes, desde o frio extremo da Antártica, elevações como no Himalaia e água salina (CASADEVALL e PERFECT, 1998; KON et al., 2008).

A criptococose abrange duas formas distintas do ponto de vista clínico e epidemiológico:

- Criptococose oportunista, cosmopolita, associa-se às condições de imunodepressão celular, causada predominantemente por *Cryptococcus neoformans*.
- Criptococose primária ocorre geralmente em hospedeiro aparentemente imunocompetente, endêmica em áreas tropicais e subtropicais, geralmente ocasionada por *Cryptococcus gattii*.

A primeira descrição clínico-patológica e micológica da criptococose humana foi atribuída a Otto Busse e Abraham Buschke, em 1894, que descreveram o caso de uma mulher de 31 anos com uma lesão na tíbia (KNOKE e SCHWESINGER, 1994).

O microrganismo isolado dessa lesão foi cultivado e inicialmente denominado *Saccharomyces hominis*. No mesmo ano, na Itália, Sanfelice isolou leveduras capsuladas a partir de suco de pêssego fermentado, no ano seguinte, foi demonstrada a patogenicidade em animais de laboratório, renomeando a espécie para *Saccharomyces neoformans* (SANFELICE, 1894 citado por CASADEVALL e PERFECT, 1998).

Von Hansemann foi o primeiro a observar o fungo na meninge humana em 1905 e o primeiro diagnóstico reconhecido de meningite criptocócica foi dado por Verse, em 1914. Em 1954, Zimmerman e Rappaport observaram a freqüente associação de criptococose com desordens malignas do sistema linfático (KWON-CHUNG et al., 1992).

No Brasil, os primeiros relatos da criptococose ocorreram nos anos de 1941 e 1944, descritos por Carlos da Silva Lacaz e Floriano de Almeida (PAPPALARDO e MELHEM, 2003), sendo o primeiro caso de neurocriptococose relatado em 1941, na cidade de São José de Rio Preto, São Paulo (REIS-FILHO et al., 1985).

1.2 Criptococose e AIDS

A criptococose é a segunda principal causa micológica entre pacientes portadores de AIDS (80%) (PAPPALARDO e MELHEM, 2003; WILDSTEIN et al., 2005; MARTINS, 2006; PINTO-JÚNIOR et al., 2006; CHAYAKULKEEREE & PERFECT, 2006; NOCERA et al, 2010), com letalidade variando de 10% a 73%, principalmente em países em desenvolvimento (MOREIRA et al., 2006; JARVIS e HARRISON, 2007; PAPPALARDO et al., 2007; RIBEIRO et al., 2009). No Brasil segundo dados do Ministério da Saúde de 2005, de 1980 a 2005, dos 371.827 pacientes acometidos pela AIDS, 10% apresentavam criptococose.

Estudos têm mostrado que 70 a 90% dos pacientes com AIDS e neurocriptococose possuem sinais e sintomas de meningite ou meningoencefalite subaguda, como cefaléia, náusea, vômito, febre, rigidez de nuca, letargia, alterações no estado mental, distúrbio na personalidade, perda de memória, lesões em nervos cranianos, déficits visuais e outros, os quais ocorrem de duas a quatro semanas antes do estabelecimento do diagnóstico (CALVO et al., 1991; ROZENBAUM e GONÇALVES, 1994; MITCHELL e PERFECT, 1995; DARZÉ et al., 2000;

FERNANDES et al., 2000; CASALI et al., 2003; PAPPALARDO e MELHEM, 2003; JARVIS et al., 2007; PAPPALARDO et al., 2007).

De acordo com a Coordenação Nacional de DST/AIDS (MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASIL, 2004), 6 % dos pacientes portadores de HIV positivos são acometidos por infecções causadas por *C. neoformans* e *C. gattii*.

São José do Rio Preto é considerada a 5ª cidade entre os 100 municípios do estado de São Paulo com maior número de casos de AIDS, totalizando 4.110 casos entre 2000 e junho de 2008. Neste período foram registrados 329 casos de vítimas de AIDS acometidas pelo fungo, notificadas pelo Hospital de Base de São José do Rio Preto (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE/MINISTÉRIO DA SAÚDE-DST/AIDS, 2009). Essa condição clínica de imunocomprometimento, aliada à convivência com leveduras do gênero *Cryptococcus* spp vêm trazendo graves consequências, como elevadas taxas de morbidade e mortalidade (FERNANDES et al., 2000; SEVERO et al., 2001; LACAZ et al., 2002; TRILLES et al., 2003).

Nos países desenvolvidos, a mortalidade por criptococose é estimada em 10% chegando a 43% nos países em desenvolvimento (KON et al., 2008). No Brasil, estas porcentagens variam entre 40 a 66% (DARZÉ et al., 2000; PAPPALARDO e MELHEM, 2003; MORETTI et al., 2008; PRADO et al., 2009).

Na Tailândia, entre 1994 e 1998, houve definição da criptococose em 19% dos pacientes portadores do HIV. Na África do Sul, o aumento desta infecção em portadores de HIV provocou uma mudança na epidemiologia das meningites, superando as meningites bacterianas e a tuberculose. A incidência de *C. neoformans* nesses países responde por 20 a 45% dos casos de meningite (BICANIC e HARRISON, 2004). Em regiões pobres do sudeste da Ásia (CHARIYALERTSAK e SIRISANTHANA, 2001; HELBOK e PONGPAKDEE, 2005; KUMARASAMY e VALLABHANENI, 2005) e da África Sub-saariana (HAKIM e GANGAIDZO, 2000; HOLMES e LOSINA, 2003; KOHNO, 2005) as notificações de mortes por meningite criptococócica, causada por *C. neoformans* variam de 10 a 40% dos pacientes com AIDS. O alto custo e a disponibilidade limitada de drogas antifúngicas diminuem o tratamento efetivo nestas áreas, dessa maneira a criptococose permanece endêmica nesses países (WARNOCK, 2006; LIU et al., 2008; LIN, 2009).

1.3 Gênero *Cryptococcus*

1.3.1 Ciclo reprodutivo

Estes fungos apresentam uma ampla variedade de formas, incluindo leveduriforme, clamidósporos, pseudohifas e hifas sob certas condições, porém a forma leveduriforme é a tipicamente presente nas infecções (ALSPAUGH et al., 2000; LIN e HEITMAN, 2006)

O ciclo reprodutivo deste fungo pode ocorrer de forma assexuada e sexuada, porém esta última ainda não foi observada no ambiente, e sim em condições laboratoriais (CASALI et al., 2001; LIN, 2009). A fase sexuada ou teleomórfica apresenta filamentos (hifas dicarióticas) e é denominada *Filobasidiella neoformans* e *F. bacillispora*, correspondente à fase leveduriforme (anamorfa) de *C. neoformans* e *C. gattii* respectivamente (BOEKHOUT et al., 2001; CASALI et al., 2001; TRILLES et al., 2003; KNOW-CHUNG e VARMA, 2006).

A reprodução sexuada (Figura 1) ocorre por meio do cruzamento de dois tipos de alelos sexuais (*mating type*), MAT α e MAT α (CHATURVEDI et al., 2000; LENGELER e FOX, 2002; OHKUSU et al., 2002; TRILLES et al., 2003). Estas células sexuais iniciam a reprodução na ausência de nitrogênio secretando feromônios, que induzem a formação de tubos de conjugação. MAT α e MAT α sofrem divisão nuclear e simultaneamente formação de hifas (NIELSEN & HEITMAN, 2007). Os núcleos das duas células sexuais migram para o interior da hifa, nesta, somente a mitocôndria da célula MAT α é captada, ocorrendo desintegração da mitocôndria da célula MAT α . A partir desta hifa desenvolvem-se basídios terminais, globosos ou sub-clavados, onde ocorre o processo de cariogamia seguido de sucessivas mitoses e meioses, produzindo os basidiósporos, que por sua vez podem se diferenciar e gerar células leveduriformes (LENGELER e FOX, 2002; McCLELLAND et al., 2004).

Já a reprodução assexuada ocorre por meio de brotamentos (CASADEVALL & PERFECT, 1998).

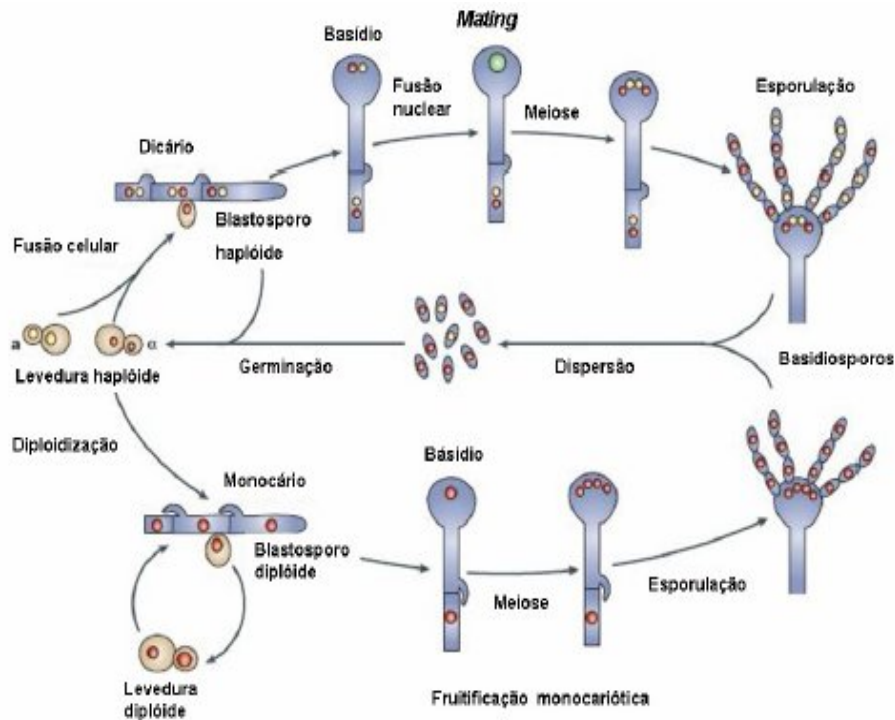


Figura 1. Representação esquemática do ciclo reprodutivo (sexuada/assexuada) de *Cryptococcus neoformans*. Adaptado de IDNURM et al., 2005.

1.3.2 Caracterização micológica

As espécies do gênero *Cryptococcus* são caracterizadas como leveduras capsuladas. Sua célula de forma globosa ou ovalada varia de 3 a 10µm de diâmetro, exibindo brotamentos únicos ou múltiplos. Apresentam-se como colônias de cor branca a creme, brilhante, de textura mucoide, sendo o grau de mucosidade da colônia dependente da formação da cápsula mucopolissacarídea, margem lisa e inteira. Desenvolvem-se entre 36 a 72 horas. (MITCHELL e PERFECT, 1995; PERFECT e CASADEVALL, 2002).

Todas as espécies de *Cryptococcus* são não-fermentadoras, hidrolisam amido, assimilam inositol e produzem urease. Esta é uma metaloenzima que hidrolisa uréia em amônia e carbamato, podendo aumentar o pH do meio. A positividade da hidrólise da uréia é dada pela mudança da coloração do meio Agar, de amarelo para rosa intenso (Figura 2), variando de 24 a 48h de incubação à 30°C (COX et al., 2000; LACAZ et al., 2002; SIDRIN & ROCHA, 2004).



Figura 2. Teste da urease (rosa) mostrando positividade para o gênero *Cryptococcus* (acervo pessoal).

As espécies de *Cryptococcus* crescem bem em vários meios de cultivos que não contenham ciclo-heximida: Agar-sangue, Agar-Sabouraud, Agar BHI (infusão de cérebro-coração) e Agar Níger (*Guizotia abyssinica*) são considerados os melhores meios primários de isolamento. Este último apresenta substâncias difenólicas, que propicia a produção de fenoloxidade e resulta em colônias marrons devido à formação de pigmentos do tipo melanina, sendo seletivo e diferencial para *C. neoformans* e *C. gattii* (CASADEVALL et al., 2000; LACAZ et al., 2002). Tal característica é observada para *C. neoformans* e *C. gattii*, (Figura 3) não ocorrendo em outras espécies do gênero *Cryptococcus* spp (LACAZ et al, 2002; STEPANOVIC, et al., 2002).

Podem crescer em temperaturas entre 25°C e 37°C, mas crescem melhor a 30°C, (termo-tolerância máxima de 40°C) (KARKOWSKA-KULETA et al., 2009). A habilidade de utilizar a glicina como fonte de carbono e nitrogênio e a resistência à canavalina azul de bromotimol (CGB) como prova laboratorial permitem a separação de *C. gattii* de *C. neoformans*, no meio de CGB. De dois a cinco dias *C. gattii* altera a coloração do meio de verde para azul cobalto, critério considerado positivo, sendo negativo para *C. neoformans*, uma vez que não ocorre mudança de cor (Figura 4) (DIAMOND, 2000; KHAN et al., 2003).

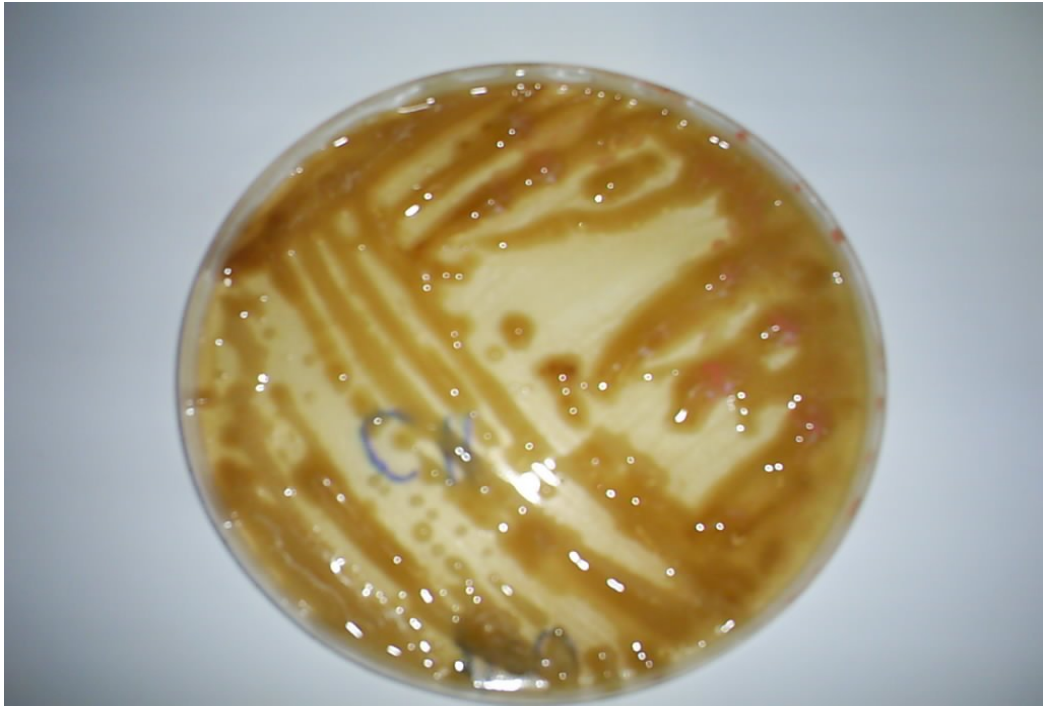


Figura 3. Aspecto macroscópico de colônias de *C. neoformans* e *C. gattii* em meio Níger (ambos exibem coloração marrom) (acervo pessoal).



Figura 4. Meio CGB, diferenciando *C. neoformans* (verde) de *C. gattii* (azul-cobalto) (acervo pessoal).

1.3.3 Patogenia

A infecção por *C. neoformans* e *C. gattii* ocorre geralmente por meio da inalação de propágulos fúngicos presentes no ambiente, no entanto existem relatos sobre inoculação destes fungos através de injúrias na pele (HAMANN et al., 1997; NEUVILLE et al., 2003; XIUJIAO e XU, 2005). Embora existam diversos estudos na área, não há a transmissão entre homem-homem ou mesmo entre animais (SORRELL, 2001; CASALI et al, 2001).

Cryptococcus sp são leveduras haplóides ressecadas ou basidiósporos de tamanho reduzido (< 2µm). Inicialmente instalam-se nos pulmões, podendo causar infecção sintomática ou assintomática na região subpleural, podendo permanecer em estado latente, normalmente dentro de um granuloma ou desenvolver a infecção (KAWAKAMI, 2004; HULL e HEITMAN, 2005). Tucker e Casadevall (2002) verificaram que *C. neoformans* sobrevive no meio intracelular, não sendo destruído por fagocitose.

Geralmente, a doença é monomicrobiana, isto é, causada por uma única cepa de *Cryptococcus* sp, porém tem-se descrito a ocorrência de mais de uma espécie do fungo em um mesmo paciente (MEYER et al., 1999; IGREJA et al., 2004). Nesse sentido, o estado imunológico do hospedeiro, a quantidade de inóculo inspirado e a virulência da cepa são alguns dos fatores que contribuem para que a levedura se dissemine para sítios extrapulmonares (BICANIC e HARRISON, 2005).

De fato, em pacientes imunocompetentes, a infecção geralmente é limitada, ou seja, o sistema imune do hospedeiro elimina ou limita a infecção, resultando em um quadro de pneumonia severa (BICANIC e HARRISON, 2005). Formas clínicas diferentes podem aparecer sendo conhecidas: pulmonar regressiva, pulmonar progressiva e disseminada. A forma pulmonar regressiva geralmente é assintomática ou apresenta sintomas de uma infecção respiratória simples, normalmente encontra-se em indivíduos imunocompetentes, com erradicação espontânea. Já a forma pulmonar progressiva resulta de uma infecção primária, ou então de um foco latente que reativou. Na forma disseminada há propagação da infecção pulmonar por via hematogênica atingindo outros órgãos, principalmente o

sistema nervoso central (SNC) causando meningoencefalite (MORETTI-BRANCHINI e TELLES, 2004).

Já em indivíduos imunocomprometidos, há disseminação por meio da corrente sanguínea, atingindo outros órgãos e tecidos, preferencialmente o SNC, promovendo meningite, encefalite ou meningoencefalite, quadros associados a altas taxas de mortalidade (KAWAKAMI, 2004; KON et al., 2008).

1.3.4 Eco-epidemiologia

C. neoformans e *C. gattii* possuem uma ampla distribuição, podendo ser encontrados em diversos tipos de habitat (construções antigas, torres de igreja, estábulos, porões, barracões e cavernas), além de excretas de aves, fezes de morcegos e baratas, ninhos de vespa, frutas, suco de fruta fermentado, microbiota intestinal de cavalo, leite, cavidade nasal e pele de cães, gatos e coalas, recintos de roedores, buracos de tatus, solo, vegetais em decomposição e ocos de várias espécies de árvores (LAZÉRA et al., 2000; PAPPALARDO e MELHEM, 2003; TRILLES et al., 2003; SOARES et al., 2005; ABEGG et al., 2006).

1.3.5 *Cryptococcus neoformans*

Este fungo é cosmopolita (REOLON et al., 2004; KOBAYASHI et al., 2005). Sua prevalência relaciona-se ao número de hospedeiros imunocomprometidos e ao grau de exposição à levedura (CHEN et al., 2000). A associação desta espécie com pacientes acometidos pela AIDS é predominante nas regiões sul, sudeste e centro-oeste do Brasil (MORETTI et al., 2008).

Normalmente encontrado em fezes de pombos domésticos (*Columba lívia*), (MONTENEGRO & PAULA, 2000; FRIEDMAN et al., 2005; GRANADOS e CASTAÑEDA, 2005; KOBAYASHI et al., 2005) e material em decomposição como madeira e restos vegetais (NISHIKAWA et al., 2003). Além dos Columbiformes, outras aves como Passeriformes, Psittaciformes e Galliformes também podem ser colonizados por *C. neoformans* (FILIÚ et al., 2002; LAGROU et al., 2005; TAY et al., 2005; ABEGG et al., 2006; SALGADO e NÄÄS, 2010).

Diversos trabalhos demonstram a incidência do basidiomiceto em excretas de aves de cativeiro em zoológicos e “pet shops”. Passoni et al. (1998) analisaram 79 amostras de excretas de aves, de Psittaciformes (periquitos) e quatro espécies de Passeriformes: canário-belga, canário-terra-verdadeiro, coleirinho e galo-da-campina, encontrando 12,7% de positividade para o fungo. As residências que possuíam estas aves em cativeiro contribuíram, portanto, para o aumento da contaminação domiciliar (LUGARINI, 2007).

Filiú et al. (2002) isolaram *C. neoformans* em aves de cativeiro e vida livre na cidade de Campo Grande/MS em 18 amostras de excretas de poleiros e grades de recintos contendo aves agrupadas. Assim, além de amostras obtidas em solos contaminados de ambiente aberto, fezes de canário-belga, canário-do-reino, canário-da-terra-verdadeiro, periquito-australiano, calopsita, agapornis, mandarim, pombo-rabo-de-leque, pombo-africano e papagaio constituíram fontes de risco de infecção.

Abegg et al. (2006) analisaram amostras de excreta de aves provenientes do Parque Zoológico do Rio Grande do Sul, pertencentes à Psittaciformes (papagaio-moleiro, papa-cacau, chauá, periquito-rei, jandaia, periquito-maracanã, periquito-australiano, calopsita, maitaca-de-maximiliano e periquito-alexandrino), com 18,18% de positividade, de onde 87% pertenceram a espécie *C. neoformans*.

Khono (2003), em suas pesquisas na Tailândia isolaram *C. neoformans* em fezes de galinhas, com mais de 70% de positividade, comprovando a principal fonte da alta incidência de meningite criptocócica em portadores de HIV no país.

Esta relação com fezes de pombos deve-se à presença de um ambiente favorável ao crescimento do fungo e que apresenta capacidade de assimilação de creatinina, ácido úrico, purinas e xantinas como fontes de nitrogênio para *C. neoformans* (KWON-CHUNG & BENNETT, 1992; CASALI et al., 2001, LIN, 2009).

Montenegro e Paula (2000) relataram que existe alta contaminação de *C. neoformans* nos centros urbanos, devido ao acúmulo de fezes de pombos em ninhos e adjacências, contribuindo desta forma para uma exposição maior de pessoas à infecção. Esta espécie tem a capacidade de colonizar a mucosa dos papos dos pombos, porém sem causar-lhes doença (a termotolerância da levedura é de 40°C), sendo considerado, portanto endosprobiótico natural destas aves.

O isolamento do fungo em residências pode ser decorrência da criação de aves domésticas (SCHÜLLER, 2004; KOBAYASHI et al., 2005).

No Brasil foi demonstrada a associação de *C. neoformans* em ocos de árvores vivas, o que pode indicar um nicho primário para o fungo (LAZERA, et al., 2000; FILIÚ, et al., 2002) como no Rio de Janeiro (RJ), em Teresina (PI), em Boa Vista e Ilha de Maracá (RR), no interior do Amazonas e na Cidade de São Paulo (MONTENEGRO & PAULA, 2000).

1.3.6 *Cryptococcus gattii*

Descrito pela primeira vez em 1970 (SORRELL et al., 2001), esta levedura tem sido isolada do ambiente principalmente em regiões tropicais, subtropicais e temperados (KIDD et al., 2004), acometendo indivíduos aparentemente imunocompetentes (LAZERA et al., 2005; TRILLES et al., 2008). A criptococose causada por *C. gattii* pode possuir aspectos clínico-epidemiológicos pouco conhecidos e perfila-se ao lado das micoses sistêmicas endêmicas (DELGADO et al., 2005; LINDENBERG, 2008). Seu habitat natural foi inicialmente descrito na Austrália, associado a restos vegetais de *Eucalyptus camaldulensis*, posteriormente em outras espécies de eucaliptos como *E. tereticornis*, *E. rudis* e *E. gomphocephala* (ELLIS & PFEIFFER, 1990; LAZÉRA et al., 1998, 2000; GRANADOS e CASTAÑEDA, 2005; DIXIT et al., 2009). Entretanto, sabe-se que eucaliptos não representam habitat natural nem associação específica com *C. gattii*, observando-se diferentes padrões geográficos de ocorrência fungo-árvore-madeira em decomposição. Plantas ornamentais como *Ipe*, *Hibiscus*, *Cássia* e *Ficus* também são considerados fontes de aquisição desta espécie (LAZÉRA et al., 2000; NISHIKAWA et al., 2003; KOBAYASHI et al., 2005; ABEGG et al., 2006).

C. gattii ocorre na América Latina, no Peru, Colômbia (QUINTERO et al., 2005; LIZARAZZO et al., 2007), Argentina, Venezuela, Brasil (NISHIKAWA et al., 2003), Austrália, Nova Guiné, países da África Central, sudeste da Ásia, México e algumas regiões dos Estados Unidos. As regiões norte e nordeste têm sido consideradas como endêmicas no Brasil e responsáveis por 71% dos casos de infecção por este fungo (FERNANDES et al., 2003; CASALI et al., 2003; NISHIKAWA et al., 2003; MARTINS et al., 2007).

Esta espécie é considerada extremamente patogênica, sendo conhecido como o agente primário da criptococose sistêmica (FRASER et al., 2003). A prevalência de *C. gattii* no Brasil é considerada uma das mais altas na América do Sul (MONTENEGRO e PAULA, 2000). Assim, no Brasil, estudos mostram a importância da criptococose por *C. gattii* no SNC de adultos jovens e crianças de ambos os sexos, das regiões norte e nordeste, com letalidade de 35% a 40% (LAZERA et al., 2005). Em Belém (PA), entre 1992 e 1998, de 78 pacientes com criptococose internados no Hospital Universitário, 9 foram decorrentes de *C. gattii*. (CORREA et al., 1999; SEVERO et al., 2001).

Além de árvores, outros nichos de *C. gattii* também têm sido valorizados, sendo que excretas de Passeriformes, Psittaciformes e Galliformes, são consideradas fontes de aquisição (ABEGG et al., 2006; ARAGÃO et al., 2008).

Constatando a participação de excreta de frango como fonte ambiental de *C. gatti*, Scozzafava (2010) e Aragão (2008), relataram casos de meningite e meningoencefalite criptocócica por *C. gattii* em pacientes que lidavam direta ou indiretamente com frangos.

1.3.7 Outras espécies

São raros os relatos de criptococose em humanos causada por outras espécies de *Cryptococcus*, tais como *C. albidus*, *C. laurentii*, *C. uniguttulatus*, primeiramente descritos como etiologia de doenças graves em animais. No entanto este cenário mudou e estas espécies têm também causado infecções em humanos (KHAWCHAROENPORN et al., 2007), porém *C. albidus* e *C. laurentii* têm sido descritos em casos de meningites, fungemias, pneumonias, abscessos pulmonares e infecções cutâneas (SUGITA et al., 2001; AVERBUCH et al., 2002; RANDHAWA et al., 2003; KHAWCHAROENPORN et al., 2007; SHANKAR et al., 2009), sendo responsável por 80% dos casos de criptococose causada por espécies *Cryptococcus* não *neoformans* (KHAWCHAROENPORN et al., 2007). Geralmente, pacientes acometidos por estas espécies têm doenças pré-existentes como leucemia aguda, HIV, neutropenia, artrite-reumatóide, cirrose, hipertireoidismo ou fazem terapia com corticosteroides (KIELSTEIN et al., 2000).

C. albidus, *C. laurentii*, e *C. uniguttulatus* são leveduras cosmopolitas frequentemente isoladas do ar, solos, frutas e flores, excretas de aves, principalmente pombos, leitões de animais roedores (RANDHAWA et al., 2003; KHAWCHAROENPORN et al., 2007; SILVA e CAPUANO, 2008), e em folhas de eucaliptos (KURTZMAN e FELL, 1998; BARNETT et al., 2000; TAY et al., 2008).

C. laurentii vem sendo utilizado como biopesticida, considerado eficiente recurso no controle do apodrecimento de frutas (WILSON et al., 1993; CHAND-GOYAL e SPOTTS, 1996), é encontrado em solos agrícolas (TRINDADE et al., 2002) e frutas tropicais (SLAVIKOVA e VADKERTIOVA, 2003). Diferencia-se das demais espécies pela utilização de meliobiose e lactose como açúcares e a não assimilação de KNO_3 (CHAND-GOYAL e SPOTTS, 1996).

1.3.8 Virulência

A capacidade de infecção por *Cryptococcus* sp deve-se a alguns fatores: a facultativa patogenicidade intracelular (FELDMESSER e TUCKER, 2001); presença de cápsula polissacarídica com ação antifagocítica e imunomoduladora (CHANG et al., 1996; DEL POETA, 2004; MONARI et al., 2006); produção de melanina como antioxidante (CASADEVALL et al., 2002); produção de urease (COX et al., 2000; 2003); habilidade de crescimento a 37°C (CASADEVALL e PERFECT, 1998; DEL POETA, 2004; MONARI et al., 2006); presença de genes sexuais com locus *mating type* (MAT α e MAT α) (LIU et al., 2008); componentes da parede celular, capacidade de adesão e produção de enzimas (MAGLIANI et al., 2005).

Destaca-se que a cápsula é o mais importante fator de virulência, sendo composta por polissacarídeos glucuronoxilomanana (90%), galactoxilomanana (7%) e manoproteína (3%) (MITCHELL e PERFECT, 1995; CASADEVALL e PERFECT, 1998; CASALI et al., 2001; NISHIKAWA et al., 2003; ZARAGOZA e CASADEVALL, 2004; GATES et al., 2004; KARKOWSKA-KULETA et al., 2009). Esta constituição confere a levedura inibição da fagocitose mediada por macrófagos, neutrófilos, decorrente da repulsão eletrostática, inibição da ligação de imunoglobulina G (IgG), bloqueio da ativação de complemento e a produção de citocinas impedindo a ligação aos receptores CR3 dos leucócitos, o que diminui a resposta imunológica e supressão da proliferação da expressão das moléculas de adesão (COX et al., 2001;

MAGLIANI et al., 2005; SHOHAM & LEVITZ, 2005). A diminuição da fagocitose compromete as células T, que não conseguem apresentar o antígeno, resultando em uma resposta imune deficitária (GATES et al., 2004). No microambiente tecidual do hospedeiro, a expressão da cápsula pode sofrer modificações com as altas concentrações de CO₂ no pulmão, à baixa concentração de ferro nos tecidos e a disponibilidade de carboidratos (ZARAGOZA; CASADEVALL, 2004; GUIMARÃES et al., 2010).

Atuam como fatores de virulência deste gênero especialmente as proteases e as fosfolipases. O mecanismo de ação das proteases é permitir a invasão dos tecidos do hospedeiro e a destruição das proteínas imunológicas (FELDMESSER e TUCKER, 2001). Diferentemente, a enzima fosfolipase degrada membranas celulares, com conseqüente penetração tecidual (COX, 2001), fato este responsável pela iniciação da infecção pulmonar, facilitando a adesão das células leveduriformes ao tecido epitelial (SANTANGELO et al., 2004; GANENDREN et al., 2006). Outras enzimas como lacase e urease interferem na ação antioxidante permitindo a proliferação celular (COX, 2001).

O gênero *Cryptococcus* tem a capacidade de sintetizar melanina por meio da conversão de substratos hidroxibenzoicos, dependente da enzima fenoloxidase, caracterizada como uma lacase, tal enzima pertence à classe das oxidases, tendo como co-fatores íons cobre e ferro (REOLON et al., 2004). A melanina criptocócica, localizada na parede celular do fungo, confere à célula proteção contra reações oxidativas, atua na defesa contra a radiação ultravioleta (UV) e o ataque das células de defesa (JACOBSON, 2000; IDNURM et al., 2005).

Substâncias localizadas no SNC do hospedeiro como catecolaminas, epinefrina, tiamina, ácido glutâmico, glutamina, carboidratos e minerais, entre outras, são também utilizados como substratos metabólicos (SEVERO et al., 1998; IDNURM et al., 2005). Tal fato explica o tropismo do fungo para áreas cerebrais, como o gânglio basal, rico em catecolamina e frequentemente infectado durante a meningoencefalite (CASADEVALL et al., 2000; SEVERO et al., 1998; IDNURM et al., 2005). Recentemente, revelou-se um mecanismo de invasão direta no cérebro por meio de capilares juntamente com deformações celulares (SHI et al., 2010).

1.3.9 Diagnóstico laboratorial

Cryptococcus sp são leveduras observáveis em diversas amostras clínicas como escarro, líquido (LCR), lavado brônquico, lesões de pele, biópsias, pus de abscesso, urina, aspirados de gânglios e outros, podendo ser submetidas a exames diretos e sorológicos. A observação direta ao microscópio consta de preparados dos materiais clínicos com Tinta da China (nigrosina), que identifica as leveduras através do halo branco formado ao redor da célula, pois a cápsula polissacarídica repele a tinta e não é corada (Figura 5) (CASALI et al., 2001; PAPPALARDO e MELHEM, 2003). O diagnóstico através da Tinta da China tem como sensibilidade (70 a 80%) de detecção mínima 10^3 a 10^4 UFC de leveduras/mL de líquido (CASADEVALL e PERFECT, 1998; BICANIC e HARRISON, 2005). Já os testes sorológicos de aglutinação em partículas de látex sensibilizadas com anticorpos anti-*C. neoformans* e técnica de ELISA são os mais utilizados, e possuem sensibilidade superior a 90%. A positividade na aglutinação em diluição 1:4 é indicativa de infecção criptocócica, títulos maiores ou iguais a 1:8 normalmente comprovam doença ativa (MITCHELL e PERFECT, 1995; BICANIC e HARRISON, 2005). A sensibilidade para o exame sorológico é de aproximadamente 95% e pós-cultura 75%. Com o início do tratamento, a cultura pode se mostrar negativa, enquanto os testes sorológicos e o exame direto permanecem positivos, os quais servem como monitoramento da doença (CALVO et al., 1991).

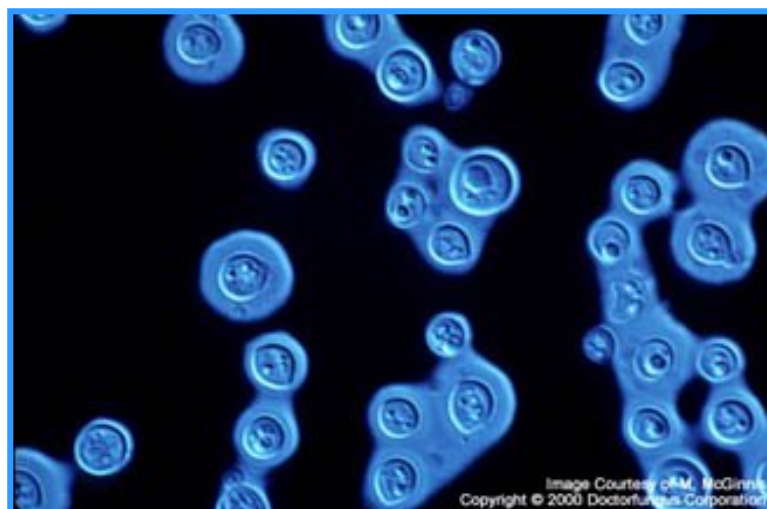


Figura 5. Técnica da tinta da China, mostrando a formação do halo ao redor da cápsula que repele a tinta. Fonte: www.vet.uga.edu.

Há ainda como possibilidade diagnóstica a análise histopatológica, onde as técnicas de coloração HE (hematoxilina-eosina), Gomori-Metamina Prata, ácido periódico de Scchiff, mucicarmina e Fontana-Manson são as principais utilizadas (BICANIC e HARRISON, 2005).

O teste “padrão-ouro” para diagnosticar a criptococose é o isolamento da levedura em meios de cultura. Mediante fungemias, as hemoculturas podem ser obtidas por meio de centrifugação e lise da amostra sanguínea permitindo o isolamento de *Cryptococcus* sp entre 10 a 30% dos casos de criptococose (PASQUALOTTO et al., 2004). Frente ao acometimento do SNC, cultura do liquor em meio Agar Sabouraud permite realização diagnóstica com alta sensibilidade.

Baseando-se na análise do DNA, pesquisadores criaram algumas técnicas para fins de caracterização, filogenia e epidemiologia de *Cryptococcus* sp (MEYER et al., 2008) como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (JAIN et al., 2005; ALMEIDA et al., 2007; MARTINS et al., 2007); análises de RFLP (polimorfismos do comprimento dos fragmentos de DNA gerados por enzimas de restrição); hibridização com sonda CNRE-1 (elementos repetitivos de *C. neoformans*) (SPITZER; SPITZER, 1992; SPITZER; SPITZER, 1994).

Exames de imagem, como tomografias computadorizadas de crânio (TC) ou ressonância magnética nuclear (RNM), também podem ser empregados como auxiliares do diagnóstico da criptococose. Nas imagens radiográficas cerebrais, podem ser observados cistos mucinosos, dilatação dos espaços de Virchow-Robin, meningite circunscrita, criptococoma, forma granulomatosa miliar, realce meníngeo, ependimite, ventriculite e hidrocefalia, como possíveis alterações intracranianas (HEITMAN, 2000).

1.3.10 Aspectos Clínicos

A criptococose pode se apresentar de forma localizada ou generalizada (ROZENBAUM e GONÇALVES, 1994; PAPPALARDO e MELHEM, 2003), sendo na maioria das vezes, diagnosticada na forma disseminada (ROZENBAUM e GONÇALVES, 1994; SEVERO et al., 2001; KON et al., 2008). Propágulos do fungo acessam o organismo do hospedeiro por meio da via respiratória e colonizam primariamente os pulmões. Esta invasão pode ser assintomática ou sintomática,

podendo manifestar-se de maneira aguda, subaguda ou crônica. Posteriormente, as leveduras atingem o SNC podendo acarretar quadros de meningite, encefalite ou meningoencefalite (CASADEVALL e PERFECT, 1998; DARZÉ et al., 2000; FERNANDES et al., 2000; CASALI et al., 2001, 2003; TRILLES et al., 2003; PAPPALARDO e MELHEM, 2003; KON et al. 2008). Em geral, a meningoencefalite é de evolução grave e fatal, acompanhada ou não, de lesão pulmonar evidente, no entanto, focos secundários para pele, ossos, rins, coração, linfonodos, supra-renal até a próstata, entre outros, podem ocorrer evidenciando-se recidivas (LINDEMBERG, 2008; KON et al., 2008; KUMAR et. al, 2005).

Indivíduos imunocomprometidos pela AIDS, doenças de bases como câncer, sarcoidose, tuberculose, diabetes, pressão alta, portadores de processos linfoproliferativos malignos, transplantados ou em terapias com corticosteroides são mais acometidos por esta micose e podem ter outros tecidos do corpo afetados (NOCERA et al., 2010; CHAYAKULKEEREE e PERFECT, 2006; WILDSTEIN et al., 2005; HULL e HIETMAN, 2002). Manifestações cutâneas não são comuns, porém quando presentes podem ser sinais de que a doença esta disseminada e atingem cerca de 10 a 15% dos pacientes (CASADEVALL e PERFECT, 1998; BIVANCO et al.,2006).

A criptococose causada por *C. neoformans* e *C. gatti* exibem os mesmos sintomas, porém na infecção por *C. gatti* observa-se maior incidência de criptococomas no pulmão e cérebro, resposta lenta a antifúngicos, hidrocefalia e lesões cerebrais, causas frequentes de sequelas neurológicas e comprometimento do nervo óptico (TRILLES et al., 2003).

A criptococose pode associar-se a outras infecções fúngicas, geralmente candidíase oral, dermatofitose, pitiríase versicolor, pneumocistose, paracoccidiodomicose ou histoplasmose (MITCHELL e PERFECT, 1995; FERNANDES et al., 2000; CASALI et al., 2003; PAPPALARDO e MELHEM, 2003).

1.3.11 Tratamento

Existem diversas drogas disponíveis para o tratamento da criptococose. Fármacos poliênicos como anfotericina B (Anfo B), anfotericina B formulação lipossomal (AmBisome), ABCD dispersão coloidal, ABLC complexo lipídico, os azóis

fluconazol (FCZ) e itraconazol (ICZ), além da 5-fluorocitocina (5-FC) são os mais comumente empregados na terapêutica, seguidos por voriconazol, posaconazol e ravuconazol (PERKINS et al., 2005; IINAIT-ZARAGOZI et al., 2008). Com exceção da 5-FC, a maioria dos antifúngicos citados age principalmente sobre o ergosterol presente na membrana plasmática fúngica. O ergosterol é o principal esteroide da membrana plasmática, confere integridade à membrana e regula sua fluidez (BICANIC e HARRISON, 2005)

1.3.11.1 Anfotericina B

A anfotericina B foi o primeiro medicamento efetivo no tratamento da criptococose, introduzido no final da década de 50. Tem sido utilizada no tratamento de todas as formas da infecção, desde a pneumonia até os casos de meningite (MITCHELL e PERFECT, 1995) e são raras as espécies de *Cryptococcus* sp resistentes à anfotericina B (VIVALDINI, 2003; PAPPALARDO, 2003).

Este antifúngico interage com o ergosterol da membrana plasmática, resultando na produção de poros aquosos, aumentando a permeabilidade, o que leva a perda de componentes vitais como íons de potássio, água, amônio, fosfato, açúcares e proteínas. Posteriormente, ocorre deterioração metabólica e morte celular. Este mecanismo de ação é responsável por grande parte da toxicidade do fármaco, pois este interage também com os esteróides da membrana plasmática humana, em geral com o colesterol (MITCHELL e PERFECT, 1995; BICANIC e HARRISON, 2005; CATALÁN e MONTEJO, 2006). A ação da anfotericina B pode ser tanto fungicida como fungistática, dependendo da concentração administrada. Apresenta alta nefrotoxicidade, no entanto já existem formulações lipídicas que reduzem a toxicidade do fármaco, possibilitando assim que doses maiores sejam toleradas (KOTWANI et al., 2001; BICANIC e HARRISON, 2005).

1.3.11.2 Fluconazol

Desenvolvido na década de 80, este azólico é fungistático. Sua ação dependente do citocromo P-450 inibe a enzima 14 α -dimetilase, que tem como função converter o lanosterol em ergosterol (ANDRIOLE, 1998). Estudos

apresentaram resultados satisfatórios quanto à utilização de fluconazol na prática clínica (PAPPALARDO; MELHEM, 2003; FERNANDES et al., 2003).

1.3.11.3 Itraconazol

O ITZ é um composto triazólico sintetizado pela primeira vez em 1986. Como o fluconazol, age sobre o citocromo P-450, inibe a síntese do ergosterol, causando alterações na membrana plasmática fúngica. O itraconazol é considerado a droga de segunda escolha no tratamento de meningite criptocócica (PAPPALARDO, 2003).

1.3.11.4 5-Fluorocitosina

A 5-FC foi desenvolvida na década de 70 primeiramente como uma droga antitumoral, posteriormente foi introduzida como antifúngico. Este fármaco é um análogo de pirimidina que inibe a síntese de ácidos nucleicos da levedura (BICANIC e HARRISON, 2005). É comum o surgimento de resistência secundária ou adquirida durante o tratamento, por isso comumente a 5-FC é associada com a anfotericina B. Em pacientes com AIDS, a 5-fluorocitosina pode causar efeitos colaterais como leucopenia e distúrbios gastrointestinais (MITCHELL e PERFECT, 1995; PAPPALARDO, 2009).

1.3.11.5 Resistência às drogas

De modo geral, a resistência à anfotericina B por *Cryptococcus* sp é rara, porém pode se desenvolver em pacientes previamente tratados com azólicos, provavelmente devido a alterações na membrana celular fúngica. Já para a 5-fluorocitosina altas taxas de resistência são observadas, principalmente o desenvolvimento de resistência secundária. Para os azólicos, a ocorrência de cepas resistentes tem ocorrido a partir de isolados obtidos de pacientes com AIDS, portadores de câncer e candidíase oral (PEREA e PATTERSON, 2002). Terapias com Anfotericina B seguida de manutenção com fluconazol têm gerado falhas terapêuticas, conseqüentemente selecionando isolados resistentes, os quais estão

emergindo drasticamente nos últimos anos (PFALLER et al., 2009; MORSCHHAUSER, 2009).

1.3.12 Avaliação da susceptibilidade antimicrobiana

Métodos de padronização da avaliação de susceptibilidade antimicrobiana vêm sendo propostos por grupos de pesquisadores europeus e norte-americanos (NCCLS, EUCAST). Microdiluição é um dos métodos que expõe um inóculo da levedura em conhecidas concentrações das drogas. A leitura final dos testes de microdiluição identifica a concentração inibitória mínima (CIM) (PAPPALARDO e MELHEM, 2003; COLOMBO e ALVES, 2004).

2 JUSTIFICATIVA

A dificuldade para encontrar dados sobre a epidemiologia desta doença na região da Alta Araraquarense, particularmente São José do Rio Preto, bem como a avaliação de outras vias de aquisição da criptococose na região justificou o interesse pela pesquisa em busca de fontes ambientais naturais e em amostras clínicas para o fungo *Cryptococcus* sp.

3 OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Caracterizar fenotipicamente isolados clínicos e ambientais de *Cryptococcus* spp na cidade de São José do Rio Preto/SP.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Verificar a ocorrência de *Cryptococcus* spp em excretas de Columbiformes e demais aves (Galliformes, Passeriformes e Psittaciformes) presentes nos domicílios e proximidades de pacientes com criptococose em São José do Rio Preto;
- b) Caracterizar as espécies de *Cryptococcus* sp nos isolados clínicos e ambientais;
- c) Caracterizar e comparar o perfil de suscetibilidade antifúngica de amostras clínicas e ambientais frente aos derivados azólicos e poliênicos através da técnica de microdiluição (M27A2).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Origem das amostras clínicas

No período de janeiro de 2004 a janeiro de 2010, 48 amostras de líquido foram obtidas de 30 pacientes, atendidos no Hospital de Base, Município de São José do Rio Preto, Estado de São Paulo, sendo 14 portadores do vírus HIV. Tais amostras estavam armazenadas no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, onde foram submetidas às análises laboratoriais (micológico direto e cultura), posteriormente identificadas, sendo as informações de cada amostra descritas em fichas de identificação (anexo). Dados demográficos e clínicos dos pacientes foram obtidos através dos prontuários localizados no Serviço de Neurologia do Hospital de Base de São José do Rio Preto.

4.2 Origem dos isolados ambientais

De cada residência dos pacientes portadores de neurocriptococose, investigou-se a fonte de contaminação, preferencialmente a partir de fezes de pombos, ou de aves co-habitando tais ambientes, o que se caracterizou como primeira coleta. Numa segunda etapa, consideraram-se áreas adjacentes até 200m da residência do paciente, para buscar focos de contaminação com fezes de pombos e demais aves (Columbiformes, Galliformes, Passeriformes e Psittaciformes). Para tal, foram visitados 153 locais, incluindo residências, áreas circunvizinhas, prédios comerciais, barracões, escolas, galpões e praças públicas, de onde se coletou 155 amostras de excretas. Tais excretas foram armazenadas em tubos estéreis com rosca previamente identificados com auxílio de pinça, luvas e máscara e em seguida levadas ao Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto. Tais amostras ambientais foram processadas em câmara de fluxo laminar, conforme determinação do método de Staib modificado (NIGRO et al., 1987; MACHADO et al., 1993). Aproximadamente 1g de fezes foi suspenso em 50 mL de solução fisiológica estéril, com 0,01g de cloranfenicol. Após agitação vigorosa de 5 minutos, a suspensão foi mantida em repouso por 30 minutos, a partir da qual, o 100 µL do sobrenadante foram semeados em três placas

de Petri de 100x15 mm contendo ágar Níger, seguindo diluições seriadas (pura, 10^{-4} , 10^{-6}). As placas foram embrulhadas em papel pardo e armazenadas em temperatura ambiente por 5 dias de incubação, a partir da qual, colônias lisas de coloração marrom foram selecionadas para posterior identificação.

4.3 Caracterização morfológica e bioquímica

4.3.1 Caracterização morfológica

As alíquotas de LCR foram submetidas à centrifugação e o sedimento utilizado para análise em microscópio óptico e cultura. Quando positiva, colônias eram isoladas e colocadas entre lâmina e lamínula e uma gota de tinta da China. A identificação presuntiva de *Cryptococcus* sp foi estabelecida quando positiva para leveduras globosas, encapsuladas com ou sem brotamento.

Paralelamente, os mesmos procedimentos de análise morfológica foram estabelecidos frente aos isolados ambientais.

4.3.2 Provas bioquímicas

A verificação do gênero *Cryptococcus* se deu por meio das provas de hidrólise da uréia, assimilação de fontes de Carbono e Nitrogênio (auxanograma) segundo descrições por Milan e Zaror (2004) e Saag (2000).

4.3.3 Hidrólise da ureia

Algumas colônias crescidas em meios primários de isolamento foram transferidas para um tubo de ensaio contendo Agar Ureia, para posterior incubação a 30°C por até 5 dias. Provas foram consideradas positivas mediante alcalinização do meio, apresentando coloração rósea.

4.3.4 Assimilação de carboidratos

A assimilação de açúcares baseia-se na habilidade da levedura em assimilar determinado carboidrato como única fonte de carbono para a viabilidade celular (SIDRIM e MOREIRA, 1999).

Para a realização do auxanograma (semeadura em profundidade) utilizou-se como meio o *Yeast Nitrogen Base* (meio desprovido de carboidratos) previamente preparado em tubos de ensaio de vidro 20 x 200 mm, contendo 20 mL e 10 mL do meio, refrigerados. No momento do uso, estes meios foram fundidos em banho-maria até que atingissem a temperatura de 40°C. Preparou-se 5 mL de uma suspensão de levedura, com turbidez equivalente ao tubo número cinco da escala de McFarland. Após a estabilização da temperatura, 30 mL de meio basal foram vertidos em duas placas de Petri de 150 x 20 mm, seguido da adição de 1,5 mL da suspensão, com posteriores movimentos rotacionais para homogeneização. Após a solidificação do meio, pequenas alíquotas de açúcares foram distribuídas equidistantes sobre o agar, utilizando-se espátulas individuais.

Os carboidratos utilizados foram: maltose, dextrose, sacarose, lactose, D-galactose, melibiose, celobiose, inositol, trealose, D-xilose, rafinose e dulcitol. A dextrose atuou como controle positivo para evidenciar a viabilidade do inóculo. As placas foram incubadas a 30°C e lidas em 24 e 48 horas. A positividade foi observada através da formação de um halo de crescimento em torno do açúcar (Figura 6) (SIDRIM e MOREIRA, 1999).



Figura 6. Técnica de auxanograma mostrando positividade em assimilação de açúcar através da formação do halo em torno do mesmo. Fonte: www.pgodoy.com.

4.3.5 Assimilação de nitrogênio

A técnica de assimilação de nitrogênio demonstra a habilidade da levedura em assimilar nitrato de potássio (KNO_3) como única fonte de nitrogênio.

O método empregado nesta prova foi semelhante ao utilizado para a assimilação de carboidratos. Como meio basal utilizou-se o *Yeast Carbon Base* (meio desprovido de fontes nitrogenadas), previamente preparado e armazenado em tubos de ensaio de vidro de 20x200mm, contendo 20 mL do meio, mantidos em refrigeração. Os tubos foram fundidos em banho-maria e resfriados até que atingissem 40°C. Em seguida foram vertidos em placas de Petri 90x15mm que continham 1mL de suspensão de levedura com turbidez correspondente ao número 5 da escala de McFarland. Movimentos rotacionais foram realizados para homogeneização do inóculo ao meio. Após solidificação do meio, distribuíram-se alíquotas de fontes nitrogenadas: nitrato de potássio e peptona, que foi empregada como controle positivo para a viabilidade do inóculo, já que é utilizada como fonte nitrogenada por todas as leveduras (SIDRIM e MOREIRA, 1999). As placas foram mantidas a temperatura ambiente e a leitura realizada entre 24 a 48h, com positividade verificada pela formação de um halo ao redor das fontes nitrogenadas.

4.3.6 Cultivo em agar CGB

Para a diferenciação entre as espécies *C. neoformans* e *C.gattii*, utilizou-se o meio CGB (canavanina-glicina-azul de bromotimol). As colônias suspeitas para *Cryptococcus* sp foram transferidas para tubos contendo meio CGB e incubados por até 5 dias a 30°C. As cepas ATCCs 90012 de *C. neoformans* e *C.gattii* foram utilizadas como controle. *C.gattii*, diferentemente de *C. neoformans*, é resistente a cavanina e utiliza a glicina como fonte de carbono e nitrogênio, alterando a coloração do meio para azul cobalto (ABEGG et al., 2006).

4.4 Teste de suscetibilidade antifúngica

As amostras clínicas e ambientais de *Cryptococcus* sp foram submetidas ao teste de suscetibilidade antifúngica por microdiluição em caldo segundo protocolo

M27-A2 (NCCLS, 2002), frente à anfotericina B (anfo B), itraconazol (ITZ), fluconazol (FCZ) e 5 fluorcitosina (5-FC), SIGMA, St. Louis, USA .

Como controles foram utilizados as ATCCs 6258 *Candida krusei*, ATCC 90012 *C. neoformans* e *C. gattii*.

O meio de cultivo líquido utilizado foi o RPMI-1640 (Gibco) com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio. Foram pesados 18 g de dextrose e 34,53g (MOPS) de ácido morfolinopropanosulfônico (Sigma), adicionou-se um envelope de RPMI (10,40 g) e em seguida, estes componentes foram hidratados em 900 mL de água destilada esterilizada. O pH foi ajustado para 7,0 com solução de hidróxido de sódio 10 M e o volume da solução foi completado para 1000 mL. Posteriormente, a solução resultante foi esterilizada por filtração em membrana de acetato de celulose de 0,2 µm (Sartorius Biolab Products).

Os antifúngicos itraconazol (Sigma Chemical Corporation, St Louis, MO, EUA), 5 fluorcitosina e anfotericina B (Sigma Chemical Corporation, St Louis, MO, EUA) foram preparados em uma solução estoque de 1600 µg/mL em dimetilsufóxido (DMSO) e para o fluconazol (Sigma Chemical Corporation, St Louis, MO, EUA) a solução estoque foi de 6400 µg/mL dissolvida em água destilada estéril. Os antifúngicos testados foram diluídos em dez concentrações seriadas a saber: para itraconazol e anfotericina B, as concentrações foram de 16 – 0,03 µg/mL, e para o fluconazol de 128 – 0,25 µg/mL, todas dissolvidas em RPMI.

Concentrações progressivas de drogas foram dispensadas placas estéreis de poliestireno para microtitulação de 96 poços, utilizando-se pipeta multicanal, sequencialmente nos poços pertencentes às colunas numeradas de um a dez. Os poços pertencentes à coluna identificada com o número 12 foram utilizados como controles de crescimento, sendo dispensados apenas 100 µL do meio de cultura e a mesma quantidade de inóculo. Os poços da coluna 1 foram os controles de esterilidade, contendo apenas o meio RPMI-1640. As placas foram mantidas a -20°C até sua utilização por período máximo de 6 meses.

A partir de um cultivo de 24 horas da levedura a ser testada foi preparada uma suspensão de inóculo inicial com transmitância de 90% determinada por espectrofotometria, utilizando-se comprimento de onda a 530 nm. Alíquotas de 100 µg/mL da solução do inóculo padrão foram dispensadas nos poços contendo 100 µg/mL de diferentes concentrações dos antifúngicos testados.

As placas foram incubadas por dois dias a 37° C e lidas visualmente. Para azóis, a CIM foi determinada como a menor concentração, mostrando 80% de inibição. Já para anfotericina B, considerou-se nenhum crescimento, conforme recomendação do CLSI-M27A2. A resistência foi delineada como CIM ≥ 2 $\mu\text{g/mL}$ contra anfotericina, a 5-fluorocitosina ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$, ao itraconazol ≥ 1 $\mu\text{g/mL}$ e para fluconazol ≥ 64 $\mu\text{g / mL}$.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização das amostras clínicas

Foi possível diagnosticar criptococose nas 48 amostras de LCR obtidas de 30 pacientes distintos, sendo que oito caracterizaram-se como amostras seriadas. Todos os pacientes foram procedentes de São José do Rio Preto, dos quais 21(70%) eram do sexo masculino e nove (30%) do sexo feminino. A etnia e idade não foram possíveis de serem determinadas. Dentre todas as amostras, 47 (99%) foram positivas para leveduras produtoras da enzima fenoloxidase, identificadas posteriormente como *C. neoformans* (62,5%), *C.gattii* (35,5%) e *C. luteolus* (2%).

A ocorrência de óbito por criptococose foi observado em seis (20%) dos casos. Infecção dupla ocorreu em cinco (16,5%) pacientes imunocompetentes e quatro (13,5%) imunocomprometidos, em ambas as situações *C. neoformans* e *C. gattii* foram as espécies encontradas. Em relação à espécie de maior ocorrência em pacientes distintos com o vírus HIV, prevaleceu *C. neoformans* (n=8) sobre *C. gattii* (n=3).

5.2 Caracterização das amostras ambientais

Das 155 amostras de excretas (Columbiformes, Galliformes, Passeriformes e Psittaciformes) ambientais, a positividade para o gênero *Cryptococcus* ocorreu em 63 amostras, sendo 26 (41,3%) *C.albidus*, 22 (35%) *C. laurentii* , nove (14,3%) positivas para *C. neoformans*; cinco (8%) *C. gattii*, uma (1,5%) *C.uniguttulatus*.

5.3 Perfis de suscetibilidade

Os resultados das CIMs dos 111 isolados mais frequentes (63 ambientais e 48 clínicos) frente aos antifúngicos e seus perfis de sensibilidade estão apresentados nas Tabelas 1 e 2 abaixo.

5.3.1 Suscetibilidade amostras clínicas

Os valores das concentrações inibitórias mínimas (CIM) e perfis de suscetibilidade de *C. neoformans* e *C. gattii* estão descritos na Tabela 1. Para a espécie *C. neoformans*, 14 (47%) amostras foram resistentes a anfotericina B e 11 (37%) ao itraconazol. Dentre os isolados de *C. gattii*, quatro (24%) amostras foram resistentes a anfotericina B e itraconazol. A cepa representante da espécie *C. luteolus*, mostrou-se sensível-dose-dependente para FCZ e sensível para os demais antifúngicos.

5.3.2 Suscetibilidade amostras ambientais

Todos os isolados ambientais de *C. neoformans*, *C. gattii* e *C. uniguttulatus* foram 100% sensíveis aos agentes antifúngicos. A Tabela 2 apresenta os valores de CIM e perfis de suscetibilidade dos demais isolados ambientais.

C. albidus apresentou seis (23%) cepas resistentes a 5-fluorocitosina; sete (27%) ao itraconazol e três (12%) a anfotericina B; nove (41%) cepas de *C. laurentii* foram resistentes a 5-fluorocitosina; cinco (23%) ao itraconazol e quatro (18%) a anfotericina B.

Tabela 1. Distribuição dos valores de CIM e perfis de suscetibilidade de isolados clínicos de *C. neoformans* e *C. gattii* frente a 5-FC; FZ; IZ e Anfo B.

Espécie (nº isolados)	Agente Antifúngico	Faixa de variação das CIM	Perfis de suscetibilidade		
			R n(%)	SDD n(%)	S n(%)
<i>C. neoformans</i> (n=30)	Anfo B	0.015 - 8.0	14(47%)	-	16(53%)
	Itraconazol	0.015 - 8.0	11(37%)	9(30%)	10(33%)
	Fluconazol	0.0625 - 32.0	0(0%)	9(30%)	21(70%)
	5-FC	0.0625 - 4.0	0(0%)	0(0%)	30(100%)
<i>C. gattii</i> (n=17)	Anfo B	0.03 - 8.0	4(24%)	-	13(76%)
	Itraconazol	0.015 - 8.0	4(24%)	3(18%)	10(58%)
	Fluconazol	0.125 - 32.0	0(0%)	4(24%)	13(76%)
	5-FC	0.0625 - 8.0	0(0%)	1(6%)	16(94%)

5-FC: 5-fluorocitocina; anfo B: anfotericina B; R: resistente; SDD: sensível dose-dependente; S: sensível; n: número de isolados; %: porcentagem das espécies.

Tabela 2. Distribuição dos valores de CIM e perfis de suscetibilidade de isolados ambientais de *C. albidus* e *C. laurentii* frente a 5-FC; FZ; IZ e Anfo B.

Espécie (nº isolados)	Agente Antifúngico	Faixa de variação das CIM	Perfis de suscetibilidade		
			R n(%)	SDD n(%)	S n(%)
<i>C. albidus</i> (n=26)	Anfo B	0.015 - 8.0	3(12%)	-	23(88%)
	Fluconazol	0.015 - 8.0	0(0%)	3(12%)	23(88%)
	Itraconazol	0.0625 - 32.0	7(27%)	4(16%)	15(57%)
	5-FC	0.0625 - 32.0	6(23%)	0(0%)	20(77%)
<i>C. laurentii</i> (n=22)	Anfo B	0.015 - 8.0	4(18%)	-	18(82%)
	Fluconazol	0.015 - 8.0	0(0%)	5(23%)	17(77%)
	Itraconazol	0.0625 - 32.0	5(23%)	10(45%)	7(32%)
	5-FC	0.0625 - 32.0	9(41%)	1(5%)	12(54%)

5-FC: 5-fluorocitocina; anfo B: anfotericina B; R: resistente; SDD: sensível dose-dependente; S: sensível; n: número de isolados; %: porcentagem das espécies.

6 DISCUSSÃO

A crescente incidência das micoses tornou-se problema de saúde pública e este se mostra mais preocupante em indivíduos imunossuprimidos, os quais são mais susceptíveis a desenvolver estas infecções, podendo levá-los ao óbito (JARVIS et al., 2008; ESPINEL-INGROFF, 2009). Juntamente a este fato, a resistência microbiana também apresenta índices elevados, devido a problemas de diagnóstico ou durante a terapia, algumas vezes ineficiente, o que nos remete ao desenvolvimento de tratamentos mais efetivos (GIROIS et al., 2006).

Diversos estudos de âmbito nacional e internacional demonstram o alto índice de isolamento da espécie de *C. neoformans* e, em menor proporção *C. gattii* em fezes de aves, principalmente pombos (MONTENEGRO & PAULA, 2000; REOLON et al., 2004; FRIEDMAN et al., 2005; GRANADOS e CASTAÑEDA, 2005; KOBAYASHI et al., 2005; SOARES et al., 2005; KON, et al., 2008; LIN, 2009; SCOZZAFAVA et al., 2010). Além dos Columbiformes, outras aves como Passeriformes, Psittaciformes e Galliformes também podem propagar este fungo por meio de suas excretas (FILIÚ et al., 2002; LAGROU et al., 2005; TAY et al., 2005; ABEGG et al., 2006). Em nossos resultados observamos 71,6% de amostras positivas para *Cryptococcus* spp. Estes dados estão de acordo com trabalhos prévios e, comprova a ocorrência deste agente em São José do Rio Preto.

Baseados em dados literários e nos resultados desta pesquisa fica evidente e comprovada a presença de leveduras do gênero *Cryptococcus* em fezes de aves, principalmente pombos, que possuem estreita relação com humanos e animais. O convívio destas aves em áreas urbanas e ainda considerando a existência de cepas resistentes, indicam risco à saúde pública, principalmente para os indivíduos imunocomprometidos. Dessa forma, são necessárias intervenções a fim de se evitar ao máximo o contato com estes fungos, como por exemplo, barreiras físicas para impedir a formação de ninhos e abrigos para as aves, controle de lixo e outras fontes de alimentação (REOLON et al., 2004; KOBAYASHI et al., 2005).

O isolamento das espécies *C. neoformans* e *C. gattii* em fezes de aves é fato concordante com a literatura (SOARES et al., 2005; KON, et al., 2008; PEDROSO et al., 2006; SILVA & CAPUANO, 2008; LIN, 2009; SCOZZAFAVA et al., 2010; LORD

et al., 2010), no entanto pode-se observar que *C. albidus* e *C. laurentii* são também agentes prevalentes na cidade de São José do Rio Preto/SP. A detecção destas espécies nas excretas de aves é um dado importante, visto que a criptococose causada por estas espécies, tem se destacado durante a última década, apoiando o papel de pombos e demais aves na epidemiologia desta doença (ROSARIO et al., 2010). Os resultados de isolados de espécies não *C. neoformans* encontradas neste trabalho corroboram com relatos de outros autores (SOARES et al., 2005; PEDROSO et al., 2006; SILVA & CAPUANO, 2008; ROSARIO et al., 2010).

A porcentagem ambiental (14,3%) de *Cryptococcus neoformans* obtida neste estudo foi semelhante às encontradas em outras regiões do Brasil como em Minas Gerais (11,1%) (REZENDE & SIQUEIRA, 2001), Santos e São Paulo (13,9%) (SOARES et al., 2005). Estas frequências podem estar relacionadas com o habitat ideal encontrado por aves em algumas cidades, que apresentam abrigos para construção de ninhos, disponibilidade de alimentos e ausência de predadores (FARIA et al., 2010). O pequeno número de isolados de *C. neoformans* em fezes de aves encontrado neste levantamento demonstra a necessidade de novas investigações, com maiores amostragens e um período de tempo mais prolongado. É provável que a baixa taxa de isolamento de *C. neoformans* seja devido às altas temperaturas da cidade de São José do Rio Preto, o que torna a proliferação de *Cryptococcus* sp em excretas vulneráveis ao impacto negativo do efeito térmico (KARKOWSKA-KULETA et al., 2009). Esta dificuldade também foi identificada por REZENDE e cols. (2008).

A detecção neste estudo de apenas 8% de *C. gattii* em excrementos de aves corrobora estudos prévios que classificam sua observação como um fenômeno raro (NISHIKAVA et al., 2003; GRANADOS e CASTAÑEDA, 2005). De fato, sua ocorrência é maior observada em eucaliptos e fícus, plantas essas localizadas em regiões de pouca interferência humana.

Em relação à resposta fenotípica aos antimicrobianos, as cepas clínicas de *C. neoformans* mostraram resistência a anfotericina B (47%) ao itraconazol (37%) e *C. gattii* (24%) respectivamente, sugerindo contato prévio com estes fármacos, já que são os mais utilizados no tratamento da criptococose. Nossos resultados

assemelham-se com dados descritos por outros autores (BARBOZA, 2005; ALMEIDA et al., 2007; FAVALESSA et al., 2009). Santos et al. (2008), em um relato de caso também observou resistência de *C. neoformans* e *C. gattii* ao itraconazol. Todavia, devido aos seus mínimos efeitos tóxicos e rapidez em relação à penetração no sistema nervoso central, os azóis têm sido amplamente utilizados para o tratamento da criptococose em indivíduos portadores de AIDS, bem como pacientes imunocompetentes (BRANDT et al., 2001).

Para os isolados ambientais de *C. neoformans* e *C. gattii*, todos os antifúngicos foram ativos, entretanto em *C. albidus* e *C. laurentii* observaram-se índices elevados da CIM, as quais foram semelhantes para o itraconazol ($\geq 1 \mu\text{g/mL}$); a anfotericina B ($\geq 2 \mu\text{g/mL}$) e a 5 fluorcitosina ($\geq 32 \mu\text{g/mL}$). Estes fatos podem sugerir que a resistência apresentada por estas últimas espécies advém de estirpes originalmente humanas que desenvolveram resistência pelo contato constante com estas drogas, principalmente azóis que são de amplo uso para infecções micóticas. Poluição química e mudanças climáticas como alterações de temperatura e nos níveis de precipitação podem ser fatores que contribuem para a mudança no comportamento tanto das aves como da microbiota (LORD et al., 2010).

Os elevados valores nos perfis de suscetibilidade relacionados ao gênero *Cryptococcus* spp, mostrando resistência antifúngica em espécies *C. neoformans* também foram observadas por outros pesquisadores (PFALLER et al., 2009; LORD et al., 2010).

O aumento nos valores das CIMs em relação aos antifúngicos testados neste estudo (5-FC; anfo B; ITZ; FLZ) corrobora os resultados descritos na literatura (SERENA et al., 2004; QUINDOS et al., 2004; PEDROSO et al., 2006; PFALLER et al., 2009; LORD et al., 2010). Leveduras ambientais submetidas a testes de sensibilidade *in vitro* tendem mostrar valores de corte muito altos, embora estas técnicas nem sempre possam prever bons resultados terapêuticos em pacientes com criptococose (DANNAOUI et al., 2006). A maioria dos tratamentos é baseada nos resultados de suscetibilidade *in vitro*, porém a resposta *in vivo* depende de fatores intrínsecos do antifúngico e da interação entre patógeno e hospedeiro. Devido à diversidade de fatores existem discrepâncias entre testes laboratoriais e à ação que o antifúngico exerce no paciente (RIVAS e SERRANO, 2003).

Os mecanismos de resistência de *Cryptococcus* spp são pouco conhecidos, porém a maior parte relaciona-se com a baixa quantidade de ergosterol da membrana do fungo que juntamente com o aumento dos fosfolípidios, reduzem a interação com os fármacos. Para a anfotericina B e 5-fluorocitosina, têm-se associado tais alterações com mutações nos genes ERG2 e ERG3, os quais codificam enzimas para a síntese do ergosterol, no caso de resistência aos azóis, as mutações ocorrem no gene ERG11 (RUIZ-CAMPS E CUENCA-ESTRELLA, 2009).

O amplo uso de antifúngicos em micoses sistêmicas, principalmente em imunocomprometidos, aliada à utilização destas drogas juntamente à agrotóxicos para combater fungos fitopatógenos, contribui para o aumento da exposição de leveduras do gênero *Cryptococcus* spp a estes fármacos, fato que pode contribuir para o aumento da seleção de cepas resistentes (PFALLER et al., 2005; KON et al., 2008).

Pesquisas epidemiológicas em São José do Rio Preto mostram alta incidência de *Cryptococcus* spp. Segundo levantamentos de estudos realizados há mais de 15 anos por pesquisadores da Faculdade de Medicina de Rio Preto, 90% das amostras coletadas em 40 bairros da cidade continham o fungo. Os bairros da zona norte (35%) (Solo Sagrado, Anchieta, Eldorado, Parque Industrial) e o centro foram os mais atingidos devido à superpopulação de pombos existentes nesses locais. Até 2004 a população de pombos na cidade era de 300 mil aves. Entre os casos registrados no Hospital de Base de São José do Rio Preto, 64% são moradores da cidade (ANVISA, 2006).

Durante o período desta pesquisa, 340 pessoas foram diagnosticadas com criptococose e desse total 236 foram a óbito (Sociedade Brasileira de Infectologia, 2009). Já para pacientes imunocomprometidos a situação é ainda mais alarmante, até 2008 foram relatados 329 casos de criptococose em pacientes portadores de AIDS, segundo o Hospital de Base de São José do Rio Preto (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE/MINISTÉRIO DA SAÚDE-DST/AIDS, 2009). Destes, 78,5% pertenciam ao gênero masculino com idade média de 38,3 anos e a população feminina (21,5%) com idade média de 33,8 anos (SANTOS et al., 2006; RUBIO et al., 2007).

Diante destas referências e dos nossos resultados que comprovam a disseminação de leveduras do gênero *Cryptococcus* spp por diferentes espécies de aves, principalmente pombos, em São José do Rio Preto se faz necessário o controle destas aves bem como medidas preventivas a fim de se evitar o contato com suas excretas evitando-se dessa maneira o desenvolvimento da criptococose. Juntamente a este fato, a existência de resistência em cepas deste gênero indica risco à saúde pública, principalmente a pacientes imunossuprimidos.

Há poucas pesquisas sobre *Cryptococcus* spp na região de São José do Rio Preto, principalmente relacionadas à suscetibilidade do fungo a antimicrobianos, e esta medida torna-se imprescindível visto que há uma superpopulação de pombos na cidade, além de um elevado percentual de casos da enfermidade que vêm aumentando devido à crescente infecção por HIV, o que torna estes pacientes alvos mais suscetíveis a esta doença oportunista.

Torna-se necessária a conscientização da população evidenciando o modo de contaminação, os sintomas da doença, terapias e medidas de prevenção. Este estudo mostra a necessidade de monitoramento contínuo da microbiota aviária, além de estudos específicos para evidenciar as prováveis causas de resistência destas leveduras.

7 CONCLUSÃO

7 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos nesse estudo pode-se concluir que:

- na cidade de São José do Rio Preto há elevada ocorrência de leveduras do gênero *Cryptococcus* spp em excretas de Columbiformes, Galliformes, Passeriformes e Psittaciformes;

- além de *C. neoformans* e *C. gattii*, observou-se a colonização das excretas de aves por outras espécies, como *C.unigutullatus* e, em maior frequência, *C. albidus* e *C. laurentii*;

- os isolados clínicos de *C. neoformans* e *C. gattii* apresentaram altos valores de CIM para itraconazol e anfotericina B, sugerindo contato prévio com estes fármacos;

- as cepas ambientais de *C. neoformans* e *C. gattii* foram sensíveis a todos os antifúngicos;

- as espécies *C. albidus* e *C.laurentii* exibiram índices elevados de CIM para maioria das drogas antifúngicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEGG, M.A.; CELLA,F.L.; FAGANELLO, J.; VALENTE, P.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolated from the excreta of Psittaciformes in the Southern Brazilian zoological garden. **Mycopathologia**. n. 161.v. 2, p.83-91.2006.

ALMEIDA, A.M.; MATSUMOTO, M.T.; BAEZA, L.C.; de OLIVEIRA, E.; SILVA, R.B.; KLEINER, A.A. Molecular typing and antifungal susceptibility of clinical sequential isolates of *Cryptococcus neoformans* from São Paulo state, Brazil. **FEMS. Yeast Res**; v.7. p.152-64.2007.

ALSPAUGH, J. A.; DAVIDSON, R. C.; HEITMAN, J. Morphogenesis of *Cryptococcus neoformans*. **Contrib Microbiol**, v. 5, p. 217-238. 2000.

ALSPAUGH J.A, PERFECT JR. Cryptococcal meningitis. **Curr Treat Opin Infect Dis**; v.4,p.75–80.2002.

ANDRIOLE, V.T. History of antifungal therapy. **Infect Dis Clin Pract**; v.7: p. 2-7.1998.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Lista de Adversidades em Saúde. <http://lidas.anvisa.gov.br>.2006. Acesso em 15 de março de 2011.

ARAGÃO, R.E.M.; BARREIRA ,C.M.M.A.; RIBEIRO, D.C.S.; TIMÓTEO, C.N.G. Amaurose bilateral por meningoencefalite criptocócica: relato de caso **Arq Bras Oftalmol** v.71. n.1 São Paulo. 2008.

AVERBUCH,D.;BOEKHOUTT,T.;FALK,R. Fungemia in a cancer patient caused by fluconazole-resistant *Cryptococcus laurentii*. **Med Mycol**.v.40,p.479-484.2002.

BARBOZA JR.,A.M. **Caracterização das amostras clínicas de *Cryptococcus neoformans* isolados em Sergipe no período de 2001 a 2004.** Dissertação. Universidade Federal de Sergipe. 2005.

BARNETT, J. A., R. W. PAYNE and D. YARROW. *Yeasts: Characteristics and Identification*, 3rd ed. **Cambridge University Press**, Cambridge, p.1139 2000.

BICANIC, T.; HARRINSON, T. S. Cryptococcal meningitis. **British Med Bulletin.** v.72, n.1, p.99-118, 2004.

BICANIC, T.; HARRINSON, T. S. Symptomatic relapse of HIV-associated cryptococcal meningitis after initial fluconazol monotherapy: the role of fluconazole resistance and immune reconstitution. **Clin of Infect Dis** v.43, p.1069-1073, 2005.

BIVANCO, F.C.; MACHADO, C.A.S.; MARTINS, E.L. Criptococose cutânea. **Arq Med ABC;** v.20,p. 102-9.2006.

BOEKHOUT, T, THEELEN, B, DIAZ, M, FELL,J, HOP, W, ABELN, E, DROMER, F, MEYER, W. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. **Microbiol** v.147,p.891–907.2001.

BRANDT, M. E., M. A. PFALLER, R. A. HAJJEH, R. J.HAMILL, P. G. PAPPAS, A. L. REINGOLD, D. RIMLAND, and D. W. WARNOCK. Trends in antifungal drug susceptibility of *Cryptococcus neoformans* isolates in the United States: 1992 to 1994 and 1996 to 1998. **Antimicrob Agents Chemother.** v.45.p.3065–3069.2001.

CALVO, B.; FISCHMAN, O.; CASTELO FILHO, A.; REIS FILHO, J.; DEL BIANCO,R.; BARBOSA, R.M.; ZAROR, L. Deteccion de antígeno del polisacarido capsular de *Cryptococcus neoformans* em pacientes com SIDA y neurocriptococosis em São Paulo, Brasil. **Rev Inst Med Trop de São Paulo**, v.33, n.6,p.485-90, 1991.

CALVO, B.M.; COLOMBO, A.L.; FISCHMAN, O.; SANTIAGO, A.; THOMPSON, L.; LAZERA, M.; TELLES, F.; FUKUSHIMA, K.; NISHIMURA, K.; TANAKA, R.; MYIAJY, M.; MORETTI-BRANCHINI, M.L. Antifungal susceptibilities, varieties and electrophoretic karyotypes of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* from Brazil, Chile and Venezuela. **J Clin Microbiol.** v. 39 (6): p.2348-2350.2001.

CASADEVALL, A.; FREUNDLICH, L.; MARSH, L.; SCHARFF, M.D. Extensive allelic variation in *Cryptococcus neoformans*. **J Clin Microbiol.** v.30.1992.

CASADEVALL A, PERFECT JR. *Cryptococcus neoformans*. Washington: **ASM Press**, 420, 464.1998.

CASADEVALL, A.; ROSAS, A.L.; NOSANCHUK, J.D. Melanin and Virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Current Opinion in Microbiology** v.3, p.354-358.2000.

CASALI, A. K.; STAATS, C. C.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. *Cryptococcus neoformans*: aspectos moleculares e epidemiológicos. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v.20, p.34-37, 2001.

CASALI, A.K, GOULART, L., SILVA, L.K.R Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. **FEMS Yeast Res**; v.33, p.405–15.2003.

CATALÁN, M, MONTEJO, JC. Antifúngicos sistémicos. Farmacodinamia farmacocinética. **Rev Iberoam Micol**; v.23, p.39-49.2006.

CDC, Center for Disease control and Prevention. Cryptococcosis. Disponível em: <<http://www.cdc.gov>>. Atualizado em: outubro de 2005. Acesso em 11 de novembro de 2009.

CHAND-GOYAL,T.; SPOTTS, R.A. Postharvest biological control of blue mold of apple and brown rot of sweet cherry by natural saprophytic yeasts alone or in combination with low doses of fungicides. **Biol Control**.v.6,p.253-259.1996.

CHANG, Y. C.; PENOYER, L. A.; KWON-CHUNG, K. J. The second capsule gene of *cryptococcus neoformans*, CAP64, is essential for virulence. **Infect Immun**. v. 64, n.6,p.1977-1983.1996.

CHARIYALERTSAK, S., SIRISANTHANA, T. Clinical presentation and risk behaviors of patients with acquired immunodeficiency syndrome in Thailand, 1994–1998: regional variation and temporal trends. **Clin Infect Dis** v. 32 (6),p.955–962.2001.

CHATURVEDI, S.; RODEGHIER, B.; FAN, J.. - Direct PCR of *Cryptococcus neoformans* MATa and MATa pheromone to determine mating type, ploidy, and variety: a tool for epidemiological and molecular pathogenesis studies. **J Clin Microbiol** , v.38,p.2007-2009, 2000.

CHAYAKULKEEREE,M.; PERFECT,J.R. Cryptococcosis. **Infect Dis Clin North Am**. v.20(3),p.507-44.2006.

CHEN, S, SORRELL, T, NIMMO, G, SPEED, B, CURRIE, B, ELLIS, D, MARRIOTT, D, PFEIFFER, T, PARR, D, BYTH, K. Epidemiology and host - variety dependent characteristics of infection due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zealand. Australasian Cryptococcal Study Group. **Clin Infect Dis** 31: 499-508.2000.

COLOMBO, A. L.; ALVES, S. H. Testes de susceptibilidade a antifúngicos. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,.,cap 10.p. 102-111.2004.

CORREA, M.P.S.C.; OLIVEIRA, E.C.; DUARTE, R. R. B.S.; PARDAL, P.P.O.; OLIVEIRA, F.M.; SEVERO, L.C. Criptococose em crianças no estado do Pará, Brasil. **Rev Soc Brás Méd Trop**.v.32.p.505-508.1999.

COX, G. M.; MUKHERJEE, J.; COLE, G. T.; CASADEVALL, A.; PERFECT, J. R. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. **Infect Immun.**, v. 68, n.2, p. 443-448. 2000.

COX, G.M. Extracellular Phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. **Mol Microbiol**.v.39, n.1, p.166-75, 2001.

COX GM, HARRISON TS, McDADEHC, TABORDA CP, HEINRICH G, CASADEVALL A, PEDFECT JR. Superoxide dismutase influences the virulence of *Cryptococcus neoformans* by affecting growth within macrophages. **Infect Immun**. v.71,p.173–180. 2003.

DANNAOUI, E.; ABDUL, M.; ARPIN, M.; MICHEL-NGUYEN, A.; PIENS, M.A.; FAVEL, A.; LORTHOLARY, O.; DROMER, F.; The French Cryptococcosis study group. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 50, p. 2464-2470, 2006.

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

DEL POETA, M.; CRISTINA CRUZ, M.; CARDENAS, M.E.; PERFECT, J.R.; HEITMAN, J. Synergistic Antifungal Activities of Bafilomycin A1, Fluconazole, and the Pneumocandin MK-0991/Caspofungin Acetate (L-743,873) with Calcineurin Inhibitors FK506 and L-685,818 against *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 44, p. 739-746, 2000.

DEL POETA, M. Role of phagocytosis in the virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryot Cell**. v.3,p.1067–1075.2004.

DELGADO,A.C.N.;TAGUCHI,H.;MIKAMI,Y., MYIAJY,M.; VILLARES,M.C.B.; MORETTI,M.L. Human cryptococcosis: relationship of environmental and clinical strains of *Cryptococcus neoformans var. neoformans* from urban and rural areas. **Mycopathologia** .v. 159,p. 7–11.2005.

DIAMOND, R. D. *Cryptococcus neoformans*.. Principles and practice of infectious diseases. In: **Mandell GL,Bennett JE, Dolin R (eds)**.Philadelphia, USA: Churchill Livingstone.p.2707-18.2000.

DIXIT, A.; CARROLL,S.F.; QURESHI,S.T. *Criptococcus gattii*: an emerging cause of fungal disease in North America. **Interdisc Perspec on Infect Disease**.2009.

ELLIS, D.H.; PFEIFFER, T.J. Natural habitat of *Criptococcus neoformans var. gatii*. **J. Clin. Micobiol**.v.28.1990.

ESPINEL-INGROFF,A. Novel antifungal agents, targets or therapeutic strategies for the treatment of invasive fungal diseases: a review of the literature (2005-2009). **Rev Iberoam Micol.**, v.26(1), p.15-22.2009.

EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING (E.Dis. 7.1) and CLSI (M27-A2) **J Clin Microbiol**; v.45,p. 109–11. 2007b.

FARIA, Renata Osório de et al. Occurrence of *Cryptococcus neoformans* in pigeon excrement in the city of Pelotas, State of Rio Grande do Sul. **Rev Soc Bras Med Trop**. v.43, n.2. 2010.

FAVALESSA, O.C.; RIBEIRO, L.C.; TADANO,T.; FONTES, C.J.F.; DIAS,F.B.; COELHO, B.P.A.; HAHN, R.C. First description of phenotypic profile and *in vitro* drug susceptibility of *Cryptococcus* spp yeast isolated from HIV-positive and HIV-negative patients in State of Mato Grosso. **Rev Soc Bras Med Trop**.v. 42(6),p.661-665, 2009.

- FELDMESSER, M., TUCKER, S. Intracellular parasitism of macrophages by *Cryptococcus neoformans*. **Trends Microbiol.** v.9 (6), p.273–278.2001.
- FERNANDES, O.F.; COSTA, T.R.; COSTA, M.R.; SOARES, A.J.; PEREIRA A.J.S.C. e SILVA, M.R.R. *Cryptococcus neoformans* isolados de pacientes com AIDS. **Rev Soc Bras Med Trop.** v.33 n.1 Uberaba. 2000.
- FERNANDES, O.F.L, PASSOS, X.S, SOUZA, L.K.H, MIRANDA, A.T.B, CERQUEIRA, C.H.P.V., SILVA, M.R.R. In vitro susceptibility characteristics of *Cryptococcus neoformans* varieties from AIDS patients in Goiânia, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz;** v.98,p.839–41. 2003.
- FILIÚ, W.F.; WANKE, B.; AGÜENA, S.M.; VILELA, V.O.; MACEDO, R.C.; LAZÉRA, M. Avian habitats as sources of *Cryptococcus neoformans* in the city of Campo Grande, Mato Grosso do Sul (Brazil). **Rev Soc Bras Med Trop.**v. 35,p.591-595, 2002.
- FRASER, J.A.; SUBARAN, R.L.; NICHOLS, C.B.; HEITMAN, J. Recapitulation of the sexual cycle of the primary fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*: implications for an outbreak on Vancouver Island, Canada. **Eukaryotic Cell,** v.2, n.5,p.1036-45, 2003.
- FRIEDMAN,G.D.;FESSEL,W.J.;UDALTSOVA,N.V;HURVEY,L.B.Cryptococcosis the 1981–2000 epidemic. **Mycoses,** 2005.
- GANENDREN, R; CARTE, E.; SORRELL, T.; WIDMER, F.; WRIGHT, L. Phospholipase B activity enhances adhesion of *Cryptococcus neoformans* to a human lung epithelial cell line. **Microbes Infect;** v.8,p.1006–15. 2006.
- GATES, M. A.; THORKILDSON, P.; KOZEL, T. R. Molecular architecture of the *Cryptococcus neoformans* capsule. **Mol Microbiol.** v. 52, n.1, p.13-24.2004.

GIROIS,S.B.; CHAPUIS,F.; DECULLIER,E.; REVOL,B.G. Adverse effects of antifungal therapies in invasive fungal infections: review and meta-analysis. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**.v.25,p.138-149.2006.

GRANADOS, D.P.; CASTAÑEDA, E. Isolation and characterization of *Cryptococcus neoformans* varieties recovered from natural sources in Bogotá, Colombia, and study of ecological conditions in the area. **Microbial Ecology**, v.49, p. 282-90, 2005.

GUIMARÃES, A.J.; FRASES,S.; CORDERO,R.J.; NIMRICHTER,L.; CASADEVALL,A.; NOSANCHUK,J.D. *Cryptococcus neoformans* responds to mannitol by increasing capsule size in vitro and in vivo. **Cell Microbiol**,v.8,p.135-138.2010.

HAKIM, J.G., GANGAIDZO, I.T., Impact of HIV infection on meningitis in Harare, Zimbabwe: a prospective study of 406 predominantly adult patients. **AIDS** v.14 (10), p.1401–1407.2000.

HAMANN, I.D.; GILLESPIE, R.J.; FERGUSON, J.K. - Primary cryptococcal cellulitis caused by *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in immunocompetent host. **Aust. J Derm.**, v.38,p. 29-32, 1997.

HELBOK, R., PONGPAKDEE, S. Chronic meningitis in Thailand. **Neuroepidem** v. 26 (1), p.37– 44.2005.

HOLMES, C.B., LOSINA, E.,. Review of human immunodeficiency virus type 1-related opportunistic infections in sub-Saharan Africa. **Clin Infect Dis**. V.36 (5), p.652–662.2003.

HULL, C.M., HEITMN, J.Genetics of *Cryptococcus neoformans*. **Annu Rev Genet** v. 36, p.557–615.2002.

HULL, C. M.; HEITMAN, J. Sexual reproduction between partners of the same mating type in *Cryptococcus neoformans*. **Nature**. v.21, n.434 (7036), p.1017-21. 2005.

IDNURM, A.; BAHN, Y.S.; NIELSEN, K.. - Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Nature Rev. Microbiol.**, v.3,p. 753-64, 2005.

IGREJA, R.P.; LAZERA, M.S.; WANKE, B. Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients of the Brazilian city, Rio de Janeiro. **Med Mycol.**, v.42,p.229-238, 2004.

IIINAIT-ZARAGOZI, MT, MARTÍNEZ, GF, CURFS-BREUKER, I, FERNÁNDEZ CM, BOEKHOUT,T, MEIS, JF. In vitro activity of the new azole isavuconazole (BAL 4815) compared with six other antifungal agents against 162 *Cryptococcus neoformans* isolates from Cuba. **Antimicrob Agents Chemother**; v.52,p.1580-2. 2008.

JACOBSON, E. Pathogenic roles for fungal melanins. **Clin Microbiol Rev** v.13,p.708-717. 2000.

JAIN N, WICKES, BL, KELLER, SM, FU, J, CASADEVALL, A, JAIN, P, RAGAN,MA, BANERJEE, U, FRIES, BC. Molecular epidemiology of clinical *Cryptococcus neoformans* strains from India. **J Clin Microbiol**; v.43,p. 5733-5742. 2005.

JARVIS, J.N.; HARRISON, T.S. HIV-associated cryptococcal meningitis. **AIDS** v.21,p.2119-2129, 2007.

JARVIS, J.N.; DROMER,F.; HARRISON,T.S.; LORTHOLARY,O. Managing cryptococcosis in the immunocompromised host. **Curr Opin Infect Dis**. v.21(6),p.596-603.2008.

KANTARCIOGLU, A.S.;BOEKOUT, T.; DE HOOG, G.S.;THEELEN,B.; YUCEL,A.;EKMEKCI, T.R; et.al. Subcutaneous cryptococcosis due to *Cryptococcus diffluens* in a patient with sporotrichoid lesions case report, features of the case isolate and in vitro antifungal susceptibilities. **Med Mycol**. v.45(2),p. 173-181,2007.

KARKOWSKA-KULETA, J.; RAPALA-KOZIC, M.; KOZIC, A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. **Acta Bioch Polonica** v.56,p.211-224, 2009.

KAWAKAMI, K. Regulation by innate immune T lymphocytes in the host defense against pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. **Japan J Infect Dis**, v.57, p.137-145, 2004.

KHAN, Z. U.; AL-ALNEZI, A .A.; CHANDY, R.; XU, J. Disseminated cryptococcosis in an AIDS patient caused by canavanine-resistant strain *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*. **J Med Microbiol**, v.2052,p.271-275.2003.

KHAWCHAROENPORN, T.; APISARNTHANARA,K,A.; MUNDY, L.M. Non-*neoformans* cryptococcal infections: a systematic review.**Infection**.v.35,p.51-58.2007.

KIDD,S.E.; HAGEN,F.; TSCHARKE,R.L.;HUYNH,M.;BARTLETT,K.H.; FYFE.; 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).**PNAS**.2004.

KIELSTEIN,P.B.; HOTZEL,H.; SCHMALRECK,A.; KHASCHABI,D.; GLAWISCHNIG,W. Occurrence of *Cryptococcus* spp in excreta of pigeons and pet birds. **Mycoses**, v.43,p. 7–15.2000.

KNOKE, M.; SCHWESINGER, G. One hundred years ago: the history of cryptococcosis in Greifswald. **Medical mycology in the nineteenth century**. **Mycoses**, v.37, p. 229-233, 1994.

KOBAYASHI, C. C. B. A.; HASIMOTO E SOUZA, L. K.; FERNANDES, O. F. L.; BRITO, S. C. A.; SILVA, A. C.; SOUSA, E. D.; SILVA, M. R. R. Characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated from urban environmental sources in Goiânia, Goiás, Brazil. **Rev Inst Med Trop**. São Paulo, v.47, p.203-207, 2005.

KOHNO, S. Clinical and Mycological Features of Cryptococcosis. **Jpn J Med Mycol.** vol 44, p.159-162.2003.

KOHNO, S.Variety in cryptococcal pathogenesis. **In: the 6th International Conference on Cryptococcus and Cryptococcosis**, Boston, MA, Boston University School of Medicine.2005.

KON, A.S.; GRUMACH, A.S.; COLOMBO, A.L.; PENALVA, A.C.O.; WANKE, B.; TELLES, F.Q.; SEVERO, L.C.; ARANHA, L.F.; LAZÉRA, M. S.; RESENDE, M.R.; SALMITO, M.A.; SHIKANAI-YASUDA, M.A.; MORETTI, M.L.; FERREIRA, M.S.; SILVA-VERGARA, M. L.; ANDRADE, M.N.P.; TRABASSO,P.; MENDES, R.P.; MARTINEZ, R.; PONZIO,V. Consenso em Criptococose. Relatório técnico. **Rev Soc Bras Med Trop** v.41(5),p.524-544.2008.

KOTWANI, R. N.; GOKHALE, P. C.; BODHE, P. V.; KIRODIAN, B. G.; KSHIRSAGAR, N. A. Safety and efficacy of liposomal amphotericin B in patients with cryptococcal meningitis. **Assoc Physicians India.** v.49, p.1086-90, 2001.

KUMAR, P.; SARAN, R.K.; GONDAL, R.; MALHOTRA, V. Smear morphology of cryptococcosis presenting as a subcutaneous swelling in healthy adults: a report of three cases. **Cytopathol.** v.16,p.143-6. 2005.

KUMARASAMY, N., VALLABHANENI, S. Clinical profile of HIV in India. **Indian J Med Res.** v.121 (4), p.377–394.2005.

KURTZMAN, C.P.; J. W. FELL. The Yeasts, A Taxonomic Study, 4th ed. **Elsevier**, Amsterdam, 1055 p. 1998.

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

KWON-CHUNG, K. J.; EDMAN, J. C.; WICKES, B. L.; Genetic association of mating types and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun.**, v. 60, n.2, p. 602-5.1992.

KWON-CHUNG, KJ, VARMA, A. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? **FEMS Yeast Res**; v.6,p.574- 87. 2006.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS, E.M.V.; MELO, N.T. Criptococose. **In: Tratado de Micologia Médica**. 9ª Edição: Ed. Savier;p.416-35. 2002.

LAZERA, M. S.; CAVALCANTI, M. A.; TRILLES, L.; NISHIKAWA, M. M.; WANKE, B. *Cryptococcus neoformans* var. gattii - evidence for a natural habitat related to decaying wood in a pottery tree hollow. **Med Mycol**, v.36, p.119-122, 1998.

LAZERA, M.S.; SALMITO-CAVALCANTI, M.A.; LONDERO, A.T.; TRILLES, L.; NISHIKAWA, M.M.; WANKE, B. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. **Med Mycol** v.38,p.379 -383, 2000.

LAZERA, M.S.; GUTIERREZ-GALHARDO, M.C.; CAVALCANTE, M.A.S.; WANKE, B. Criptococose. In JR Coura (org), **Din Infec Parasit**, v. II, 1ª ed., Guanabara Koogam, Rio de Janeiro, p. 1223-1235.2005.

LAGROU, K.; VAN ELDERE, J.; KEULEERS, S.; HAGEN, F.; MERCKX, R.;VERHAEGEN, J.; PEETERMANS, W.E.; BOEKHOUT, T. Zoonotic transmission of *Cryptococcus neoformans* from a magpie to an immunocompetent patient. **J Internal Med**, v.257, p.385-8, 2005.

LENGELER, K.B.; COX, G.M.; HEITMAN, J. Serotype AD strains of *Cryptococcus neoformans* are diploid or aneuploid and are heterozygous at the mating-type locus.**Infection and Immunity**, v.69, p.115-22, 2001.

LENGELER, K.B., FOX, D.S., et al. Mating-type locus of *Cryptococcus neoformans*: a step in the evolution of sex chromosomes. **Eukaryot Cell** v.1 (5), p.704–718.2002.

LIN, X.; HEITMAN J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. **Annu Rev Microbiol**; v.60,p.69–105. 2006.

LIN,X. *Cryptococcus neoformans*: Morphogenesis, infection and evolution. *Infection, Genetics and Evolution* v.9,p. 401-416.**Elsevier**.2009.

LINDENBERG, Andrea De Siqueira Campos. Clinical and epidemiological features of 123 cases of cryptococcosis in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Rev Inst Med Trop S. Paulo, São Paulo, v. 50, n. 2, 2008.**

LIU, O.W.; CHUN,C.D.; CHOW, E.D.; CHEN, C.; MADHANI, H.D.; NOBLE, S.M. Systematic genetic analysis of virulence in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Cell**. v.3; 135(1),p. 174–188.2008

LIZARAZZO, J, LINARES, M, de BEDOUT, C, RESTREPO, A, AGUDELO, CI, CASTAÑEDA, E. Estudio clínico y epidemiológico de la criptococosis em Colômbia: resultados de nueve años de la encuesta nacional, 1997-2005. **Biomédica**. v.27,p.1-16.2007

LORD, A.T.K.; MOHANDAS,K.; SOMANATH,S.; AMBU,S. Multidrug resistant yeasts in synanthropic wild birds. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v.9,p.11.2010.

LUGARINE, C. **Isolamento de *Cryptococcus neoformans* a partir de excretas de Passeriformes e Psittaciformes no estado do Paraná**. Dissertação. Universidade Federal do Paraná. Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Setor de Ciências Agrárias. Curitiba 2007.

MACHADO, C.C.; AMARAL, A.A.; SEVERO, L.C. *Cryptococcus neoformans* var.*neoformans* isolado do solo., **Rev Soc Bras Med Trop**.São Paulo. v.35, n.1, p.77-9,1993.

MAGLIANI, W.; CONTI, S.; ARSENI, S.; SALATI, A.; RAVANETTI, L.; MAFFEI, D.L.; GIOVATI, L.; POLONELLI, L. Antibody-mediated protective immunity in fungal infections. **New Microbiol** v.28,p.299-309, 2005.

MARTINS, M.A. Análise **molecular de isolados seriados de *C. neoformans* na criptococose: recidiva ou re-infecção?** Dissertação. Secretaria da Saúde. Coordenadoria de Controle de Doenças. São Paulo; 83 p.2006.

MARTINS, M.A, PAPPALARDO, M.C.S.M, MELHEM, M.S.C., PEREIRA-CHIOCCOLA, V.L. Molecular diversity of serial *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients in the city of São Paulo, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** v.102,p. 777–84.2007.

McCLELLAND, C. M.; CHANG, Y. C.; VARMA, A.; KWON-CHUNG, K. J. Uniqueness of the mating system in *Cryptococcus neoformans*. **Trends Microbiol**.v.12, n.5, p.208-12.2004.

MEYER, W.; MARSZEWSKA, K.; AMIRMOSTOFIAN, M. - 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**, v.20,p.1790-1799, 1999.

MEYER W.; CASTAÑEDA, A.; JACKSON, S. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gatii* in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro. v.103(5),p.455-462. 2008.

MILAN, E. P.; ZAROR, L. Leveduras: identificação laboratorial. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 6, p. 50 - 62.2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Dados e pesquisa em DST e AIDS. Coordenação do Programa Nacional de DST / AIDS. Brasília, DF. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br>>.2005. Acesso em 10/01/2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Programa Nacional de DST e Aids. Boletim epidemiológico. Dados Epidemiológicos-aids, Brasília, DF, Brasil. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br>>. 2009. Acesso em 10/01/2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE - Dados e pesquisas em DST e Aids. Coordenação do programa nacional de DST/Aids. Brasília, 2004. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br>>. Acessado em: 23 de setembro de 2009.

MITCHELL, T.G, PERFECT, J.R. Cryptococcosis in the era of AIDS--100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Clin Microbiol Rev** v.8(4),p.515-48. 1995.

MONARI, C.; BISTONI, F.; VECCHIARELLI, A. Glucuronoxylomannan exhibits potent immunosuppressive properties. **FEMS Yeast Res.** v.6,p.537–542.2006.

MONTENEGRO, H.; PAULA, C.R. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* and *C. neoformans* var. *neoformans* in the city of São Paulo, Brazil. **Med Mycol** v.38,p.385-390, 2000.

MOREIRA, T.A.; FERREIRA, M.S.; RIBAS, R.M.; BORGES, A.S. Criptococose: estudo clínico-epidemiológico, laboratorial e das variedades do fungo em 96 pacientes. **Rev Soc Bras Med Trop.** v.39,p. 255-258, 2006.

MORETTI, M.L.; RESENDE, M.R.; LAZÉRA, M.S.; COLOMBO, A.L.; SHIKANAI-YASUDA, M.A. Guidelines in cryptococcosis – 2008. **Rev Soc Bras Med Trop**. v.41, p.524-544.2008.

MORETTI-BRANCHINI, M.L.; TELLES, Filho F.Q. Criptococose. **In: Condutas em Infectologia**. São Paulo; Atheneu. p. 367-375.2004.

MORSCHHAUSER, J. Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi. **Fungal Genet Biol**.2009.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**. Approved standard M27-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA. 2002.

NEUVILLE, S, DROMER F, MORIN O. Primary cutaneous cryptococcosis: a distinct clinical entity. **Clin Infect Dis** v.36, p.337-47.2003.

NIELSEN, K.; HEITMAN, J. Sex and virulence of human pathogenic fungi. **Adv Genet**. v.57, p.143–173.2007.

NIGRO, N.T.M.R.C.; PEREIRA, A.D.; HUGGINS, D.W.; LACAZ, C.S. Isolamento de *Cryptococcus neoformans* de fezes de pombos, do solo e ninhos de pombos. **Rev Bras Med**, v.44, n.1 e 2, p.6-9, 1987.

NISHIKAWA, M.M.; LAZERA, M.S.; BARBOSA, G.G.; TRILLES, L.; BALASSIANO, B.R.; MACEDO, R.C.L.; BEZERRA, C.C. F.; PEREZ, 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**. v.41, p. 73-77.2003.

NOCERA, V.B.; RONCHI JR, I.; PIETROVICZ,J.; KREBS, C. N. V; LOPES, G. L. Osteomielite criptocócica em paciente com mieloma múltiplo. **Rev Bras Hematol Hemoter**; v.32(3),p. 265-268, 2010.

OHKUSU, M.; TANGONAN, N.; TAKEO, K. Serotyping, mating type and ploidy of *Cryptococcus neoformans* strains isolated from patients in Brazil. **Rev Inst Med Trop**. S. Paulo, v.44,p.299-302, 2002.

PAPPALARDO, M.C.S.M. **Criptococose em Aids: estudo clínico e microbiológico em 35 pacientes acompanhados no “Instituto de Infectologia Emílio Ribas”, São Paulo, entre 1995 a 1997.** Dissertação. São Paulo: Coordenação dos Institutos de Pesquisa da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo; 2003.

PAPPALARDO, M.C.S.M.; MELHEM,M.S.C. Criptococose: revisão sobre a experiência brasileira sobre a doença. **Rev Inst Med Trop**. S. Paulo, v. 45, n. 6, p. 299-305. 2003.

PAPPALARDO, M.C.S.M.; PASCHOAL, R.C.; MELHEM, M.S.C. AIDS-associated central nervous system cryptococcosis: a Brazilian case study. **AIDS**. v.21,p.1971-1983, 2007.

PAPPALARDO, M.C.S.M. **Parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos da anfotericina B e fluconazol e sua contribuição no estudo da correlação clínico-laboratorial da criptococose de sistema nervoso central associada à AIDS.** Tese. São Paulo: Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.2009.

PASQUALOTTO, AC, SEVERO, CB, OLIVEIRA, FM, SEVERO, LC. Cryptococcemia. An analysis of 28 cases with emphasis on the clinical outcome and its etiologic agent. **Rev Iberoam Micol**; v.21,p.143-6. 2004.

PASSONI,L.F.C.; WANKE,B.; NISHIKAWA,M.M.; LAZERA,M.S. *Cryptococcus neoformans* isolated from human dwellings in Rio de Janeiro, Brazil: an analysis of the domestic environment of AIDS patients with and without cryptococcosis. **Med Mycol** v.36,p. 305-311.1998.

PEDROSO, R.S.; FERREIRA, J.C.; CANDIDO, R.C. In vitro susceptibility to antifungal agents of environmental *Cryptococcus* spp isolated in the city of Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, v. 105, p. 239-243, 2006.

PEREA, S.; PATTERSON, T.F. Antifungal resistance in pathogenic fungi. **Antimicrobial Resist.**v.15,p.1073-1080.2002.

PERFECT, J.R.; CASADEVALL, A. Cryptococcosis. **Infec Dis Clin North American.**v.16,p.837-874, 2002.

PERKINS, A, GOMEZ-LOPEZ, A, MELLADO, E, RODRIGUEZ-TUDELA, JL, CUENCA-ESTRLLA, M. Rates of antifungal resistance among Spanish clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*. **J Antimicrobial Chem;** v.56,p. 1144-7. 2005.

PFALLER, M.A.; MESSER, S.A; BOYKEN, L.; RICE, C.; TENDOLKAR, S.; HOLLIS, R.J.; DOERN, G.V.; DIEKEMA, D.J. Global Trends in the Antifungal Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* (1990 to 2004). **J Clin Microbiol.**, v. 43, p. 2163-2167, 2005.

PFALLER,M.A.; DIEKEMA, D. J.; GIBBS,D.L.; NEWELL,V.A.; BIJIE,H.; DZIERZANOWSKA,D.; KLIMKO,N.N.; LETSCHER-BRU,V.;LISANOVA,M.; MUEHLETHALER,K.; RENNISON,C.; ZAIDI,M; and the Global Antifungal Surveillance Group. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: 10.5-Year Analysis of Susceptibilities of Noncandidal Yeast Species to Fluconazole and Voriconazole Determined by CLSI Standardized Disk Diffusion Testing., **J. Clin. Microbiol.** v. 47 p. 117–123, n. 1.2009.

PINTO JUNIOR, V. L.; GALHARDO, M. C. G.; LAZERA, M.; WANKE, B.; REIS, R. S.; PEREZ M. Criptococose associada à AIDS. A importância do cultivo da urina no seu diagnóstico. **Rev Soc Bras Med Trop**.v. 39 (2),p. 230-232, 2006.

PRADO,M.; DA SILVA,M.B.; LAURENTI,R.; TRAVASSOS,L.R.; TABORDA,C.P. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996-2006. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.104, p.513-521.2009.

QUINTERO,E.;CASTAÑEDA,E.;RUIZ,A. Environmental distribution of *Cryptococcus neoformans* in the department of Cundinamarca-Colombia. **Rev Iberoam Micol**.v.12,p.56-60.2005.

RANDHAWA,H.S.;KOWSHIK,T.;KHAN,Z.U. Decayed wood of *Syzygium cumini* and *Ficus religiosa* living trees in Delhi/New Delhi metropolitan area as natural habitat of *Cryptococcus neoformans*. **Med Mycol**.v.41,p.199-209.2003.

REIS-FILHO, J. B.; NEVES,A. C.; ZYMBERG, S. T. ; OLIVEIRA, R.M.C. - O líquido cefalorraquiano inicial nas meningoencefalites por *Cryptococcus neoformans*. **Rev Inst Med Trop**. S. Paulo, Review. v. 27, p. 173-178, 1985.

REOLON, A.; PEREZ, L.R.R.; MEZZARL, A. Prevalência de *Cryptococcus neoformans* nos pombos urbanos da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **J BrAs Patol.Lab**. v.40. n.5.p. 293-8. 2004.

REZENDE, DG, SIQUEIRA, AM. Ocorrência de *Cryptococcus neoformans* em fezes de aves na cidade de Alfenas, MG. In: **Anais do III Cong Bras Micol**; Águas de Lindóia, SP; 2001.

REZENDE,C.; MUNHÓZ,C.J.M.; ALMEIDA,G.G. Investigação Ambiental de *Cryptococcus neoformans* na cidade de Votuporanga/SP. **NewsLab**.ed.87.2008.

RIBEIRO, L.C.; HAHN, R.C.; FAVALESSA, O.C.;TADANO, T.;FONTES, C.J.F.RICHARDSON, M.D.; WARNOCK, D.W. Systemic mycosis: factors associated with death among patients infected with the human immunodeficiency virus, Cuiabá, State of Mato Grosso, Brazil, 2005-2008.**Rev Soc Bras Med Trop**.v. 42(6),p.698-705, 2009.

RIVAS, P. & SERRANO, R.Q. Utilidad Clínica de las Pruebas de Susceptibilidad Antimicótica. **Rev Colomb Cancerol**, p. 34-42, 2003.

ROSARIO, I.; HERMOSO DE MENDONZA, M.; DÉNIZ, S.; SORO, G.; ÁLAMO, I.; ACOSTA, B. Isolation of *Cryptococcus* species including *C. neformans* from cloaca of pigeons. **Mycoses**, n.48, p.421-4, 2005.

ROZENBAUM, R, GONÇALVES,AJR. Clinical and epidemiological study of 171 cases of cryptococcosis. **Clin Inf Dis**; v.18,p. 369-380. 1994.

RUBIO, F. G. I. Eficácia da anfotericina B em emulsão de gordura para o tratamento de meningite criptocócica em pacientes com AIDS. **Braz J Infect Dis**, Salvador, v. 11, n. 2, abril 2007.

RUIZ-CAMPS, I.; CUENCA-ESTRELLA, M. Antifungals for systemic use. **Enferm Infec Microbiol Clin** .v. 27(6),p.353-62.2009.

SAAG, M.S, GRAYBILL, RJ, LARSEN, R.A, PAPPAS, PG, PERFECT, JR . Practice guidelines for the management of cryptococcal disease. **Clin Infect Dis**; v.30,p. 710-8. 2000.

SALGADO, D.D.; NÄÄS, I.A. Avaliação de risco a produção de frangos de corte do estado de São Paulo em função da temperatura ambiente. **Eng Agríc**, Jaboticabal, v.30, n.3, p.367-376,. 2010.

SANTANGELO, R.; ZOELLNER, H.; SORRELL, T. Role of extracellular phospholipase and mononuclear phagocytes in dissemination of cryptococcosis in a murine model. **Infect Immun**; v.72,p.2229–39. 2004.

SANTOS, P.M.H.; CROVADOR, C.S.; SILVA, A.A.; MARTINS, E.A.; ALMEIDA, M.T.G. Criptococose: estudo epidemiológico e microbiológico em AIDS. **Arq Ciências da Saúde**. v.13, supl 2.2005.

SANTOS, W. R. A. Primary endemic *Cryptococcosis gattii* by molecular type VGII in the state of Pará, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 103, n. 8, 2008.

SCHÜLLER, M. **Pesquisa de protozoários e helmintos de interesse médico presentes nas excretas do pombo doméstico *Columba livia domestica***. Dissertação . São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2004.103p.

SCOZZAFAVA,J.; BLOCK,H.; ASDAGHI,N.; SIDDIQI,Z.A. Teaching NeuroImage: Cryptococcal brain pseudocysts in an immunocompetent patient. **Neurology**; v.69; p.E6-E7. 2010.

SELMECKI, A.; FORCHE, A.; BERMAN, J. Aneuploidy and isochromosome formation in drug-resistant *Candida albicans*. **Science**. v.313,p.367–370. 2006.

SELMECKI, A.; GERAMI-NEJAD, M.; PAULSON,C.; FORCHE, A.; BERMAN, J. An isochromosome confers drug resistance in vivo by amplification of two genes, ERG11 and TAC1. **Mol Microbiol**. v.68,p.624–641.2008.

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

SEVERO, L.C.; BERTA-E-ZARDO, I.; LONDERO, A.T. Cutaneous cryptococcosis due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. **Rev Iberoam Micol.**v. 18 (4),p. 200-1. 2001.

SHANKAR, E.M; KUMARASAMY,M.; BELLA, D.; RENUKA, S.; KOWNHAR,H.; SUNITI,S.; RAJAN,R.;RAO.U.A. Pneumonia and pleural effusion due to *Cryptococcus laurentii* in a clinically proven case of AIDS. **J Clin Microbiol.**v.3.p.33.2009.

SHI,M.; LI,S.S.; ZHENG,C; JONES, G.J.; KIM,K.S.; ZHOU,H.; KUBES,P.; MODY,C.H. Real-time imaging of trapping and urease-dependent transmigration of *Cryptococcus neoformans* in mouse brain. **J Clin Invest.**v.3;120(5);p.1683-1693.2010.

SHOHAM, S.; LEVITZ, S.M. The immune response to fungal infections. **British J Hemat** v.129. p.569-582, 2005.

SILVA, JO, CAPUANO, DM. Ocorrência de *Cryptococcus* spp e de parasitas de interesse em saúde pública, nos excretas de pombos na cidade de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v.67(2),p.137-141, 2008.

SINDRIM, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B. **Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica.** 1ª ed. Guanabara Koogan, 1999.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Candidíase. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 25, p. 265-274. 2004.

SIONOV, E.; HYESEUNG, L.; CHANG, Y. C.; KNON-CHUNG, K. *Cryptococcus neoformans* Overcomes Stress of Azole Drugs by Formation of Disomy in Specific Multiple Chromosomes. **J Pathog.** v.5,p.5-9.2010.

SLAVIKOVA,E.; VADKERTIOVA,R. The diversity of yasts inthe agricultural soil. **J Basic Microbiol.** v.43,p. 430-436.2003.

SOARES, MCB, PAULA, CR, DIAS, ALT, CASEIRO, MM, COSTA, SOP. Environmental strains of *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* in the city of Santos, SP, Brasil. **Rev Inst Med Trop**, São Paulo; v.47,p.31-36.2005.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE INFECTOLOGIA. Notícias on-line. Disponível em: <<http://www.infectologia.org.br>>. Acesso em 15 de março de 2011.

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

SPITZER, E. D.; SPITZER, S. G. Use of a dispersed repetitive DNA element to distinguish clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. **J Clin Microbiol**. v.30, n.5, p.1094-7.1992.

SPITZER, S.G.; SPITZER, E. D.; Characterization of the CNRE-1 family of repetitive DNA elements in *Cryptococcus neoformans*.**Gene**. v.24, n.144(1), p.103-6.1994.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; RADONJIC, I.; DIMITRIJEVIC, V. and ŠVABIC-VLAHOVIC, M. Ground red hot pepper agar in the isolation and presumptive identification of *Cryptococcus neoformans*. **Mycoses**, v.45,p. 384–388.2002.

SUGITA,T.; TAKASHIMA,M.; IKEDA,R.;NAKASE,T.; SHINODA,T. Intraspecies diversity of *Cryptococcus albidus* isolated from humans as revealed by sequences of the internal transcribed spacer regions. **Microbiol Immunol**.v.45,p.291-297.2001.

TAY, S.T.; CHAI, H.C.; NA, S.L.; HAMIMAH, H.; ROHANI, M.Y.; SOO-HOO, T.S. The isolation, characterization and antifungal susceptibilities of *Cryptococcus neoformans* from bird excreta in Klang Valley, Malaysia. **Mycopathol**, v. 159, p. 509-13,2005.

TAY, S. T., NA, S. L.; TAJUDDIN, T. H. Natural occurrence and growth reaction on canavanine–glycine–bromothymol blue agar of non-*neoformans* *Cryptococcus* spp in Malaysia. **Mycoses**, v.51, p. 515–519.2008.

TRILLES, L.; LAZERA, M.; WANKE, B.; THEELEN, B.; BOEKHOUT, T. Genetic characterization of environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex from Brazil. **Med Mycol**, v.1, n.5, p.383-90. 2003.

TRINDADE, R.C.; RESENDE, M.A.; SILVA, C.M.; ROSA, C.A. Yeasts associated with fresh and frozen pulps of Brazilian tropical fruits. **Syst Appl Microbiol**.v.43,p.294-300.2002.

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**. v, 99,p.3165-3170.2002.

VIVALDINI, S.M. **Tipagem molecular de isolados seqüenciais de *Cryptococcus neoformans* de pacientes da região de São José de Rio Preto e correlação com sensibilidade à drogas antifúngicas.** Dissertação. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara. 2003.

WARNOCK, D.W. Fungal diseases: an evolving public health challenge. **Med Mycol**.;v.44,p.697–705.2006.

WILDSTEIN, M.S.; MARTIN S.M. Jr; GLASER, J.A. Cryptococcal osteomyelitis in a 20-year-old male with sarcoidosis. **Spine J**.;v.5(4),p.467-70.2005.

WILSON, C.L.; WISNIEWSKI, M.E.; DROBY, S.; CHALUTZ, E. A selection strategy for microbial antagonist to control postharvest diseases of fruits and vegetables. **Sci Hortic**.v.53,p.183-189.1993.

XIUJIAO X, XU Ai'e. Two cases of cutaneous cryptococcosis. **Mycoses.** v.48,p.238-41. 2005.

ZARAGOZA, O.; CASADEVALL, A. Experimental modulation of capsule size in *Cryptococcus neoformans*. **Biol Proced Online.** v.6, p.10-15. 2004.

ANEXO

Anexo. PROTOCOLO DE IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS

AMOSTRA Nº _____.

DATA ____/____/____.

1. TINTA DA CHINA:

CRESCIMENTO 25° () 30° () 37° ()

2. FENOLOXIDASE: positivo () negativo ()

3. UREASE: positivo () negativo ()

4. CGB: () verde () azul

5. ASSIMILAÇÃO CARBONO: DATA DE LEITURA ____/____/____.

Dextrose ()	Lactose ()	Celobiose ()	Rafinose ()
Maltose ()	Galactose ()	Inositol ()	Trealose ()
Sacarose ()	Melibiose ()	Xilose ()	Dulcitol ()

6. ASSIMILAÇÃO NITROGÊNIO: DATA DE LEITURA ____/____/____.

Peptona () KNO₃ ()

7. ANTIFUNGIGRAMA:

Anfotericina B – _____ Sensível (>10) Intermediário ou Resistente (≤ 10).

cetoconazol - _____ Sensível (>20) Intermediário (20-10) Resistente (< 10).

Fluconazol - _____ Sensível (>19) Intermediário (19-14) Resistente (<14).

Itraconazol - _____ Sensível (≥20) Intermediário (19-12) Resistente (≤ 11).

Agente:

Variedade:

8. DADOS DO PACIENTE:

Prontuário:

Nome:

Endereço;

HIV: positivo () negativo ()

Sintomatologia: