

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

LUDMILA DE MATOS BALTAZAR

FATORES DE VIRULÊNCIA E SUSCETIBILIDADE A DROGAS
ANTIFÚNGICAS DE CEPAS CLÍNICAS E AMBIENTAIS DE
Cryptococcus spp.

VITÓRIA
2009

LUDMILA DE MATOS BALTAZAR

FATORES DE VIRULÊNCIA E SUSCETIBILIDADE A DROGAS
ANTIFÚNGICAS DE CEPAS CLÍNICAS E AMBIENTAIS DE
Cryptococcus spp.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro Biomédico da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências – Patologia Geral das Doenças Infecciosas.

Orientador(a): Prof^a Dra. Mariceli Araújo

VITÓRIA
2009

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

B197p Baltazar, Ludmila de Matos, 1983-
Fatores de virulência e suscetibilidade a drogas antifúngicas de
cepas clínicas e ambientais de *Cryptococcus* spp. / Ludmila de
Matos Baltazar. – 2009.
135 f. : il.

Orientador: Mariceli Araújo Ribeiro.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Espírito
Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. *Cryptococcus neoformans*. 2. *Cryptococcus gattii*. 3.
Criptococose. 4. Fosfolipase. 5. Fenol-Oxidase. 6. Genótipo. 7.
Suscetibilidade. 8. Meio ambiente. I. Ribeiro, Mariceli Araújo. II.
Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da
Saúde. III. Título.

CDU: 61



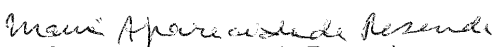
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS
MESTRADO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO


A mestranda LUDMILA DE MATOS BALTAZAR, apresentou dissertação intitulada: "FATORES DE VIRULÊNCIA E SUSCETIBILIDADE A DROGAS ANTIFÚNGICAS DE CEPAS CLÍNICAS E AMBIENTAIS DE *Cryptococcus* spp." em sessão pública, como requisito final para obtenção do título de **Mestre em Ciências – Patologia Geral das Doenças Infecciosas**, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

Considerando a apresentação oral dos resultados, a qualidade e relevância dos mesmos, a Comissão Examinadora da Dissertação decidiu, **aprovar sem restrições**, a dissertação e habilitar a bióloga LUDMILA DE MATOS BALTAZAR a obter o Grau de MESTRE EM CIÊNCIAS – PATOLOGIA GERAL DAS DOENÇAS INFECCIOSAS.

Vitória-ES, 16 de março de 2009


Prof.^a Dr.^a Maria Aparecida de Resende


Prof. Dr. Moises Palaci


Prof.^a Dr.^a Mariceli Araújo Ribeiro
(Orientadora)



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Vitória-ES, 09 de março de 2006

Do: Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde

Para: Profa. Mariceli Araújo Ribeiro
Pesquisadora Responsável pelo Projeto de Pesquisa intitulado: **“Criptococose:
Aspectos Clínicos e Laboratoriais”**

Senhora Pesquisadora,

Através deste informamos à V.Sa., que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, após analisar o Projeto de Pesquisa intitulado: **“Criptococose: Aspectos Clínicos e Laboratoriais”**, cumprindo os procedimentos internos desta Instituição, bem como as exigências das Resoluções 196 de 10.10.96, 251 de 07.08.97 e 292 de 08.07.99, APROVOU o referido projeto, em reunião ordinária realizada em 08 de março de 2006.

Gostaríamos de lembrar que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar os relatórios parciais e finais de acordo com a resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196 de 10/10/96, inciso IX.2. letra “c”.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa
Centro Biomédico / UFES

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, em primeiro lugar;

À Fundação de Apoio à Ciência e Tecnologia do Espírito Santo (FAPES), pelo apoio financeiro;

Aos Profs. Ian, Rodrigo, Liliana, Suely e Elenice pela ajuda e suporte técnico;

A todos os professores do Núcleo de Doenças Infecciosas, pelos ensinamentos passados ao longo do curso;

Ao Claudiney Biral Santos, funcionário do Núcleo de Entomologia da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), pelo apoio nas colheitas de material de árvores;

A toda equipe, em especial Idenir e Mauro, e colegas do Laboratório de Micologia pela ajuda e compreensão;

As colegas Luciana, Letícia e Simone, pelo auxílio quando necessitei;

Ao colega Thiago Vicentini pelo auxílio na identificação das espécies de árvores pesquisadas no estudo;

À minha amiga Karla Paresque, pelo apoio e palavras de incentivo;

À Dra Márcia Lazera pela doação de cepas padrão;

A minha família, pelo apoio incondicional;

Em especial à minha orientadora e professora, mestra, Mariceli, que soube me orientar e compreender com sapiência nos momentos difíceis do nosso trabalho.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Eliemar Flório Baltazar e
Tânia de Matos Baltazar e minhas irmãs
Larissa e Lorena Baltazar, amo vocês.

RESUMO

A criptococose é uma micose sistêmica e a meningoencefalite é a sua manifestação clínica mais grave e mais comum. As principais espécies envolvidas na etiologia são *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. A ecologia destas espécies não é ainda bem conhecida, *C. neoformans* tem como habitat, fezes de aves, principalmente pombos e *C. gattii* é comumente associada a árvores. A presença de *C. gattii* foi investigada em diferentes regiões do Estado do Espírito Santo e foi encontrada em apenas duas (0,7%) das 209 amostras de árvores analisadas enquanto *C. neoformans* foi isolado em 9 (17%) das 54 amostras de excrementos de aves analisadas. A ocorrência de *Cryptococcus neoformans* (63 isolados) tanto em amostras ambientais como clínicas foi maior que a de *Cryptococcus gattii* (4 isolados). No total, 67 isolados, clínicos e ambientais, de *C. neoformans* e *C. gattii*, foram analisados e todos foram sensíveis as drogas voriconazol (VCZ) e anfotericina B (AMB). Para a droga itraconazol (ITZ), 82% foram sensíveis (S), 18% sensível-dose-dependente (SDD) e para fluconazol (FCZ), 75% S, 24% SDD e 1% resistente (R). Considerando a origem dos isolados, o perfil de suscetibilidade foi semelhante entre os de origem clínica e os ambientais. Entre os azólicos, o voriconazol foi o fármaco que apresentou maior atividade e o fluconazol o que apresentou menor atividade *in vitro*. Não foi observada resistência cruzada entre voriconazol e fluconazol. Quanto à produção da enzima fosfolipase, 84% dos isolados apresentaram produção alta e apenas 3% não produziram a enzima. Todos os 67 isolados mostraram atividade da enzima fenoloxidase, sendo 71% com atividade baixa e nenhum com atividade negativa. Produção mais baixa da fosfolipase e níveis mais altos de atividade da fenoloxidase foram observados em cepas isoladas de pacientes HIV-positivos. Todas as cepas clínicas e ambientais de *C. neoformans* pertenceram ao genótipo VNI e todas *C. gattii* ao genótipo VGII. Esses resultados revelaram semelhança no padrão genético, perfil de suscetibilidade a drogas e produção das enzimas extracelulares, fosfolipase e fenoloxidase, entre isolados ambientais e clínicos e confirmam que a infecção pode ocorrer a partir de fontes ambientais.

ABSTRACT

The cryptococcosis is a systemic mycosis, which the meningoencephalitis is the most severe and most common clinical manifestation. The main species involved in your etiology are *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. The ecology of these species is not well, known, *C. neoformans* has the excrement of birds, mainly pigeons, as its principal habitat and *C. gattii* is commonly associate to the trees. The presence of *C. gattii* was investigated in different regions of Espirito Santo State and it was found in only two (0,7%) of the 209 samples of trees analyzed whereas *C. neoformans* was isolated in 9 (17%) of the 54 pigeon excrements analyzed. The occurrence of *C. neoformans* (63 isolates) at both clinical and environmental samples was higher than *C. gattii* (4 isolates). In the total, 67 isolates, clinical and environmental, of *C. neoformans* and *C. gattii*, were analyzed and all of then were sensitive to the voriconazole (VCZ) and amphotericin B (AMB). For the drug itraconazole (ITZ), 82% were sensitive (S), 18% sensitive-dose-dependent (SDD) and for fluconazole (FCZ), 75% S, 24% SDD and 1% resistant (R). Considering the origin of the isolates, the susceptibility profile was similar between the clinical and environmental origin. Among the azoles, the VCZ was the drug that showed higher activity and FCZ which showed less activity in vitro. There was no cross-resistance between FCZ and VCZ. Regard the production of the phospholipase enzyme, 84% of the isolates had high production and only 3% showed no production of the enzyme. All the 67 isolates showed activity of phenoloxidase enzyme, being 71% low and none of then with negative activity. Lower production of phospholipase and higher phenoloxidase activity were observed in strains isolated from HIV-pos. All the clinical and environmental strains of *C. neoformans* belonged to genotype VNI and all *C. gattii* to VGII genotype. These results showed similarity in the genetic pattern, susceptibility profile of the drugs and production of extracellular enzymes, phospholipase and phenoloxidase between environmental and clinical isolates and confirm that the infection can be from environmental source.

LISTA DE FOTOGRAFIAS

| | | |
|---------------|--|-----|
| Fotografia 01 | Processamento das amostras ambientais coletas com colheres e/ou espátulas..... | 112 |
| Fotografia 02 | Coletas das amostras ambientais com swabs..... | 112 |
| Fotografia 03 | Colônias de <i>Cryptococcus</i> spp. em agar Níger..... | 113 |
| Fotografia 04 | Colônias de <i>Cryptococcus</i> spp. em agar Sabourad dextrose..... | 113 |
| Fotografia 05 | Visualização de <i>Cryptococcus</i> spp. ao microscópio ótico com tinta nankin..... | 113 |
| Fotografia 06 | <i>Cryptococcus</i> spp. cultivado em meio CGB..... | 114 |
| Fotografia 07 | Teste de suscetibilidade de um isolado de <i>C. neoformans</i> | 114 |
| Fotografia 08 | Produção de pigmento escuro por um isolado de <i>C. neoformans</i> e não produção por um isolado de <i>C. albicans</i> , em agar DOPA..... | 114 |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-----------|---|----|
| Figura 1 | Perfil de suscetibilidade de todos os isolados de <i>Cryptococcus</i> spp. de origem clínica e ambiental aos fármacos ITZ, FCZ, AMB e VCZ..... | 50 |
| Figura 2 | Perfil de suscetibilidade dos isolados clínicos e ambientais de <i>C. neoformans</i> as drogas itraconazol, fluconazol, anfotericina B e voriconazol..... | 51 |
| Figura 3 | Perfil de suscetibilidade das cepas clínicas e ambientais de <i>C. gattii</i> às drogas itraconazol, fluconazol, anfotericina B e voriconazol | 52 |
| Figura 4 | Perfil de produção da enzima fosfolipase entre todos os isolados, clínicos e ambientais, de <i>Cryptococcus</i> spp. | 53 |
| Figura 5 | Perfil de produção da enzima fosfolipase dos isolados de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> , de acordo a origem clínica ou ambiental..... | 54 |
| Figura 6 | Produção de fosfolipase pelos isolados de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> originados de pacientes HIV positivos e HIV negativos | 55 |
| Figura 7 | Produção de fosfolipase entre os isolados de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> ambientais | 55 |
| Figura 8 | Perfil da atividade da enzima fenoloxidase para os isolados, clínicos e ambientais de <i>Cryptococcus</i> spp..... | 56 |
| Figura 9 | Perfil de atividade da fenoloxidase de acordo com a origem do isolado, clínica ou ambiental | 57 |
| Figura 10 | Atividade da fenoloxidase pelos isolados originados de pacientes HIV-positivos e HIV-negativos | 57 |
| Figura 11 | Atividade da fenoloxidase pelos isolados de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> originados de árvores e excrementos de aves | 58 |
| Figura 12 | Relação entre a produção da fosfolipase e formas clínicas da criptococose apresentadas pelos pacientes | 60 |
| Figura 13 | Relação entre a atividade da fenoloxidase e formas clínicas da criptococose apresentadas pelos pacientes | 60 |

| | |
|-----------|--|
| Figura 14 | Relação entre a produção da fosfolipase, atividade da fenoloxidase e as formas clínicas da infecção criptocócica apresentada pelos pacientes61 |
| Figura 15 | Proporção de <i>C. gattii</i> e <i>C. neoformans</i> entre os isolados de origem ambiental e clínica62 |
| Figura 16 | Identificação molecular dos isolados ambientais e clínicos de <i>Cryptococcus</i> spp.62 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-----------|---|-----|
| Tabela 1 | Locais de coleta de excrementos de aves para pesquisa de <i>Cryptococcus</i> spp. | 40 |
| Tabela 2 | Locais de coletas e espécies de árvores analisadas para pesquisa de <i>Cryptococcus</i> spp. | 41 |
| Tabela 3 | Locais de coleta no Estado do ES e espécies de árvores analisadas onde as amostras foram positivas para pesquisa de <i>Cryptococcus</i> spp..... | 49 |
| Tabela 4 | Locais de coleta de excrementos de aves onde as amostras foram positivas para pesquisa de <i>Cryptococcus</i> spp..... | 50 |
| Tabela 5 | Valores das CIM ₅₀ e CIM ₉₀ das drogas anfotericina B, fluconazol, itraconazol e voriconazol para os isolados de <i>C. neoformans</i> | 52 |
| Tabela 6 | CIMs de <i>C. gattii</i> e <i>C. neoformans</i> de acordo com a origem do isolado. | 53 |
| Tabela 7 | Produção de fosfolipase e atividade da fenoloxidase de acordo com a espécie e origem do isolado de <i>Cryptococcus</i> spp. | 59 |
| Tabela 8 | Isolamento de <i>C. neoformans</i> no Brasil e em diferentes partes do mundo a partir de excrementos de aves. | 95 |
| Tabela 9 | Isolamento ambiental de <i>Cryptococcus gattii</i> no Brasil. | 95 |
| Tabela 10 | Isolamento, a partir de material de árvores, de <i>Cryptococcus gattii</i> e <i>C. neoformans</i> em diferentes regiões geográficas do mundo. . | 96 |
| Tabela 11 | Identificação bioquímica de <i>Cryptococcus</i> spp. de origem clínica..... | 97 |
| Tabela 12 | Identificação bioquímica de <i>Cryptococcus</i> spp. de origem ambiental. | 99 |
| Tabela 13 | Resultados do teste de suscetibilidade das amostras de origem ambiental | 101 |
| Tabela 14 | Resultados do teste de suscetibilidade das amostras de origem clínica de <i>C. neoformans</i> | 101 |
| Tabela 15 | Resultados do teste de suscetibilidade das amostras de origem clínica e ambiental de <i>C. gattii</i> | 103 |

| | | |
|-----------|--|-----|
| Tabela 16 | Medida semi-quantitativa da produção da enzima fosfolipase de <i>Cryptococcus</i> spp. de origem ambiental. | 104 |
| Tabela 17 | Medida semi-quantitativa da produção da enzima fosfolipase de <i>Cryptococcus</i> spp. de origem clínica. | 105 |
| Tabela 18 | Avaliação da atividade da fenoxidase de <i>Cryptococcus</i> spp. de origem clínica. | 107 |
| Tabela 19 | Avaliação da atividade da fenoxidase de <i>Cryptococcus</i> spp. de origem ambiental. | 109 |
| Tabela 20 | Relação entre as características apresentadas pelos isolados clínicos e a evolução da criptococose. | 110 |
| Tabela 21 | Relação entre óbitos ocorridos de acordo com as formas clínicas e os níveis de produção da fosfolipase e atividade fenoxidase..... | 111 |

LISTA DE SIGLAS

AMB – Anfotericina B
CCZ – Centro de Controle de Zoonoses
CIM – Concentração Inibitória Mínima
dc – diâmetro da colônia
dh – diâmetro do halo
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
DO – Densidade Ótica
DOPA – Dihidroxifenilalanina
ES – Espírito Santo
FCZ – Fluconazol
FIOCRUZ – Fundação Osvaldo Cruz
FUNASA – Fundação Nacional de Saúde
g – grama
GXM – Glicoronoxyلمانانا
HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana
HIV-pos – HIV-positivo
HIV-neg – HIV-negativo
HUCAM – Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes
ITZ – Itraconazol
LPTA – Lisofosflipase transaciclase
LPL – Lisofosfolipase
M – Molar
M. AMB – Meio Ambiente
mL – mililitros
mM – Milimolar
MOPS – Ácido 2-[N-morfolino] – propanosulfônico
MT / ES – Ministério do Trabalho do Espírito Santo
N - Normalidade
nm – nanômetro
pH – Potencial de Hidrogênio
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
PLB – Fosfolipase

PSJC – Pet Shop situado em Jardim Camburi

Pz – média entre diâmetro da colônia e o diâmetro do halo

R – Resistente

RAPD – DNA polimórfico Amplificado Aleatoriamente

RPM – Rotações por Minuto

S – Sensível

SDD – Sensível Dose Dependente

SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

SNC – Sistema Nervoso Central

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral - alfa

UE – Unidade de Enzima

UFES – Universidade Federal do Espírito Santo

UV – Ultra Violeta

VCZ – Voriconazol

μg – Microgramas

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 19 |
| 1.1. COMPLEXO <i>CRYPTOCOCCUS</i> | 19 |
| 1.2. CRIPTOCOCOSE | 20 |
| 1.3. HABITAT E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE <i>CRYPTOCOCCUS</i> spp..... | 21 |
| 1.3.1. Ocorrência de <i>C. neoformans</i> no meio ambiente | 22 |
| 1.3.2. Ocorrência de <i>C. gattii</i> no meio ambiente | 25 |
| 1.4. FATORES DE VIRULÊNCIA | 27 |
| 1.4.1. Cápsula | 28 |
| 1.4.2. Crescimento a 37° C | 28 |
| 1.4.3. Mating Type | 29 |
| 1.4.4. Enzima fosfolipase | 29 |
| 1.4.5. Enzima fenoloxidase | 30 |
| 1.5. SUSCETIBILIDADE A DROGAS ANTIFÚNGICAS | 32 |
| 1.6. EPIDEMIOLOGIA COM BASE NA BIOLOGIA MOLECULAR | 35 |
| 2. OBJETIVOS | 38 |
| 2.1. OBJETIVO GERAL..... | 38 |
| 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 38 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 39 |
| 3.1. TIPO DE ESTUDO | 39 |
| 3.2. LOCAL | 39 |
| 3.3. COMISSÃO DE ÉTICA | 39 |
| 3.4. MICRORGANISMOS | 39 |
| 3.5. LOCAIS DE COLETA DAS AMOSTRAS AMBIENTAIS | 40 |
| 3.5.1. Coleta e processamento de material proveniente de árvores | 42 |
| 3.5.2. Coleta e processamento de excrementos fecais | 42 |
| 3.6. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS EM NÍVEL DE GÊNERO E ESPÉCIE | 43 |
| 3.7. DIFERENCIAÇÃO BIOQUÍMICA DAS ESPÉCIES <i>C. neoformans</i> E <i>C.</i> <i>gattii</i> | 43 |
| 3.8. TESTE DE SUSCETIBILIDADE A DROGAS ANTIFÚNGICAS | 44 |

| | | |
|----------------|---|-----------|
| 3.9. | DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DA ENZIMA FOSFOLIPASE | 45 |
| 3.10. | DETECÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA FENOLOXIDASE | 46 |
| 3.11. | TIPAGEM MOLECULAR DAS CEPAS DE <i>C. neoformans</i> E <i>C. gattii</i> ... | 47 |
| 3.11.1. | Extração de DNA | 47 |
| 3.11.2. | Amplificação do DNA e determinação de genótipos | 48 |
| 4. | RESULTADOS | 49 |
| 4.1. | LEVANTAMENTO AMBIENTAL | 49 |
| 4.2. | LEVANTAMENTO CLÍNICO | 50 |
| 4.3. | TESTE DE SUSCETIBILIDADE DE <i>C. neoformans</i> E <i>C. gattii</i> | 50 |
| 4.4. | DETECÇÃO DE FATORES DE VIRULÊNCIA | 53 |
| 4.4.1. | Produção da enzima fosfolipase | 53 |
| 4.4.2. | Atividade da enzima fenoloxidase | 56 |
| 4.5. | PRODUÇÃO E ATIVIDADE DAS ENZIMAS E AS CONDIÇÕES CLÍNICAS APRESENTADAS PELOS PACIENTES | 59 |
| 4.6. | IDENTIFICAÇÃO DOS GENÓTIPOS | 61 |
| 5. | DISCUSSÃO | 63 |
| 6. | CONCLUSÕES | 76 |
| 7. | REFERÊNCIAS | 77 |
| 8. | ANEXOS | 95 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. COMPLEXO CRYPTOCOCCUS

O gênero *Cryptococcus* spp. engloba mais de 30 espécies que se caracterizam morfológicamente por apresentarem-se na forma de levedura esférica, possuir cápsula, não formar pseudohifas em condições de indução *in vitro*, reproduzem-se assexuadamente por brotamento (STEENBERGEN; CASADEVALL, 2003).

Bioquimicamente, sabe-se que as espécies do gênero não fermentam açúcares, hidrolizam o amido, produzem urease e assimilam inositol (KURTZMAN; FELL, 1998). Fisiologicamente, algumas espécies são capazes de tolerar desde baixas temperaturas ambientais à temperatura corpórea dos mamíferos (37°C). (STEENBERGEN; CASADEVALL, 2003).

As leveduras do complexo *Cryptococcus* podem formar hifas verdadeiras durante reprodução sexuada mas não são consideradas fungos dimórficos verdadeiros porque a fase filamentosa é apenas transitória, surgido após fusão entre dois *mating types*: a e α e resultando no estágio sexuado do fungo denominado *Filobasidiella* spp. (RODRIGUES; ALVIANO; TRAVASSOS, 1999).

As espécies patogênicas do gênero *Cryptococcus* são diferenciadas em bases epidemiológicas, bioquímicas, fisiológicas, ecológicas e moleculares e atualmente são classificadas em duas espécies e quatro sorotipos: *Cryptococcus neoformans* variedade *grubii* (sorotipo A), *Cryptococcus neoformans* variedade *neoformans* (sorotipo D) e *Cryptococcus gattii* (sorotipo B e C) (ABEGG *et al.*, 2006; LITVINTSEVA *et al.*, 2007; NISHIKAWA *et al.*, 2003).

A diferenciação antigênica das cepas do complexo *Cryptococcus* ocorre de acordo com epitopos existentes no polissacarídeo capsular, denominado glicoronoxilomanana (GXM), que é sintetizado tanto *in vivo* quanto *in vitro*. (LITVINTSEVA *et al.*, 2007; NISHIKAWA *et al.*, 2003).

Os sorotipos B e C (*C. gattii*) são hábeis em infectar e causar doenças em hospedeiros imunocompetentes enquanto que os sorotipos A e D (*C. neoformans*) ocorrem em pacientes imunocomprometidos, principalmente naqueles infectados pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (SOARES *et al.*, 2005).

Litvintseva *et al.* (2007) explicam que o sorotipo AD é um híbrido das variedades A e D. Diferentemente do que se pensava, a infecção por esse sorotipo parece ser comum. Em estudo, realizado na América do Norte, foi relatado que 7,5% dos isolados ambientais eram sorotipo AD (LITVINTSEVA *et al.*, 2005). Na Europa, Dromer *et al.* (2007) observaram que 30% dos isolados pertenciam também a esse sorotipo.

No Brasil a presença do sorotipo AD foi relatada por Nishikawa *et al.* (2003), isolado tanto em amostras de origem clínica como ambientais.

1.2. CRIPTOCOCOSE

A criptococose, micose causada pelo fungo *Cryptococcus* spp., principalmente pelas espécies *C. neoformans* e *C. gattii*, é adquirida pela inalação de propágulos do fungo do meio ambiente. Embora a porta de entrada no hospedeiro humano seja o pulmão, o fungo apresenta tropismo pelo Sistema Nervoso Central (SNC), onde causa quadro grave de meningoencefalite, após disseminação hematogênica, podendo ainda atingir outros órgãos internos e tecido cutâneo (BICANIC; HARRISON, 2005; ENG; BISHBURG; SMITH, 1986; MITCHELL, PERFECT, 1995).

É fundamentalmente uma infecção oportunística, ocorrendo com grande frequência em pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), portadores de doenças hematológicas e também em indivíduos aparentemente não imunocomprometidos, portadores de cirrose, diabetes, sarcoidose ou com relatos de uso de corticosteróides (BICANIC; HARRISON, 2005; MITCHELL; PERFECT, 1995).

A patogênese da doença caracteriza-se pela chegada do fungo até os espaços alveolares e a progressão para as formas sintomáticas dependerá basicamente da competência das células de defesa do hospedeiro, do número e da virulência de células fúngicas inaladas. Mecanismos imunológicos, através da ativação de macrófagos, normalmente são suficientes para uma satisfatória e protetora resposta do hospedeiro. Contudo, a presença de cápsula e componentes de parede celular do fungo podem tornar a resposta imunológica ineficaz, permitindo a infecção pulmonar em graus de extensão variáveis, bem como a subsequente disseminação do fungo para o tecido cutâneo, ossos, próstata ou, especialmente para o sistema nervoso central (BICANIC; HARRISON, 2005; BULMER; TAKER, 1975; POWELL *et al.*, 1972).

Não se tem idéia da extensão com que ocorre a doença no mundo todo. Sabe-se que após a era dos transplantes e da epidemia de SIDA e antes da introdução dos atuais antiretrovirais, sua freqüência aumentou de maneira significativa. Estimava-se que pelo menos um terço dos pacientes com SIDA apresentavam a micose na forma de meningoencefalite (MITCHELL; PERFECT, 1995).

1.3. HABITAT E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE *CRYPTOCOCCUS* spp.

Cryptococcus neoformans foi isolado inicialmente do meio ambiente, de suco de pêssago obtido de um mercado local na Itália (BOVERS; HAGEN; BOEKHOUT, 2008; RANDHAWA; KOWSHIK; KHAN, 2003). Desde então se tem estudado seus locais de ocorrência na natureza visando à delimitação dos possíveis habitats das espécies patogênicas e permitindo, assim, a análise de sua distribuição no mundo.

Acredita-se que a disseminação desta levedura na forma de basidiósporos ou células leveduriformes desidratadas ocorra por meio de aerossóis (TRILLES *et al.*, 2003).

1.3.1. Ocorrência de *C. neoformans* no meio ambiente

C. neoformans variedade *neoformans* (sorotipo D), embora tenha distribuição mundial, aparentemente é mais comum na Europa, onde mais de 30% dos casos de criptococose são causados por essa variedade (BOVERS; HAGEN; BOEKHOUT, 2008). Seu isolamento já foi informado em algumas regiões tais como Suíça, Alemanha, Áustria (TINTELNOT; SCHÄR; POLAK, 2001), França (DROMER *et al.*, 1996) e nos Estados Unidos (LITVINTSEVA *et al.*, 2005). No Brasil, o estudo de Nishikawa *et al.* (2003) demonstrou que sua ocorrência é baixa, apenas 0,3% dentre os isolados clínicos. Essa variedade também foi encontrada em Minas Gerais, em árvores: *C. peltophoroides* e *A. peregrina* (REIMÃO *et al.*, 2007).

No entanto, *C. neoformans* variedade *grubii* (sorotipo A) tem extensa distribuição no mundo e tem sido isolado em vários locais na natureza. Com maior frequência ele é isolado de locais habitados por aves, principalmente pombos (LAZERA; WANKE; NISHIKAWA, 1993). Abegg *et al.* (2006) afirmam que tanto a variedade *grubii* quanto a *neoformans*, podem ser encontradas também em excrementos de psitacídeos habitantes de zoológicos, lojas de animais e gaiolas privadas. Relatos de isolamento de *C. neoformans* variedade *grubii* de amostras ambientais no Brasil e outros países indicam um índice de positividade de isolamento de 13% a 100% (PASSONI, 1999).

Apesar de excrementos de aves serem os principais reservatórios ambientais desse patógeno, é sabido que elas não adquirem a criptococose, mediante ao fato da levedura não se multiplicar na temperatura corporal apresentada por elas, em torno de 42 °C. Entretanto, a levedura é capaz de resistir à passagem pelo trato intestinal, podendo sobreviver em fezes úmidas ou secas protegidas de radiação até dois anos (LITVINTSEVA *et al.*, 2005; ROSARIO; ACOSTA; COLOM, 2008).

A íntima associação entre a ocorrência de *C. neoformans* e excrementos de pombos ocorre devido a vantagens seletivas que esse habitat oferece ao fungo uma vez que fezes ricas em compostos nitrogenados parece ser uma excelente

fonte de nutrientes e fator de persistência do fungo na natureza (ABEGG *et al.*, 2006; LITVINTSEVA *et al.*, 2005; ROSARIO; ACOSTA; COLOM, 2008).

Abegg *et al.* (2006) relataram a presença de *C. neoformans* variedade *grubii* em 87% das 55 amostras analisadas. Todas consistiam em excrementos de psitacídeos mantidos, sozinhos, em gaiolas existentes no Jardim Zoológico de Sapucaia do Sul, Rio Grande do Sul. Tal variedade também foi obtida de material fecal de pombos, coletados em diferentes regiões da cidade de Santos, São Paulo (SOARES *et al.*, 2005). Resultado semelhante foi exposto por Kobayashi *et al.* (2005) em Goiânia, Goiás, onde a variedade foi encontrada em 36 (47%) das 177 amostras de fezes de pombos coletadas.

Sua presença também foi relatada por Montenegro e Paula (2000) que analisando amostras de excrementos de pombos observaram que a variedade ocorria em 26% (10 dos 38) dos locais selecionados no centro de São Paulo onde havia contaminação por fezes de pombos.

Essa variedade pode também ser encontrada no solo, madeira em decomposição, vegetais, frutas (MONTENEGRO; PAULA, 2000) e em serragem de árvores tropicais (RANDHAWA; KOWSHIK; KHAN, 2003).

No norte da Jordânia, das 509 amostras de fezes de pombos coletadas nas cidades de Aman, Irbid, Jerrash e Ajlun, o *C. neoformans* foi encontrado em 9 (1,8%). Entretanto, devido ao baixo número de amostras positivas foi considerado raro nessa região (HAMASHA *et al.*, 2004).

O *C. neoformans* variedade *grubii* (sorotipo A) também foi isolado de excrementos de pombos no Kathmandu, Nepal (PAL, 1997), Seoul, Coréia (CHEE; LEE, 2005) e Malásia (TAY *et al.*, 2005).

Na Europa já foi relatado o isolamento, a partir de amostras ambientais, de *C. neoformans* sorotipos A, D e AD na Espanha, (BARÓ *et al.*, 1999) e na Itália, onde foram isolados somente os sorotipo A e D (GARCIA - HERMOSO *et al.*, 1997).

A ocorrência da variedade *grubii* já foi informada em quase todos os continentes do globo e mais recentemente ela tem sido encontrada também em material proveniente de vegetais. Na Índia, das 498 amostras de material derivado de árvore, 4 (0,8%) foram positivas para *C. neoformans* variedade *grubii*. Essas foram coletadas de árvores das espécies: *Butea monosperma*, *Tamarindus indica* e *Eucaliptus* spp. (RANDHAWA; MUSSA; KHAN, 2001).

Na Europa, Bauwens *et al.* (1986) relataram encontrar *C. neoformans* variedade *grubii* na Bélgica em todas as amostras retiradas de dentro de oco do tronco das árvores próximas a um aviário do Jardim Zoológico de Antwerp.

No Brasil, *C. neoformans* variedade *grubii* foi isolado em 1993 de madeira em decomposição dentro de oco de *Syzygium jambolana* (LAZERA; WANKE; NISHIKAWA, 1993). Em 1996, ocorreu isolamento em ocos de outras espécies de árvores como: *Cassia grandis*, *Senna multijuga* e *Ficus microcarpa* (LAZERA *et al.*, 1996). Desde então, levantamentos em vários estados brasileiros têm sido realizados com intenção de encontrar outros habitats que propiciem abrigo para o fungo.

C. neoformans variedade *grubii* foi ainda encontrado na região nordeste em Teresina, Piauí, num levantamento realizado por Lazera *et al.* (2000). Nesse estudo a presença dessa variedade foi relatada apenas em material de árvores da espécie *Cassia grandis*. Em duas dessas árvores ele foi isolado juntamente com a espécie *gattii* (LAZERA *et al.*, 2000).

Um levantamento que objetivava obter dados epidemiológicos e ecológicos acerca dos sorotipos de *Cryptococcus* que ocorrem no Brasil, observou-se que entre as 80 cepas ambientais avaliadas, o sorotipo A é freqüente no sul, sudeste e centro-oeste e que o sorotipo B é predominante no norte e nordeste (NISHIKAWA *et al.*, 2003), onde é considerado endêmico, afetando principalmente crianças e jovens imunocompetentes (CALLEJAS *et al.*, 1998; TRILLES *et al.*, 2008).

1.3.2. Ocorrência de *C. gattii* no meio ambiente

Como *C. neoformans*, a espécie *C. gattii* é também reconhecida como agente primário da criptococose (TRILLES *et al.*, 2003). Sua distribuição geográfica por muito tempo foi considerada restrita a regiões tropicais e subtropicais (ABEGG *et al.*, 2006; LAZERA *et al.*, 2000; NISHIKAWA *et al.*, 2003) entretanto, esse paradigma, atualmente foi quebrado, uma vez que foi relatada a ocorrência de *C. gattii* na ilha de Vancouver, Canadá, indicando uma deriva ambiental desta espécie e possibilidade dessa levedura adaptar-se a novos ambientes (STEPHEN *et al.*, 2002; TRILLES *et al.*, 2008).

Seu isolamento já ocorreu a partir de amostras advindas da cavidade oral de animais nativos e domésticos da Austrália, incluindo ovelhas, cavalos, papagaio-cinza-africano (SORREL *et al.*, 1996a), cachorros, gatos (MALIK *et al.*, 1998) e coalas (CONNOLLY *et al.*, 1999). Vilcins *et al.* (2002) acreditam que esses animais sejam os possíveis vetores de transmissão que introduziram o *C. gattii* nestas regiões. Raramente o *C. gattii* é isolado de excrementos de aves (ABEGG *et al.*, 2006).

A espécie *C. gattii* assim como *C. neoformans* é capaz de produzir fenoloxidase, uma enzima envolvida na degradação da lignina da madeira. Sendo este o fator chave que permite essas espécies colonizarem madeira, principalmente em avançado estágio de decomposição (VILCINS *et al.*, 2002; WILLIAMSON, 1994; ZHU *et al.*, 2001).

C. gattii foi isolado do ambiente pela primeira vez em 1990 por Ellis e Pfeiffer, na Austrália, em espécies de *Eucalyptus camaldulensis* (VILCINS *et al.*, 2002). Posteriormente descobriu-se que ele ocorria abaixo do dossel dessa espécie de eucalipto em épocas de florescência. Estudos realizados fora desse período não acusaram a presença do fungo, sugerindo então, que sua ocorrência possa ser sazonal e associada com períodos de floração (MONTENEGRO; PAULA, 2000). Tais fatos despertaram outros estudos visando determinar outros vegetais como possíveis habitats para essa levedura.

Com isto, outras espécies de eucaliptos foram descobertas como hospedeiras: *E. tereticornis* (PFEIFFER; ELLIS, 1992), *E. blakelyi*, *E. gomphocephala* e *E. rudis* (PFEIFFER; ELLIS, 1996) e uma espécie irmã de eucalipto a *Angophora costata* (HALLIDAY *et al.*, 1996).

Vilcins *et al.* (2002) ao analisar 10 espécies de árvores, encontrou *C. gattii* em duas pertencentes à espécie *Syncarpia glomulifera* e em outra árvore, não identificada. Todas se situavam na área mais urbanizada da região do parque nacional de *Blues Mountain*, Sideney, Austrália (VILCINS *et al.*, 2002).

Na Índia, essa variedade foi encontrada em tres árvores da espécie *Eucalyptus camaldulensis*, num estudo em que foram testadas amostras provenientes das espécies: *E. camaldulensis*, *E. citriodora* e *E. tereticornis* (CHAKRABARTI *et al.*, 1997). Randhawa, Kowshik e Khan (2003) encontraram em Delhi/Nova Delhi, também na Índia, *C. gattii* em *Syzygium cumini* e *Ficus religiosa*, mas devido ao baixo índice de positividade foi considerado negativo a ocorrência desta espécie associada a eucaliptos nessa região.

Na Europa em um levantamento realizado na Itália, Montagna *et al.* (1997) isolaram *C. gattii* de detritos de *E. camaldulensis*.

Na Columbia Britânica, Canadá, de 732 amostras de origem ambiental ele foi encontrado em 58 (8%). As amostras derivaram de árvores de *Alluns* spp., *Cedrus* spp., *Pseudotsuga* spp. e outras não identificadas. Foram isoladas também cepas provenientes do ar e solo próximos às árvores (KIDD *et al.*, 2004). A espécie foi também foi isolada nos Estados Unidos por Pfeiffer e Ellis (1991) em amostras retiradas de *E. camaldulensis*.

Na América Central foi encontrado no México por Licea, Garza e Zuniga (1996) quando foram analisados detritos de plantas (tronco, folhas e solo) de *E. tereticornis*.

Na América de Sul foi encontrado na Colômbia por Callejas *et al.* (1998) em detritos de *Terminalia catappa* e em Buenos Aires, Argentina, em amostras retiradas de *Eucalyptos* spp. (DAVEL *et al.*, 2003).

Na região nordeste do Brasil, Lazera *et al.* (2000) num estudo realizado em Teresina, Piauí, encontraram esta espécie em 3 ocos de árvores, uma pertencente à espécie *Moniqueta tomentosa* e duas da espécie *Cassia grandis*, sendo que em duas destas árvores *C. gattii* foi isolado juntamente com *C. neoformans*.

Na região sudeste, foi encontrado no parque de Ibirapuera, São Paulo, em amostras retiradas de eucalipto no mês de novembro tanto do ano de 1996 como 1997 (MONTENEGRO; PAULA, 2000).

No Rio Grande do Sul foi isolado por Abegg *et al.* (2006), onde dos 38 isolados de *Cryptococcus* spp. encontrados em material fecal de pássaros mantidos em cativeiro no Jardim Zoológico de Sapucaia do Sul, 5 (13%) foram identificados como *C. gattii*.

1.4. FATORES DE VIRULÊNCIA

Steenbergen *et al.* (2003) definem virulência como uma característica do microrganismo expressa somente em hospedeiro suscetível. Já fatores de virulência são definidos por Kozel (1995) como produtos moleculares que habilitam o microrganismo a sobreviver no hospedeiro e causar doenças.

A patogênese da criptococose envolve ações multifatoriais de diferentes fatores de virulência (KOZEL, 1995), dentre os quais se pode citar a produção da cápsula, *mating type*, crescimento a 37°C, síntese de melanina e produção de enzimas extracelulares como fosfolipase e fenoloxidase (BOVERS; HAGEN; BOEKHOUT, 2008; McCLELLAND; BERNHARDT; CASADEVALL, 2006).

A contribuição desses atributos na evolução da doença, em muitos casos, está relacionada à sobrevivência da levedura no hospedeiro (KOZEL, 1995) e seu estudo pode contribuir para o entendimento da evolução da infecção assim

como auxiliar no desenvolvimento de vacinas e drogas antimicrobianas (McCLELLAND; BERNHARDT; CASADEVALL, 2005).

1.4.1. Cápsula

A cápsula das leveduras do complexo *Cryptococcus* é composta principalmente pelo polissacarídeo glicoronoxylnanana, também responsável pela diferenciação antigênica dos sorotipos (STEENBERGEN; CASADEVALL, 2003). A expressão da cápsula foi o primeiro fator de virulência a ser definitivamente associado com a capacidade do fungo em produzir doença (KOZEL, 1995). Num estudo publicado em 1967, Bulmer, Sans e Gunn (1967) demonstraram que cepas induzidas a falharem na produção de cápsula tornavam-se não virulentas em camundongos e, uma vez o fenótipo restabelecido, estas se tornaram virulentas novamente.

Acredita-se que a cápsula promova a adaptação do fungo ao hospedeiro (STEENBERGEN; CASADEVALL, 2003) inibindo sua fagocitose por macrófagos. Os polissacarídeos liberados pela cápsula, durante a fagocitose, podem causar danos no hospedeiro, os quais podem resultar na alteração do metabolismo de água no fluído cérebro espinhal, levando ao aumento da pressão intracraniana, dores de cabeça, mudanças na visão e até mesmo a morte (STEENBERGEN; CASADEVALL, 2003).

1.4.2. Crescimento a 37° C

Para iniciar uma infecção sistêmica, qualquer microrganismo deve ser capaz de crescer no hospedeiro (MITCHELL; PERFECT, 1995). Estudos com mutante de *C. neoformans* sensível a temperaturas altas demonstram que esses têm sua virulência atenuada (BOVERS; HAGEN; BOEKHOUT, 2008).

Embora *C. neoformans* e *C. gattii* apresentem capacidade de crescimento a 37° C (STEENBERGEN; CASADEVALL, 2003), nem todas as leveduras do gênero *Cryptococcus* são hábeis em crescer nessa temperatura (MITCHELL; PERFECT, 1995). À temperatura de 41° C, essas leveduras são inibidas ou

mortas, sendo esta temperatura de restrição determinante para a patogenicidade. Tanto *C. neoformans* como *C. gattii* apresentam bom crescimento a 37° C, embora a temperatura ótima de crescimento para ambas as espécies seja entre 30 e 35 °C (BOVERS; HAGEN; BOEKHOUT, 2008; MITCHELL; PERFECT, 1995).

1.4.3. Mating Type

Apesar de reproduzirem-se assexuadamente, ambas espécies *C. neoformans* e *C. gattii* possuem também sistema com dois *mating type*: a e α . Para que esse tipo de reprodução ocorra é necessário que haja encontro de dois *mating types* opostos (BOVERS; HAGEN; BOEKHOUT, 2008)

O *mating type* α apresenta maior prevalência tanto em amostras clínicas como ambientais (BOVERS; HAGEN; BOEKHOUT, 2008; CASALI *et al.*, 2003; STEENBERGEN; CASADEVALL, 2003). Essa maior prevalência do *mating type* α sugere que ele tenha vantagem seletiva permitindo maior sobrevivência do fungo no meio ambiente e possivelmente também maior virulência (KOZEL, 1995).

Estudos de infecção de camundongos com cepas apresentando variação somente em relação ao *mating type*, mostrou que o *mating type* α é significativamente mais virulento que o a (KWON-CHUNG *et al.*, 1992).

1.4.4. Enzima fosfolipase

É conhecida a produção da enzima fosfolipase por algumas espécies de fungos, como *Penicillium notatum* (SAITO; SUGATANI; OKUMURA, 1991) e *Candida albicans* (VIDOTTO *et al.*, 1997). Em espécies do gênero *Cryptococcus*, sua produção foi primeiro relatada por Vidotto *et al.* (1997) e posteriormente, endossada por Chen *et al.* (1997) ao detectar sua produção em 49 (98%) de 50 cepas estudadas.

Nesse mesmo trabalho Chen *et al.* (1997), ao infectar camundongos Balb/c com cepas de alta, intermediária e baixa produção de fosfolipase, observaram correlação entre a produção da enzima e virulência, uma vez que cepas com alta produção foram associadas com alta carga infecciosa quando comparadas com as de baixa produção. Cox *et al.* (2001) também associaram a produção da enzima com virulência, pois ao induzir mutação no gene *PBL1* que codifica a fosfolipase e com posterior infecção em camundongos observaram que as cepas selvagens, ou seja, sem mutação, eram mais virulentas que as cepas mutantes.

Atualmente, sabe-se que fosfolipases constituem um grupo heterogêneo de enzimas com atividade de fosfolipase B (PLB), lisofosfolipase (LPL) e lisofosfolipase transacilase (LPTA) (COX *et al.*, 2001). De maneira geral essas enzimas são hábeis em hidrolisar um ou mais ésteres ligados a glicerofosfolipídios (COX *et al.*, 2001). Ainda não é claro como essas enzimas contribuem na patogênese, mais é sabido que elas facilitam a invasão através de barreiras ricas em fosfolipídios, como membranas celulares (COX *et al.*, 2001). Sendo assim, as ações das fosfolipases podem resultar, dentre outras, na desestabilização de membranas e lise celular (COX *et al.*, 2001; GHANNOUM, 2000). Além disso, acredita-se que a ação dessas enzimas resulte em lise das células fagocitárias e degradação da membrana do fagossomo liberando a célula do fundo no citoplasmo do fagossomo (SCHMIE; MILLER, 1999).

1.4.5. Enzima fenoloxidase

Em 1962 Staib observou que, quando semeado em agar acrescido com semente de Níger, as colônias de *C. neoformans* apresentavam coloração marrom. O mecanismo pelo qual ocorria a produção de pigmento, no entanto, não havia sido estabelecido ainda (STAIB, apud POLACHECK; HEARING; KWON-CHUNG, 1982). Foi sugerido que a melanina era o pigmento produzido, porque, quando semeado em agar batata-cenoura, *C. neoformans* também crescia com coloração marrom (STAIB, apud POLACHECK; HEARING; KWON-CHUNG, 1982). Desde então a detecção da melanina em meio de

cultura tem sido utilizada para isolamento e identificação desse microrganismo em laboratórios de análises clínicas (STEENBERGEN; CASADEVALL, 2003).

Hoje é sabido que a melanina é um pigmento carregado negativamente, resistente a degradação ácida (STEENBERGEN; CASADEVALL, 2003). Tanto *C. neoformans* como *C. gattii* secretam a fenoloxidase, enzima dependente de cobre, catalisador da formação do pigmento melanina, quando estes microrganismos crescem em substratos contendo compostos fenólicos (RODRIGUES; ALVIANO; TRAVASSOS, 1999), incluindo dihidroxifenilalanina (DOPA), dopamina, noroepinefrina e epinefrina (STEENBERGEN; CASADEVALL, 2003).

Atualmente a síntese de melanina é considerada também um fator de virulência, sua importância reside no fato de proteger a célula fúngica da ação fagocitária de macrófagos, servindo como um anti-oxidante (BLACKSTOCK *et al.*, 1999). Liu, Tewari e Williamson (1999) defendem a capacidade da fenoloxidase de atuar como uma ferro oxidase, pois os resultados de seu estudo demonstraram que a atividade da enzima permite que o fungo escape dos mecanismos de defesa do hospedeiro através da oxidação do ferro II à ferro III, o qual pode diminuir a formação de radical hidroxil e assim inativar os mecanismos de morte celular.

Além disso, ela inibe a produção de TNF- α , citocina importante para desencadeamento da resposta imune mediada por células (BLACKSTOCK *et al.*, 1999). Estudos *in vitro* demonstram que a melanina realça a virulência através da redução da suscetibilidade do fungo aos mecanismos de resposta imunitária do hospedeiro (STEENBERGEN; CASADEVALL, 2003). É possível perceber então, que a produção de melanina quando em grande escala, resulta em cepas de *C. neoformans* e *C. gattii* com vantagens seletivas quanto à virulência (BLACKSTOCK *et al.*, 1999).

A relação entre a melanogênese e virulência tem sido extensivamente estudada, sendo importante fonte informação sobre como um microorganismo pode utilizar substâncias próprias do hospedeiro para modular sua resposta imunitária (CASADEVALL; ROSAS; NOSANCHUK, 2000).

Em 1982, Rhodes, Polacheck e Kwon-Chung (1982) observaram a relação entre o fenótipo melanina e virulência após inoculação em camundongo, seus resultados mostraram que isolados produtores de melanina produziam maior mortalidade em camundongos que os não produtores.

Polacheck, Platt e Aronovitch (1990), demonstraram que o *C. neoformans* é capaz sobreviver no tecido cerebral devido a sua habilidade de utilizar catecolaminas durante a melanogênese. Tal fato permite a levedura neutralizar ou prevenir os efeitos prejudiciais das catecolaminas quando estas são oxidadas na presença de íons metal e peróxido de hidrogênio (POLACHECK; PLATT; ARONOVITCH, 1990). A habilidade do fungo em utilizar neurotransmissores (epinefrina e dopamina) como substrato para síntese de melanina pode justificar seu neurotropismo (STEENBERGEN; CASADEVALL, 2003).

Sendo *C. neoformans* e *C. gattii* microrganismos existentes em diferentes nichos no meio ambiente (STEENBERGEN; CASADEVALL, 2003) é possível que fiquem expostos à radiação ultravioleta (UV) (CASADEVALL; ROSAS; NOSANCHUK, 2000). Estudos *in vitro* demonstram que células desses fungos produtoras de melanina são menos suscetíveis aos efeitos da radiação UV (CASADEVALL; ROSAS; NOSANCHUK, 2000).

1.5. SUSCETIBILIDADE A DROGAS ANTIFÚNGICAS

A alta incidência de infecções fúngicas em pacientes HIV-positivos tem aumentado a utilização de fármacos azólicos, tanto no tratamento como em ações profiláticas (ALLER *et al.*, 2000). A maioria dos pacientes com SIDA (75-90%) infectados com *C. neoformans* desenvolve meningoencefalite, que é a mais importante manifestação clínica (ALLER *et al.*, 2000). A espécie *C. gattii*, assim como *C. neoformans*, afeta o sistema respiratório e SNC, mas diferentemente acomete principalmente indivíduos imunocompetentes (TRILLES *et al.*, 2004).

A atual terapia de combate a criptococose, tanto por *C. neoformans* como por *C. gattii*, baseia-se na utilização de anfotericina B associada à flucitocina além do uso de azólicos como fluconazol e itraconazol, em monoterapia ou combinados entre si (BICANIC *et al.*, 2006; SAAG *et al.*, 2000; SOUZA *et al.*, 2005). Barchiesi *et al.* (2000), afirmam que a combinação de triazólicos com anfotericina B é significativamente mais ativa que a utilização de somente uma droga.

A anfotericina B é um poliênico que exerce seu efeito nas células fúngicas danificando a membrana celular através da ligação a esteróides (ergosterol) presentes em sua superfície. Essa droga pode também funcionar com um imunomodulador uma vez que promove a liberação de óxido nítrico e afeta a liberação de citocinas (BICANIC *et al.*, 2006; NOSANCHUK *et al.*, 1999a).

O fluconazol é um triazólico solúvel em água enquanto que itraconazol é um triazólico lipofílico (BARCHIESI *et al.*, 2000). Ambos atuam prevenindo a biossíntese de ergosterol fúngico através da inibição específica e seletiva da lanosterol 14-alfa demetilase, enzima pertencente à superfamília do citocromo p450 (BARCHIESI *et al.*, 2000). Têm ação fungistática para a levedura (NOSANCHUK *et al.*, 1999a).

O voriconazol é um novo triazólico derivado do fluconazol que atua também inibindo a formação do ergosterol. *In vitro*, tem mostrado boa atividade contra a levedura (VAN DUIN *et al.*, 2004).

O teste de suscetibilidade de isolados clínicos e ambientais a drogas pode ser importante para avaliar os perfis de suscetibilidade dos isolados de uma mesma área geográfica (SOUZA *et al.*, 2005).

No Brasil (São Paulo), Soares *et al.* (2005) ao estudarem onze cepas de *C. neoformans* variedade *grubii*, de origem ambiental, encontram um isolado resistente a fluconazol e sensível a itraconazol, anfotericina B e voriconazol. Silva *et al.* (2008) após análise de 35 isolados clínicos de *C. neoformans* e *C. gattii* detectaram dois isolados resistentes ao itraconazol e dois resistentes a anfotericina B.

Moraes, Prímola e Hamdan em 2003, após estudo da suscetibilidade de 64 isolados, clínicos e ambientais, a itraconazol, fluconazol, anfotericina B e flucitocina, não encontraram diferenças significativas nas concentrações inibitórias mínimas (CIMs) das drogas avaliadas para os isolados de ambas as origens (MORAES; PRÍMOLA; HAMDAN, 2003).

O estudo da suscetibilidade de 27 isolados ambientais de *C. neoformans* variedade *neoformans* realizado na Turquia por Yildiran *et al.* mostrou que voriconazol e itraconazol apresentaram atividade antifúngica semelhante e com CIMs menores que aquelas detectadas para anfotericina B, fluconazol e flucitosina (YILDIRAN *et al.*, 2000).

Na Espanha, a análise de 83 isolados ambientais de *C. neoformans* variedade *grubii* revelou que todos foram sensíveis a anfotericina B, embora três apresentaram-se resistentes ao itraconazol e quatro ao fluconazol (MORERA-LÓPEZ *et al.*, 2005).

Estudos de *C. neoformans* realizados na África e no Camboja revelaram que as drogas voriconazol, fluconazol e anfotericina B apresentaram boa atividade *in vitro* contra isolados desta região (CHANDENIER *et al.*, 2004).

A avaliação da suscetibilidade de 80 isolados clínicos realizado em Nairobi, África, mostrou que 97,5% apresentavam-se sensíveis a anfotericina B e 61,3% sensíveis ao itraconazol. Já em relação ao fluconazol, somente 23,8% dos isolados foram sensíveis, 65% sensíveis dose dependente e 11,2% resistentes. O estudo atribuiu o aumento da resistência ao fluconazol, principalmente a seu uso profilático e ao aumento dos casos de SIDA na África sub-Saariana (BII *et al.*, 2007).

A redução da suscetibilidade de cepas de *C. neoformans* ao fluconazol já foi notificada por outros autores principalmente em isolados obtidos de pacientes com SIDA (BICANIC *et al.*, 2006). Essa redução é atribuída ao uso indiscriminado da droga na terapia de longa duração (TORRES-RODRÍGUEZ *et al.*, 2008)

Aller *et al.*(2007) em um estudo realizado na Espanha, no entanto, informam o oposto, uma vez que a avaliação de isolados em períodos de tempos diferentes (1994-96 e 1997-2005) não apresentavam alteração significativa na suscetibilidade ao fluconazol (ALLER *et al.*, 2007).

1.6. EPIDEMIOLOGIA COM BASE NA BIOLOGIA MOLECULAR

Estudos que visam relacionar a distribuição dos fungos *C. neoformans* e *C. gattii* no meio ambiente com a sua ocorrência clínica são importantes para traçar o perfil epidemiológico da criptococose a fim de prevenir a população suscetível do contado com possíveis fontes de contágio. O primeiro caso de criptococose humana diretamente atribuída ao contato com excrementos de aves foi relatado por Littman e Borok em 1959 (LITTMAN; BOROK, 1968). Passoni *et al.* (1998), também relataram a existência de uma associação entre a ocorrência de criptococose em pacientes com SIDA e o fato de habitarem em locais onde aves estão presentes. Em 1989, Ellies e Pfeiffer isolaram *C. gattii* de *Eucalyptus camaldulensis* e relataram que a distribuição da levedura correspondeu aos casos clínicos avaliados no estudo (ELLIS; PFEIFFER, 1990).

Na tentativa de encontrar associação entre a ocorrência do fungo no meio ambiente e a criptococose humana, as técnicas de biologia molecular têm sido de muita valia (VAN BELKUM, 1994).

Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) é uma das técnicas que permite avaliar a similaridade genética entre as cepas do complexo *Cryptococcus* (AOKI *et al.*, 1999). Seu mecanismo é baseado na amplificação de DNA polimórfico através da seleção de um único *primer* e da reação em cadeia da polimerase (PCR) para gerar cópias da seqüência de interesse. Diferenças na distância entre os locais de ligação do *primer* resultam em produtos com seqüências de DNA de diferentes tamanhos (bandas), após a amplificação. Estas diferenças são detectadas através da separação das bandas no gel durante eletroforese e permitem a distinção entre as cepas do complexo *Cryptococcus* (VAN BELKUM, 1994).

Meyer *et al.* (1999), propuseram a tipagem molecular de *Cryptococcus* spp. através do PCR *fingerprinting* que utiliza como *primer* uma seqüência obtida do “core” do fago M13 para detectar seqüências minissatélites hipervariadas existentes no genoma da levedura (VASSART *et al.*, 1987). Este protocolo permitiu a separação dos isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* em oito grandes grupos moleculares. Os genótipos correspondentes ao *C. neoformans* são: VNI e VNII representando o sorotipo A, VNIII representando o sorotipo AD e VNIV representando o sorotipo D. Já o *C. gattii* é em subdividido em VGI, VGII e VGIII para o sorotipo B e VGIV para o sorotipo C (MEYER *et al.*, 1999).

Na Austrália o estudo de 61 isolados clínicos e 49 ambientais (isolados de eucaliptos e outras árvores) de *C. gattii* revelou que 92% dos clínicos pertenciam ao genótipo VGI e 100% dos ambientais isolados de eucaliptos, eram VGI, além disso, três clínicos e um ambiental de outra árvore que não o eucalipto foi VGII e apenas um isolado clínico foi VGIII (SORRELL *et al.*, 1996b).

Na Índia, o genótipo VNI mostrou-se predominante ocorrendo em 89% dos 57 isolados clínicos, os genótipos VNIV e VGII também foram encontrados, com porcentagens de 2% e 9% respectivamente (JAIN *et al.*, 2005).

Em Barcelona, Espanha, o tipo VNI ocorreu em todos os 22 isolados escolhidos randomicamente para genotipagem, todos foram provenientes de amostras do solo misturadas a excrementos de pombos (MORERA-LÓPEZ *et al.*, 2005).

Nos Estados Unidos, das três cepas ambientais de *C. gattii* obtidas de espécies de eucalipto, os genótipos VGI, VGII e VGIII ocorreram em igual porcentagem (SORRELL *et al.*, 1996b).

Na América Latina, Meyer *et al.* (2003), ao estudarem 304 cepas de *Cryptococcus* spp. do Brasil, Argentina, Chile, Colômbia, México, Peru, Venezuela, Guatamela e Espanha, encontraram o genótipo VNI em 68,2% dos isolados e o genótipo VNII, em pequena proporção (5,6%) seguido do genótipo VNIII (sorotipo AD) com 4,1% e do VNIV, com 1,8%. Já o genótipo

VGI foi encontrado em 3,5% dos isolados, VGII, em 6,2%, VGIII em 9,1% e VGIV em 1,5% (MEYER *et al.*, 2003). O Brasil participou do estudo com 66 cepas. Dessas 82,3% foram VNI, 3% VNII e 13,6% VGII (MEYER *et al.*, 2003). Casali *et al.* (2003) ao estudar 105 cepas clínicas e 19 ambientais relataram que o genótipo VNI era o mais comum na região sul do Brasil (89,3%), seguido pelo genótipo VGI (8,9%) e VNIV (7,3%), ao qual pertenciam todos os isolados obtidos de *Eucalyptus* spp. O estudo de Abegg *et al.* (2006), no Rio Grande do Sul, relatou que todos os *C. neoformans* variedade *grubii* foram VNI, já os *C. gattii*, VGI.

Em um estudo, com intuito de obter um panorama da distribuição geográfica do fungo no Brasil, foi encontrado que, de 443 isolados de *C. neoformans* e *C. gattii*, o genótipo VNI foi o tipo molecular mais comum (64%), seguido do VGII (21%); VNII (5%); VGIII (4%); VGI e VGIV (3% cada) e VNIII (menos que 1%). O estudo revelou ainda que o genótipo VGII ocorreu predominantemente na macro região nordeste, e o VNI na macro região sudeste (TRILLES *et al.*, 2008).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Estabelecer características fenotípicas e moleculares de cepas clínicas e ambientais de *Cryptococcus* spp. no Estado do Espírito Santo.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Isolar e identificar as espécies pertencentes ao gênero *Cryptococcus* spp. isoladas de amostras ambientais (de árvores e de locais habitados por pombos).
- ✓ Isolar e identificar todos os isolados de *Cryptococcus* spp. obtidos nos laboratórios de Análises Clínicas do Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes (HUCAM) e no Laboratório de Diagnóstico Micológico da UFES.
- ✓ Determinar a suscetibilidade *in vitro*, pelo método Etest, das cepas ambientais e clínicas às drogas convencionalmente indicadas para o tratamento da criptococose: fluconazol, itraconazol, voriconazol e anfotericina B,
- ✓ Avaliar a produção da enzima fosfolipase e a atividade da enzima fenoloxidase dos isolados clínicos e ambientais de *Cryptococcus* spp.
- ✓ Aplicar técnicas de biologia molecular para avaliar o grau de similaridade genética das cepas ambientais e clínicas de *C. neoformans* e de *C. gattii*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. TIPO DE ESTUDO

- Estudo descritivo, prospectivo e retrospectivo

3.2. LOCAL

- O estudo foi realizado no Laboratório de Diagnóstico Micológico da UFES.

3.3. COMISSÃO DE ÉTICA

- O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa / CBM / UFES em 09 de março de 2006.

3.4. MICRORGANISMOS

A) Ambientais:

- Consistiram de 8 isolados obtidos de amostras retiradas de detritos e ocos de árvores em avançado estado de decomposição e de 11 isolados obtidos de excrementos de aves, destes, 9 estavam sendo mantidos congelados a -80 e os demais, obtidos durante o período deste estudo.

B) Clínicos:

- Consistiram de 51 isolados não duplicados, obtidos do laboratório de Análises Clínicas do HUCAM e do Laboratório de Diagnóstico Micológico da UFES. Diferentes materiais biológicos (sangue, líquido, raspado de pele) foram recebidos nos laboratórios para diagnóstico de infecções em geral. Destes isolados, 48 estavam sendo mantidos congelados a -80 e os demais, obtidos durante o período deste estudo. Os pacientes com amostras positivas residiam em diferentes municípios do Estado do Espírito Santo: Vitória, Vila Velha, Viana, Guarapará, Cariacica, Fundão, Serra, Santa Tereza, Marechal Floriano, Afonso Calúdio, Barra de São Francisco, Pedro Canário e um paciente originário da Bahia.

Isolados clínicos e ambientais obtidos entre 2005 e 2008 foram subcultivados em placas de agar Sabouraud-dextrose (BBL, Beckton Dickinson) (Anexo G, letra f; Anexo F, foto 04) incubadas a 35°C por 3 dias e também mantidos congelados a -80°C em água peptonada com 20% de glicerol (Anexo G, letra d).

3.5. LOCAIS DE COLETA DAS AMOSTRAS AMBIENTAIS

Os locais de coleta foram selecionados com base em observações de fatores de risco para a aquisição da criptococose pela população em geral: em áreas públicas de Vitória, ES habitadas por pombos e/ou com a presença de árvores em avançado estado de decomposição. Amostras de árvores de outras localidades do Estado do Espírito Santo, além da grande Vitória, também foram investigadas com o auxílio de funcionários da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). Os locais de coleta de excrementos de aves e de material de árvores estão listados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1 – Locais de coleta de excrementos de aves para pesquisa de *Cryptococcus* spp.

| Local | Tipo de material | Total de amostras coletadas |
|-------------------------|---|-----------------------------|
| Prédio público (SCM) | Excrementos de pombos | 7 |
| Prédio Público SETAS | Excrementos de pombos | 2 |
| Prédio Público (MT-ES) | Excrementos de pombos | 5 |
| Residência (AP próx PM) | Excrementos de pombos | 4 |
| Parque Moscoso | Excrementos de pombos | 5 |
| Prédio Público (CAIXA) | Excrementos de pombos | 2 |
| Prédio Público (INSS) | Excrementos de pombos | 4 |
| Prédio Público CODESA | Excrementos de pombos | 9 |
| Residência (RCJC) | Excrementos de pombos | 3 |
| Loja (PSJC) | Excrementos de agapornis, piriquito australiano, calopisita, canário belga. | 5 |
| Loja (CPM) | Excrementos de galinhas, pombos, codorna, peru, calopisita. | 2 |
| Prédio Público (HUCAM) | Excrementos de pombos | 3 |
| Parque Pedra de Cebola | Excrementos de pombos | 4 |

Tabela 2 - Locais de coleta e espécies de árvores analisadas para pesquisa de *Cryptococcus* spp.

| Local | Tipo de material | Total de amostras coletadas |
|--|---|-----------------------------|
| GRANDE VITÓRIA | | |
| Praça Vicente Guida | <i>Mangifera indica</i> (manga), <i>Cassia fistula</i> (chuva-de-ouro), <i>Licania tomentosa</i> (oiti) | 10 |
| Praça Costa Pereira | <i>Caesalpinia ferrea</i> (pau ferro), <i>Senna siamea</i> (cássia amarela), <i>Cassia ferruginea</i> (canafístula), <i>Tabebuia rosea</i> (ipê rosa), <i>Tabebuia impetiginosa</i> (ipê roxo), <i>Ficus</i> sp. (figueira) | 10 |
| Praça João Clímico | <i>Licania tomentosa</i> (oiti). | 10 |
| UFES Maruípe | <i>Pinus</i> sp. (pinheiro), <i>Ficus</i> sp. (figueira), <i>Mangifera indica</i> (manga) | 10 |
| UFES Goiabeiras | troncos de árvores em decomposição, <i>Licania tomentosa</i> (oiti), <i>Bauhinia variegata</i> (unha-de-vaca), <i>Caesalpinia ferrea</i> (pau ferro), <i>Senna siamea</i> (cássia amarela) | 15 |
| Bairro Jardim Camburí | <i>Bauhinia variegata</i> (unha-de-vaca), <i>Licania tomentosa</i> (oiti), <i>Persea gratissima</i> (abacaterio), <i>Caesalpinia peltophoroides</i> (sibipiruna), <i>Cestrum nocturnum</i> (dama-da-noite) | 15 |
| Parque Municipal Horto de Maruípe | <i>Chorisia speciosa</i> (paineira), <i>Caesalpinia echinata</i> (pau brasil) e <i>Tibouchina granulosa</i> (quaresmeira) | 20 |
| Parque Moscoso | <i>Delonix regia</i> (flamboyant), <i>Licania tomentosa</i> (oiti) | 15 |
| LOCAIS PRÓXIMOS A VITÓRIA | | |
| Parque Estadual Paulo César Vinha | Floresta Atlântica e Ecossistemas Costeiros (Floresta de Restinga) | 15 |
| Reserva Biológica de Duas Bocas | árvores de grande e médio porte da Floresta Atlântica (Mata de encosta) | 20 |
| REGIÃO SERRANA | | |
| Santa Teresa | árvores de grande e médio porte de Floresta Atlântica (floresta primária) | 10 |
| Santa Maria de Jetibá (Reserva dos Muriquís) | árvores de grande e médio porte da Floresta Atlântica | 20 |
| Itaguaçu | troncos de árvores em decomposição | 20 |
| Afonso Cláudio | troncos de árvores em decomposição da área preservada (Floresta Atlântica) | 20 |
| REGIÃO NORTE | | |
| Pedro Canário | troncos de árvores em decomposição e árvores de grande e médio porte da Floresta Atlântica | 20 |
| Sooretama (Reserva Biológica de Sooretama) | árvores de grande e médio porte da Floresta Atlântica e <i>Eucalyptus</i> spp. | 20 |
| Água Doce de Norte | Troncos de árvores em decomposição próximos a um galinheiro | 10 |
| REGIÃO SUL | | |
| Vargem Alta | árvores de grande e médio porte da Floresta Atlântica e troncos de árvores em decomposição | 15 |
| Rio Novo do Sul | <i>Mangifera indica</i> (manga), <i>Carica papaya</i> (pé-de-mamão), <i>Spondias mombin</i> (pé-de-cajá) e outras árvores frutíferas não identificadas | 15 |

3.5.1. Coleta e processamento de material proveniente de árvores

As coletas foram realizadas no período de 2005 a 2008 com auxílio de swabs e/ou com colheres. Os swabs de algodão foram montados e autoclavados dentro de tubo de ensaio. Em outro tubo, colocava-se com auxílio de pipeta, 3 mL de água estéril. No momento da coleta, o swab era retirado do tubo, umedecido e passado na superfície e ocos de árvore. Nesse momento era importante “sujar” o máximo possível o algodão com o material. Depois o swab era transferido para um tubo previamente identificado, contendo Meio de Transporte de Stuart (Anexo G, letra c; Anexo F, foto 02) (GRANADOS; CASTAÑEDA, 2005).

No laboratório, as amostras coletadas com swabs eram semeadas passando o mesmo na superfície da placa de petri com meio agar Níger ou Girassol (Anexo G, letra a) e, com auxílio da alça de platina, o material era distribuído na placa através de estrias, pela técnica do esgotamento. Nessa metodologia cada swab era passado em 10 placas de Petri.

Nas árvores que apresentavam ocos, colheres estéreis foram introduzidas nestes ocos e o material raspado era processado no laboratório segundo metodologia estabelecida por Staib (1962). Cerca de 2 gramas do material era adicionado a 100 mL de solução salina estéril, homogeneizado por 10 minutos em aparelho tipo vórtex (Anexo F, foto 01), decantado por 30 minutos e cerca de 1 mL do sobrenadante de cada amostra foi semeado em dez placas de agar Níger (Anexo G, letra a) ou Girassol (Anexo G, letra a) e incubadas por até cinco dias a 35°C.

3.5.2. Coleta e processamento de excrementos fecais

Parte das coletas de excrementos fecais foi realizada no período de junho a outubro de 2004 com o auxílio do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da Secretaria Municipal de Saúde de Vitória, ES. Os locais foram selecionados com base em observações de técnicos do referido órgão ou mediante denúncia da população. Cerca de 50g de excrementos de pombos foram retirados com

auxílio de instrumentos metálicos, tipo espátulas, transferidas para saco plástico, que foi devidamente identificado e lacrado. A pessoa responsável pelas coletas, o biólogo André Dutra da Silva Capezzuto, seguiu as normas de biossegurança vigentes, usando barreiras de proteção individual, como luvas e máscaras. Posteriormente, no período de 2005 a 2006 estas coletas foram continuadas pela mestrandia. O material fecal foi também processado de acordo com a metodologia para material de árvore, descrita no item anterior (STAIB, 1962).

3.6. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS EM NÍVEL DE GÊNERO E ESPÉCIE

A triagem inicial das espécies *C. neoformans* e *C. gattii* foi baseada na pesquisa da atividade da enzima fenoloxidase através de meios de cultura preparados com sementes de Níger (*Guizotia abyssinica*) (Anexo F, foto 03), de Girassol (*Heliantibus annuus*) ou com dihidroxifenilalanina (DOPA) (Anexo G, letra b). Todas as colônias de coloração marrom nesses meios foram repicadas para agar Sabouraud Dextrose (Difco) para posterior identificação de *Cryptococcus* spp., que foi baseada na detecção da enzima urease em Meio de Christensen (Anexo G, letra g), ausência de fermentação de carboidratos e perfil de assimilação de glicose, lactose, dulcitol rafinose, celobiose, rhaminose e melobiose (Anexo G, letra h), e da assimilação obrigatória de inositol como única fonte de carbono, além da ausência de assimilação de nitrato como fonte de nitrogênio inorgânico (Anexo G, letra i). Estudo das características micromorfológicas típicas destas espécies, como visualização de cápsula em preparação microscópica com tinta Nankin (Anexo F, foto 05), também foi realizado.

3.7. DIFERENCIAÇÃO BIOQUÍMICA DAS ESPÉCIES *C. neoformans* E *C. gattii*

Nesta etapa foi usado o meio CGB (Canavanina-Glicina-Azul de Bromotimol (Anexo G, letra e; Anexo F, foto 06) que permitiu a diferenciação das duas espécies entre si, uma vez que o *C. neoformans* é sensível a canavanina e não

assimila glicina como fonte de carbono, por isso permanecendo o meio na coloração original (amarelo) já o *C. gattii* é resistente à canavanina e utiliza glicina, crescendo no meio, alcalinizando e tornando-o azul na presença do indicador azul de bromotimol.

3.8. TESTE DE SUSCETIBILIDADE A DROGAS ANTIFÚNGICAS

Para avaliar o perfil de suscetibilidade dos isolados fúngicos as drogas: anfotericina B (AMB), itraconazol (ITZ), voriconazol (VCZ) e fluconazol (FCZ) realizou-se o método de difusão de droga em meio sólido, do tipo Etest, segundo instruções do fabricante (AB BIODISK, Suíça). O meio empregado foi o caldo RPMI 1640 com L-glutamina e sem bicarbonato (Gibco BRL), tamponado em pH 7.0 com ácido morfolino-propanosulfônico (MOPS) (Sgima), acrescido de 2% de glicose e de 2% de agar-agar (Difco) para obtenção do meio sólido (Anexo G, letra j). O controle de qualidade dos testes foi realizado com duas cepas padrão: *C. krusei* ATCC 20019 e *C. parapsilosis* ATCC 6258, cujas concentrações inibitórias mínimas (CIM) já estão bem definidas para vários antifúngicos.

O preparo da suspensão de inóculo ocorreu após incubação prévia das culturas por 48 horas a 35° C em placas de agar Sabouraud Dextrose (Difco). No momento do preparo da suspensão, cerca de 3 a 5 colônias bem isoladas foram adicionadas a cinco mililitros de água destilada estéril e agitada em aparelho tipo vórtex até total homogeneização. A concentração final da suspensão foi ajustada para transmitância entre 80-85% em espectrofotômetro e no comprimento de onda de 530 nanômetros.

Swabs estéreis eram umedecidos nesta suspensão e passados homogeneamente na superfície das placas. Após a secagem, as fitas Etest, com diferentes gradientes de drogas, foram aplicadas na superfície do meio. As fitas continham drogas com concentração variando entre 0,002 e 32 µg/mL para itraconazol, anfotericina B e voriconazol e entre 0,016 e 256 µg/mL para fluconazol. A leitura foi realizada após incubação a 35°C por 48 horas e as CIMs foram estabelecidas através da interceptação da zona elíptica inibitória

com a escala da fita contendo o antifúngico (Anexo F, foto 07). Os pontos de corte para determinação das CIMs foram determinados de acordo com o documento M27-A2 publicado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), antigo NCCLS, para drogas itraconazol e fluconazol. Para anfotericina B foi utilizado o critério sugerido por Nguryen e Yu (1998) e Lozano-Chiu *et al.* (1998) e para voriconazol seguiu-se os valores sugeridos por Pfaller *et al.* (2006). Seguem abaixo os critérios interpretativos para as drogas avaliadas:

→ Fluconazol:

- sensível: CIM $\leq 8 \mu\text{g/mL}$
- sensível dose-dependente: CIM 16 a $32 \mu\text{g/mL}$
- resistente: CIM $\geq 64 \mu\text{g/mL}$

→ Itraconazol:

- sensível: CIM $\leq 0,125 \mu\text{g/mL}$
- sensível dose-dependente: CIM 0,25 a $0,5 \mu\text{g/mL}$
- resistente: CIM $\geq 1 \mu\text{g/mL}$

→ Anfotericina B:

- resistentes: CIM $\geq 2 \mu\text{g/mL}$
- sensíveis: CIM $\leq 1 \mu\text{g/mL}$

→ Voriconazol:

- sensível: CIM $\leq 1 \mu\text{g/mL}$
- sensível dose-dependente: CIM = $2 \mu\text{g/mL}$
- resistente: CIM $\geq 4 \mu\text{g/mL}$

3.9. DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DA ENZIMA FOSFOLIPASE

As cepas de *Cryptococcus* spp., já previamente identificadas, foram semeadas em pontos distintos e equidistantes de placas de meio de cultura sólido

acrescido com emulsão de gema de ovo como fonte de fosfolipídeos (Anexo G, letra k). Após 6 dias de incubação à temperatura ambiente, foi feita a leitura dos diâmetros da colônia (dc) e dos diâmetros do halo (dh), correspondendo à zona de precipitação somada à colônia. O experimento foi realizado em triplicata para cada cepa. A produção de fosfolipase foi semi-quantificada através de valores de Pz, obtido de acordo com a relação dc/dh (PRICE *et al.*, 1982; POLAK, 1992). Foram estabelecidos os seguintes níveis de produção de enzima:

$Pz = 0,0$ _ produção negativa

$Pz \geq 0,66$ e $\leq 0,80$ _ produção baixa

$Pz \geq 0,51$ e $\leq 0,65$ _ produção intermediária

$Pz \leq 0,50$ _ produção alta

3.10. DETECÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA FENOLOXIDASE

Utilizou-se a metodologia proposta por Rhodes (1986) modificada: culturas de *Cryptococcus* spp. foram sub-cultivadas em 50 mL de caldo YNB preparado em tampão fosfato de sódio 1M, pH 7,0 (Anexo G, letra l) e adicionado de 2% de glicose. As culturas foram mantidas em agitação na velocidade de 120 rotações por minuto (RPM) por 24 horas a 30 °C e, em seguida, centrifugadas por 5 minutos a 4.000 RMP. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” com as células foi lavado com tampão fosfato de sódio 1M, pH 7,0 duas vezes e, posteriormente, as células foram resuspendidas em 50 mL do mesmo caldo YNB (porém, sem acréscimo de glicose) e incubadas a 30 °C por 18 horas em agitação na velocidade de 120 RPM. Seqüencialmente, a suspensão foi novamente centrifugada, o sobrenadante descartado e o “pellet” pesado em balança de precisão. Utilizava-se aproximadamente 0,100 g de células para cada cepa. As células foram transferidas com pipeta de Pasteur para *ependorf* e centrifugadas a 12 000 RPM por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e a essa quantidade de células foi adicionado, a frio, igual volume de pérolas de vidro lavadas em ácido (450-600nm) e 0,200 mL tampão fosfato de sódio 1M, pH 7,0. A suspensão foi agitada em *bead beater* por 45 segundos para romper

as células mecanicamente, seguida de centrifugação por 3 minutos 4 000 RPM e o sobrenadante retirado para outro *ependorf*. Nova quantidade (0,300 mL) de tampão fosfato 1M, pH 7,0 foi adicionada ao sobrenadante, seguida da adição de 0,050 mL de tolueno-etanol (Anexo G, letra n). Após incubação a frio por 90 minutos, 0,05 mL de DOPA 10 mM (Anexo G, letra m) foi adicionada a suspensão do *ependorf* e incubada também a frio por 60 minutos. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 480 nanômetros, após diluição de 1:5 da suspensão em tampão fosfato de sódio 1M, pH 7,0. Para calcular a atividade da enzima fenoloxidase foi seguida a fórmula: $(DO_{480} \text{ tratamento} - DO_{480} \text{ controle}) \times 5 \text{ (fator de diluição)} / 0,100g = UE/100mg$. Uma unidade de atividade da enzima correspondeu a uma mudança de 0,001 na leitura de absorbância a 480 nm. Como controle do experimento utilizou-se solução de DOPA 1,0 mM diluída 1:5 em tampão fosfato de sódio 1M, pH 7,0. Foram estabelecidos os seguintes níveis de produção de enzima (UE/100mg):

- atividade negativa: 0,0
- atividade baixa: ≥ 1 e $\leq 2\ 800$
- atividade intermediária: $\geq 2\ 801$ e $\leq 3\ 800$
- atividade alta: $\geq 3\ 801$ e $\leq 5\ 800$

3.11. TIPAGEM MOLECULAR DAS CEPAS DE *C. neoformans* E *C. gattii*

3.11.1. Extração de DNA

Foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Meyer *et al.* (1999). As cepas foram semeadas em agar Sabouraud Dextrose (Difco) e incubadas por 72 horas a 35° C. Cerca de 10 colônias foram transferidas com auxílio de alça descartável para *ependorf* contendo 0,600 mL de tampão de lise (Anexo H, letra e) e pérolas de vidro lavadas em ácido (450-600nm). As células foram rompidas por agitação a frio em aparelho *bead beater* e o material foi transferido para novo *ependorf* onde foi adicionado mesmo volume de fenol-clorofórmio-álcool-isoamílico. Após homogeneização em aparelho tipo vórtex, o material foi centrifugado em 12 000 RPM por 15 minutos e o sobrenadante foi

transferido para outro *ependorf*. Esse procedimento foi repetido por mais duas vezes e a fase aquosa, foi transferida para novo *ependorf* e adicionada de 0,300 mL de isopropanol mantido a -20°C. O material foi novamente centrifugado e o sobrenadante eliminado. Etanol a 70% (Anexo H, letra i) foi adicionado ao *pellet* para nova centrifugação e o sobrenadante foi também eliminado. Por fim o *pellet* foi deixado secando a temperatura ambiente. Estando o *pellet* seco, tampão TE (Anexo H, letra h) foi adicionado para sua homogeneização, e foi mantido congelado em freezer a -20 °C.

3.11.2. Amplificação do DNA e determinação de genótipos

Foi empregada a técnica de *fingerprinting* também proposta por Meyer *et al.* (1999), utilizando o DNA genômico de *C. neoformans* e *C. gattii* extraído no item anterior e o *primer* M13. As condições de PCR foram: 35 ciclos de 20 segundos de desnaturação a 94 °C; 1 minuto de anelamento a 50 °C e 20 segundos de extensão a 72 °C, todo o procedimento foi precedido por um único ciclo de desnaturação inicial a 94 °C por 3 minutos. O produto amplificado foi separado eletroforéticamente e fotografado. O padrão de bandas das cepas clínicas e ambientais de *C. neoformans* e *C. gattii* foi então comparado com aqueles de cepas padrão, com os oito genótipos bem definidos para cada espécie. Estas cepas foram gentilmente doadas pela Dra. Márcia Lazera da Fundação Osvaldo Cruz (FIOCRUZ).

4. RESULTADOS

4.1. LEVANTAMENTO AMBIENTAL

No período de estudo foram coletadas 290 amostras de árvores localizadas em vários locais públicos de Vitória, ES e em outras localidades do ES. No total, 9 (3,0%) destas amostras foram positivas para *Cryptococcus* spp., sendo 6 (2,0%) positivas para *C. neoformans*, 2 (0,7%) para *C. gattii* e 1 (0,3%) para *C. laurentii*. Os locais e as espécies de árvores avaliadas estão relacionados na tabela 3.

Tabela 3 - Locais de coleta no Estado do ES e espécies de árvores analisados onde as amostras foram positivas para pesquisa de *Cryptococcus* spp.

| Local | Tipo de material | Amostras positivas | Total de amostras coletadas |
|--|--|--------------------|-----------------------------|
| | GRANDE VITÓRIA | | |
| UFES Maruípe | <i>Pinus</i> sp. (pinheiro), | 1 | 10 |
| | REGIÃO SERRANA | | |
| Afonso Cláudio | tronco de árvore em decomposição da área preservada (Floresta Atlântica) | 2 | 20 |
| | REGIÃO NORTE | | |
| Pedro Canário | tronco de de grande e porte da Floresta Atlântica | 1 | 20 |
| Sooretama (Reserva Biológica de Sooretama) | árvores de grande e médio porte da Floresta Atlântica e <i>Eucalyptus</i> spp. | 3 | 20 |
| Água Doce de Norte | Troncos de árvores em decomposição próximos a um galinheiro | 2 | 10 |

Além de material de árvores, foram coletadas também 54 amostras de excrementos de pombos de vários locais públicos e de gaiolas com psitacídeos expostos em lojas de Vitória, ES que comercializam animais (tabela 4). No total, 11 (21%) foram positivas para *Cryptococcus* spp., sendo 9 (17%) para *C. neoformans* e 1 (2,0%) para *Cryptococcus laurentii* e 1 (2,0%) *Cryptococcus albidus*.

Tabela 4 – Locais de coleta de excrementos de aves onde as amostras foram positivas para pesquisa de *Cryptococcus* spp.

| Local | Tipo de material | Amostras positivas | Total de amostras coletadas |
|-------------------------|-----------------------|--------------------|-----------------------------|
| Prédio público (SCM) | Excrementos de pombos | 2 | 7 |
| Prédio Público (MT-ES) | Excrementos de pombos | 1 | 5 |
| Parque Moscoso | Excrementos de pombos | 2 | 5 |
| Prédio Público (CEF) | Excrementos de pombo | 1 | 2 |
| Prédio Público (CODESA) | Excrementos de pombos | 3 | 9 |

4.2. LEVANTAMENTO CLÍNICO

Foram obtidos 51 isolados clínicos de *Cryptococcus*, sendo 48 (94%) *C. neoformans* e 3 (6%), *C. gattii*. Todos os isolados da espécie *C. neoformans* foram obtidos de pacientes com infecção por HIV. Já para a espécie *C. gattii*, 2 (67%) ocorreu em pacientes sem infecção por HIV e um (33%) em pacientes com condição clínica não informada.

4.3. TESTE DE SUSCETIBILIDADE DE *C. neoformans* e *C. gattii*

Todos os 67 isolados, clínicos e ambientais, foram sensíveis *in vitro* a anfotericina B e voriconazol. Já para itraconazol, 55 (82%) dos isolados foram S, e 12 (18%) SDD. Para fluconazol, 50 (75%) foram S, 16 (24%) SDD e um (1%) (Figura 1; Anexo B; tabelas 11,12 e 13).

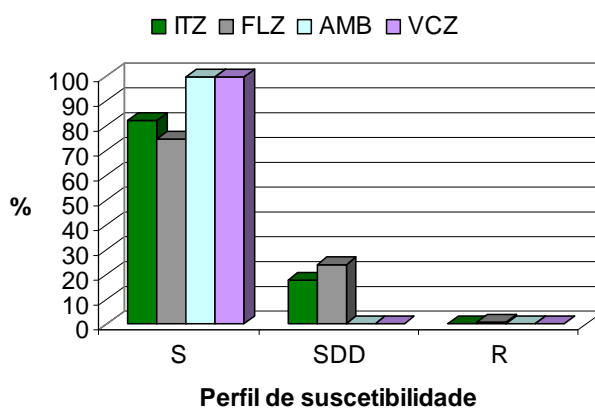
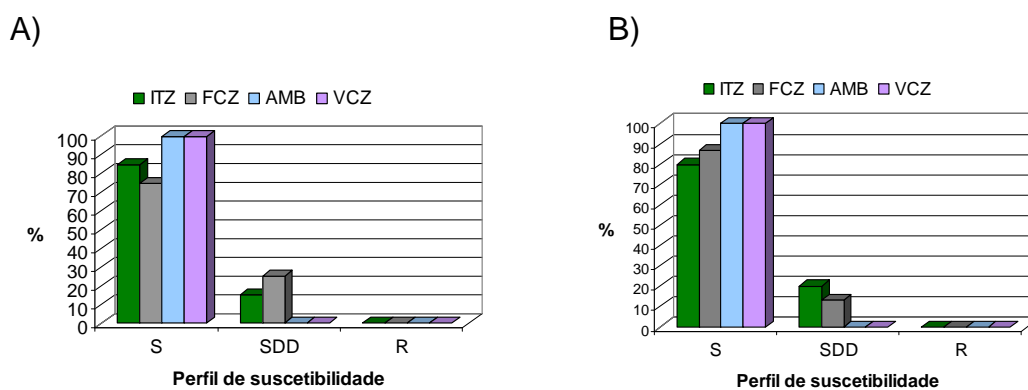


Figura 1 - Perfil de suscetibilidade de todos os isolados de *Cryptococcus* spp. de origem clínica e ambiental aos fármacos ITZ, FCZ, AMB e VCZ.

Considerando a origem dos isolados da espécie *C. neoformans*, todos os 63 foram sensíveis a voriconazol e a anfotericina B. Analisando separadamente de acordo com a origem, dois (13%) dos isolados ambientais e 12 (25%) dos clínicos apresentaram perfil SDD ao azólico fluconazol enquanto três (20%) dos ambientais e 7 (15%) dos clínicos foram SDD ao azólico itraconazol. Nenhum isolado de *C. neoformans* apresentou resistência *in vitro* às drogas. (Figura 2; Anexo C, tabelas 13 e 14)



A) Isolados clínicos de *C. neoformans*

B) Isolados ambientais de *C. neoformans*.

Figura 2 - Perfil de suscetibilidade dos isolados clínicos e ambientais de *C. neoformans* as drogas itraconazol, fluconazol, anfotericina B e voriconazol.

Considerando os valores de CIM₅₀ e CIM₉₀, observa-se que os isolados clínicos de *C. neoformans* tendem a apresentar maiores valores que os ambientais. Para este grupo, as CIM₉₀ para as drogas itraconazol e fluconazol atingiram valores relacionados com faixas que classificam estes isolados como SDD, com menor suscetibilidade. Não foi observada esta tendência para o azólico voriconazol (tabela 5).

Tabela 5 - Valores das CIM₅₀ e CIM₉₀ das drogas anfotericina B, fluconazol, itraconazol e voriconazol para os isolados de *C. neoformans*.

| Origem | Drogas (µg/mL) | | | |
|-----------|----------------|-------|-------|-------|
| | FCZ | ITZ | AMB | VCZ |
| Geral | | | | |
| CIM 50% | 8,0 | 0,094 | 0,25 | 0,032 |
| CIM 90% | 16,0 | 0,25 | 0,38 | 0,064 |
| Ambiental | | | | |
| CIM 50% | 12,0 | 0,094 | 0,125 | 0,047 |
| CIM 90% | 12,0 | 0,19 | 0,25 | 0,064 |
| Clínica | | | | |
| CIM 50% | 8,0 | 0,094 | 0,25 | 0,032 |
| CIM 90% | 16,0 | 0,25 | 0,50 | 0,064 |

FCZ_ fluconazol; ITZ_ itraconazol; AMB_ anfotericina B; VCZ_ voriconazol;
CIM_ Concentração Inibitória Mínima.

Para a espécie *C. gattii*, o isolado de origem ambiental foi sensível *in vitro* a todos as drogas testadas (Figura 3; Anexo C, tabela 15) enquanto entre os 3 isolados de origem clínica, encontramos, dois (67%) SDD e um (33%) R para fluconazol. Para itraconazol, um (33%) S e dois (67%) SDD (Figura 3; Anexo C, tabela 15). O segundo isolado ambiental desta espécie não foi testado porque não foi possível seu subcultivo após congelamento.

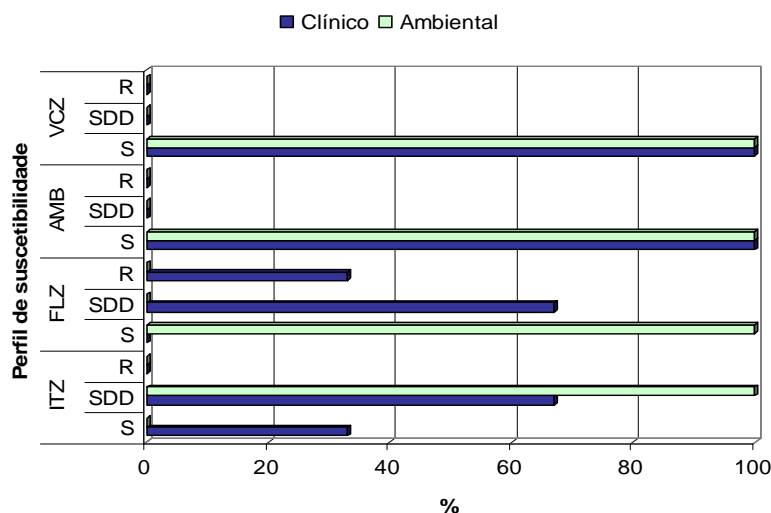


Figura 3 - Perfil de suscetibilidade das cepas clínicas e ambientais de *C. gattii* às drogas itraconazol, fluconazol, anfotericina B e voriconazol.

Tabela 6 - CIMs de *C. gattii* e *C. neoformans* de acordo com a origem da cepa.

| Espécies | Origem | <i>C. gattii</i> | | | <i>C. neoformans</i> | | | |
|----------|--------|--------------------|------------------|-------|----------------------|------------|-------------------|------------|
| | | Ambiental N (1) | Clínica N (3) | | Ambiental N (15) | | Clínica N (48) | |
| Drogas | CIM | Árvore | HIV neg | NI | Árvore | Excremento | HIV pos | HIV neg |
| ITZ | 50 | 0,125 | 0,38 | 0,094 | 0,094 | 0,094 | 0,094 | 0,125 |
| | 90 | 0,125 | 0,75 | 0,094 | 0,094 | 0,25 | 0,25 | 0,19 |
| FCZ | 50 | 12,0 | 48 | 4,0 | 12,0 | 8,0 | 8,0 | 8,0 |
| | 90 | 12,0 | >256 | 4,0 | 12,0 | 12,0 | 16,0 | 16,0 |
| AMB | 50 | 0,008 | 0,25 | 0,38 | 0,008 | 0,125 | 0,25 | 0,25 |
| | 90 | 0,008 | 0,38 | 0,38 | 0,125 | 0,25 | 0,5 | 0,5 |
| VCZ | 50 | 0,064 | 0,064 | 0,012 | 0,047 | 0,032 | 0,032 | 0,032 |
| | 90 | 0,064 | 0,125 | 0,012 | 0,064 | 0,047 | 0,047 | 0,094 |

N_ total de isolados; CIM_ Concentração Inibitória Mínima; NI_ Não Informado; ITZ_ itraconazol; FCZ_ fluconazol; AMB_ anfotericina B; VCZ_ voriconazol.

4.4. DETECÇÃO DA PRDODUÇÃO DA FOSFOLIPASE E DA ATIVIDADE DA FENOLOXIDASE

4.4.1. Produção da enzima fosfolipase

A análise de 67 isolados, clínicos e ambientais, de *C. neoformans* e *C. gattii* revelou que a produção de fosfolipase foi detectável em 65 destes isolados. A maioria dos isolados, 56 (84%), apresentou produção alta, 9 (13%) produção intermediária, 0% produção baixa e dois (3%) não demonstraram produção da enzima (Figura 4; Anexo D, tabelas 16 e 17).

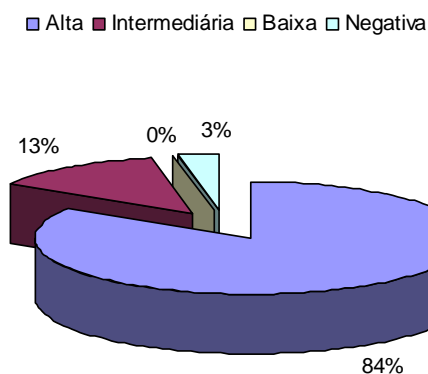


Figura 4 - Perfil de produção da enzima fosfolipase entre todos os isolados, clínicos e ambientais, de *Cryptococcus* spp.

Entre os 51 isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* de origem clínica, 41 (80%) tiveram produção classificada como alta, 8 (16%) intermediária e dois isolados (4%) não apresentaram produção da enzima (Figura 5; Anexo D, tabela 17).

Entre os 16 isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* de origem ambiental, todos (100%) apresentaram produção da enzima. Produção classificada como alta ocorreu em 15 (94%) e produção intermediária em uma (6%). Não houve isolado com produção baixa ou negativa (Figura 5; Anexo D, tabela 16).

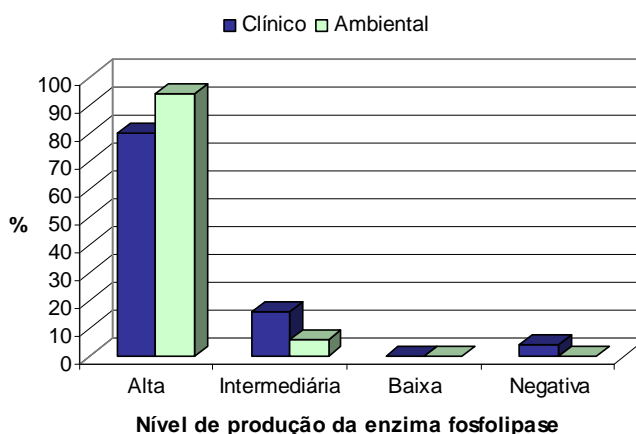


Figura 5 - Perfil de produção da enzima fosfolipase dos isolados de *C. neoformans* e *C. gattii*, de acordo a origem clínica ou ambiental.

Analisado a produção de fosfolipase pelos isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* de origem clínica, obtidos de pacientes HIV-positivos, observou-se que 30 (77%) destes apresentaram produção classificada como alta, 8 (20%) produção intermediária e um (3%) não apresentou produção da enzima. Entre os obtidos de pacientes HIV-negativos, 9 (90%) apresentaram produção alta e um (10%) não apresentou produção de fosfolipase (Figura 6).

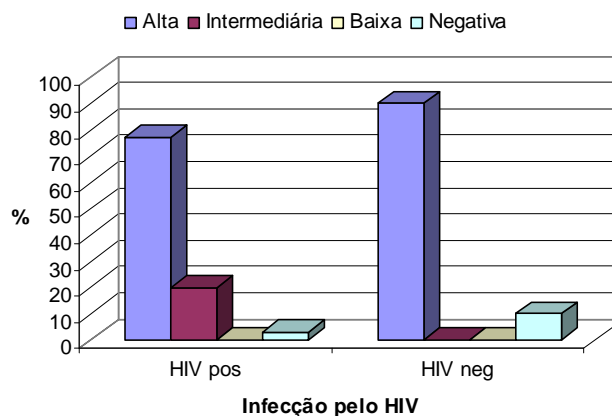


Figura 6 - Produção de fosfolipase pelos isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* originados de pacientes HIV-positivos e HIV-negativos.

Todas as 9 (100%) amostras ambientais isoladas de excrementos de pássaros psitacídeos (identificadas como *C. neoformans*) apresentaram produção classificada como alta. Entre as 7 amostras (6 de *C. neoformans* e uma de *C. gattii*) obtidas a partir de material de árvores, 6 (86%) apresentaram produção alta e somente uma (14%) apresentou produção intermediária (Figura 7).

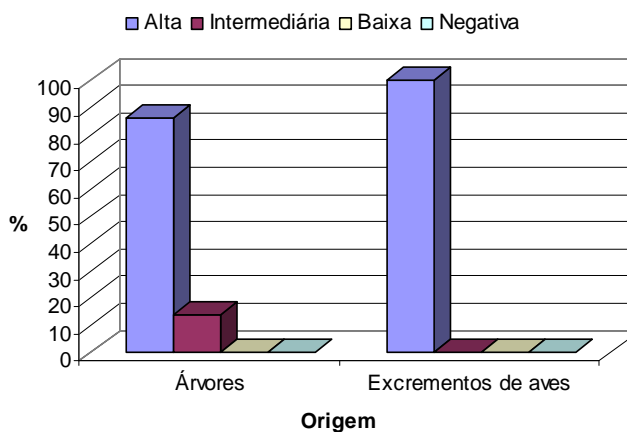


Figura 7 - Produção de fosfolipase entre os isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* ambientais.

Analisando a produção de fosfolipase em relação à espécie, observou-se que entre as 63 amostras da espécie *C. neoformans* (clínicos e ambientais), 53 (84%) apresentaram produção de fosfolipase alta, 9 (14%) produção intermediária e uma (2%) produção classificada como produção negativa. Entre

as amostras de *C. gattii* (clínicas e ambientais), 3 (75%) apresentaram produção alta e uma (25%) não produziu a enzima.

4.4.2. Atividade da enzima fenoloxidase

Todos os 67 isolados clínicos e ambientais de *C. neoformans* e *C. gattii* apresentaram atividade da enzima fenoloxidase. A maioria dos isolados, 47 (71%), apresentou baixa atividade da enzima, 13 (19%) atividade intermediária e 7 (10%) atividade alta (Figura 8; Anexo D, tabelas 18 e 19).

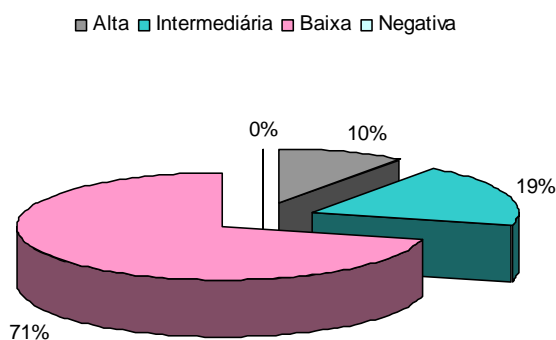


Figura 8 - Perfil da atividade da enzima fenoloxidase para os isolados, clínicos e ambientais de *Cryptococcus* spp.

Considerando a origem do isolado, observou-se que entre os de origem clínica, 33 (65%) apresentaram atividade baixa, 11 (22%) atividade intermediária e 7 (13%) alta. Já entre as ambientais, 14 (88%) apresentaram atividade baixa e o restante, duas (12%), atividade intermediária, não havendo nenhum com atividade classificada como alta ou negativa (Figura 9; Anexo D, tabelas 18 e 19).

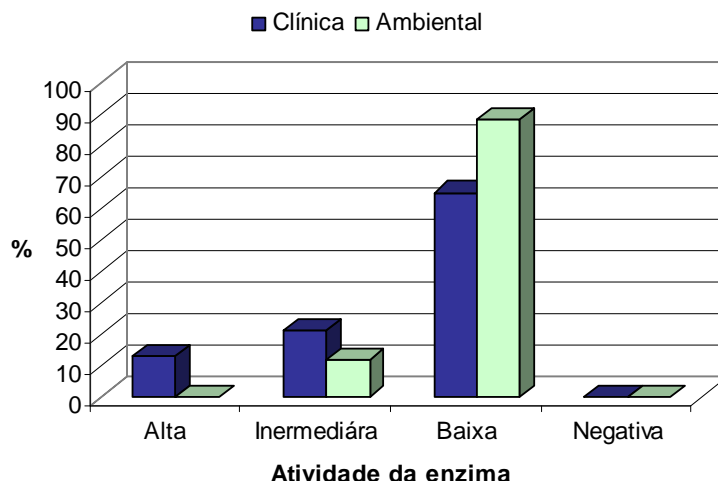


Figura 9 - Perfil de atividade da fenoloxidase de acordo com a origem do isolado, clínica ou ambiental.

Analisado a atividade da enzima fenoloxidase entre os isolados obtidos de pacientes HIV-positivos observou-se que 23 (59%) demonstraram atividade classificada como baixa, 9 (23%) atividade intermediária e 7 (18%) atividade alta. Entre os HIV-negativos, 8 (80%) apresentaram atividade baixa e duas (20%) atividade intermediária (Figura 10)

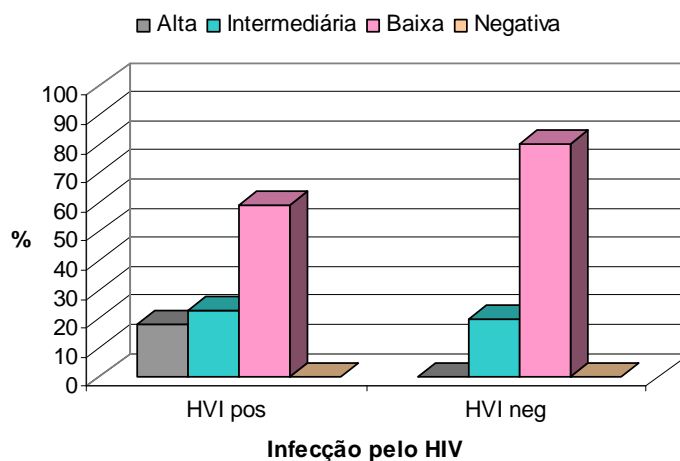


Figura 10 - Atividade da fenoloxidase pelos isolados originados de pacientes HIV-positivos e HIV-negativos.

Todos os isolados de ambas as espécies, de origem ambiental, apresentaram atividade da fenoloxidase. Entre os isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* obtidos a partir de excrementos de aves, 7 (78%) apresentaram atividade baixa

e o restante, duas (22%), atividade intermediária. Já entre aqueles obtidos a partir de material de árvores, 100% apresentaram baixa atividade da fenoloxidase (Figura 11).

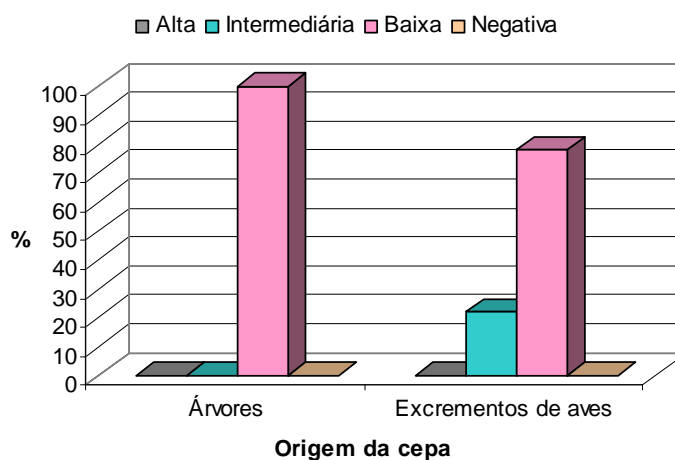


Figura 11 - Atividade da fenoloxidase pelos isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* originados de árvores e excrementos de aves.

Analisando as 63 amostras da espécie *C. neoformans* observa-se que 43 (68%) apresentaram atividade classificada como baixa, 13 (21%) atividade intermediária e 7 (11%) atividade alta. Entre as amostras de *C. gattii* todas (100%) apresentaram atividade baixa.

Analisando conjuntamente a produção das duas enzimas, *C. neoformans* apresentou isolados com menor produção de fosfolipase e maior atividade de fenoloxidase quando obtido de paciente HIV-positivo.

Tabela 7 - Produção de fosfolipase e atividade da fenoloxidase de acordo com a espécie e origem do isolado de *Cryptococcus* spp.

| Espécie N (%) | <i>C. gattii</i> 4 (6) | | | | <i>C. neoformans</i> 63 (94) | | | | |
|-----------------------|---------------------------|------------------|----------------------|-------------|---------------------------------|--------------------|-----------------------|----------------------|---------------|
| | Origem N (%) | Amb 1 (25) | Clinica 3 (75) | Total 4* | Amb 15 (24) | Clínica 48 (76) | Total 63** | | |
| Enzimas | Atividade | Árvore 1 (25) | HIV neg 2 (50) | Total 4* | Árvore 6 (10) | Excr 9 (14) | HIV pos 39 (62) | HIV neg 8 (13) | Total 63** |
| Fosfolipase N (%) | Alta | 1(100) | 1 (33,3) | 3*(75) | 5 (83) | 9 (100) | 30 (77) | 8(100) | 53** (84) |
| | Inter | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 1 (17) | 0 (0) | 8 (20) | 0 (0) | 9 (14) |
| | Baixa | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 |
| | Neg | 0 (0) | 1(33,3) | 1 (25) | 0 (0) | 0 (0) | 1 (3) | 0 (0) | 1 (2) |
| Fenoloxidase N (%) | Alta | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 7 (18) | 0 (0) | 7 (11) |
| | Inter | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 2 (22) | 9 (23) | 2 (25) | 13 (21) |
| | Baixa | 1 (100) | 2 (67) | 4* (100) | 6 (100) | 7 (78) | 23(59) | 6 (75) | 43** (68) |
| | Neg | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) |

N_ total de amostras; HIV- pos_ HIV-positivo; HIV-neg_ HIV-negativo; Neg_ negativo

* Uma cepa era *C. gattii* de origem clínica mas a infecção ou não pelo vírus HIV não foi informada.

** Uma cepa era *C. neoformans* de origem clínica mas que a infecção ou não pelo vírus HIV não foi informada.

4.5. PRODUÇÃO E ATIVIDADE DAS ENZIMAS E AS CONDIÇÕES CLÍNICAS APRESENTADAS PELOS PACIENTES

A análise dos prontuários revelou que 76% dos casos de criptococose ocorreram em pacientes HIV-positivos. Avaliando as formas clínicas da criptococose observou-se que meningoencefalite ocorreu em 25 (64%) enquanto fungemia e lesão cutânea ocorreram em 12 (31%) dos 39 casos, em 5% não foi informada a forma clínica.

Entre os isolados originados de pacientes com meningoencefalite, em 28 (82%) a produção da fosfolipase foi classificada como alta, 5 (15%) intermediária e um (3%) apresentou produção negativa. Já entre os obtidos de pacientes com outras formas clínicas (fungemia e lesões cutâneas), 10 (71%) apresentaram atividade alta, três (22%) intermediária e um (7%) negativa (Figura 12; Anexo E, tabela 20).

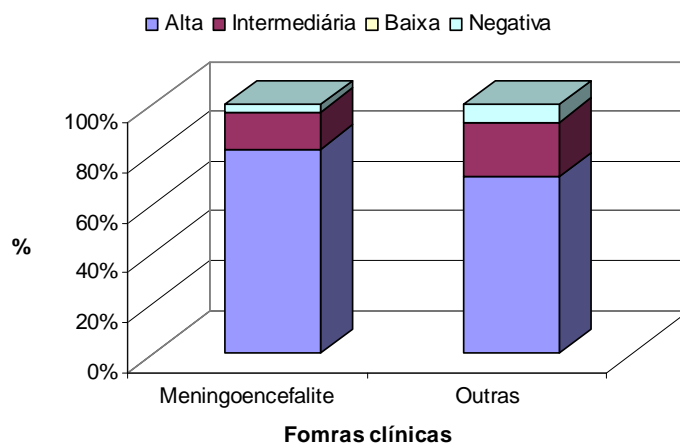


Figura 12 - Relação entre a produção da fosfolipase e formas clínicas da criptococose apresentadas pelos pacientes.

Avaliando a atividade de enzima fenoloxidase entre as amostras originadas de pacientes com meningoencefalite, 23 (68%) apresentaram atividade baixa, 7 (20%) intermediária e 4 (12%) alta. Já entre as de pacientes com outras formas clínicas (fungemia e lesões cutâneas), 9 (64%) atividade baixa, três (21%) intermediária e duas (15%) alta (Figura 13; Anexo E, tabela 20).

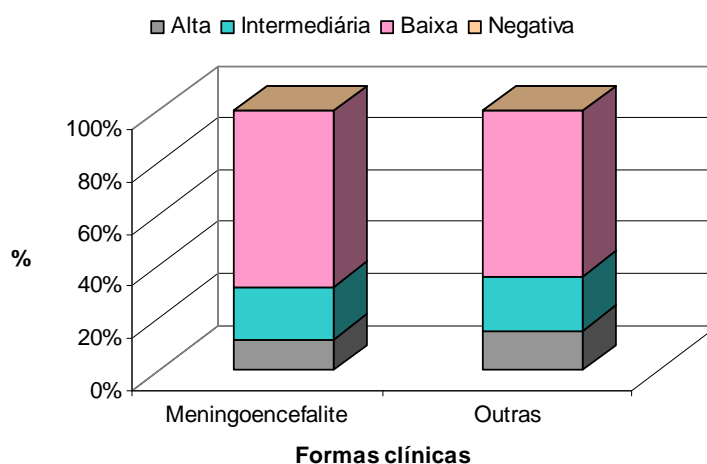


Figura 13 - Relação entre a produção da fenoloxidase e formas clínicas da criptococose apresentadas pelos pacientes.

Quando analisamos conjuntamente as atividades das enzimas, fosfolipase e fenoloxidase, de acordo com as formas clínicas apresentadas pelos pacientes, verifica-se que entre as cepas originadas de pacientes com meningoencefalite, 23 (68%) apresentaram atividade da fenoloxidase baixa e 28 (82%) nível de produção da fosfolipase alto. Padrão semelhante ao apresentado pelas cepas

originadas de pacientes com outras manifestações clínicas que não a meningoencefalite, 9 (64%) e 10 (71%), respectivamente (Figura 14; Anexo E, tabela 20).

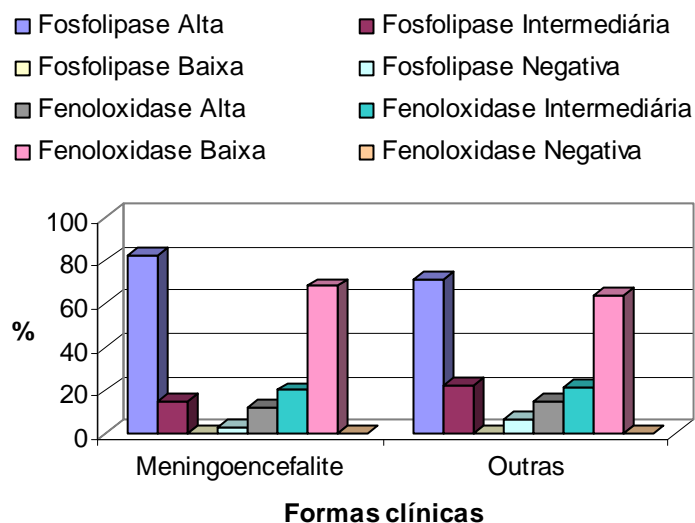
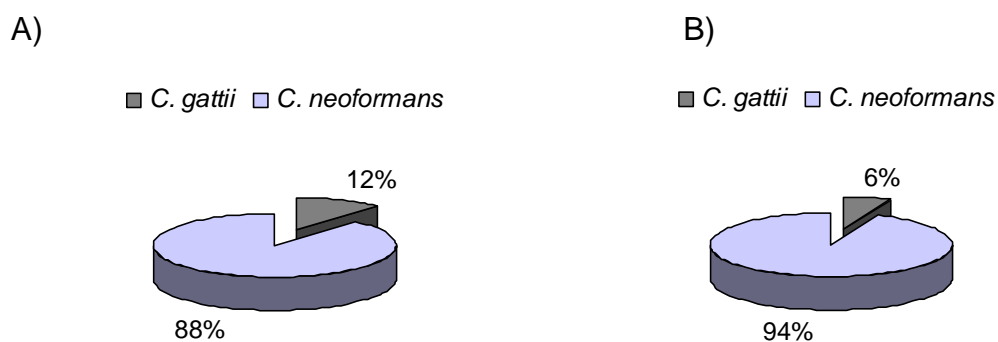


Figura 14 - Relação entre a produção da fosfolipase, atividade da fenoloxidase e as formas clínicas da infecção criptocócica apresentada pelos pacientes.

Entre os 19 (37%) pacientes que evoluíram para óbito, a maioria (47%) apresentava produção alta da fosfolipase e baixa atividade da enzima fenoloxidase (Anexo E, tabela 21).

4.6. IDENTIFICAÇÃO DOS GENÓTIPOS

No período deste estudo foram obtidas 51 cepas de *Cryptococcus* spp. de pacientes internados no HUCAM, sendo 48 (94%) de *C. neoformans* e 3 (6%) de *C. gattii*, entre os isolados de origem ambiental, maior número de isolados também foram de *C. neoformans* 15 (88%) e menor de *C. gattii* 2 (12%) (Figura 15).



A) Origem ambiental.

B) Origem clínica.

Figura 15 - Proporção de *C. gattii* e *C. neoformans* entre os isolados de origem ambiental e clínica.

Todas as amostras de *C. neoformans*, tanto as clínicas como as ambientais, apresentaram genótipo VNI. Entre as amostras de *C. gattii* todas foram VGII (Figura 16).

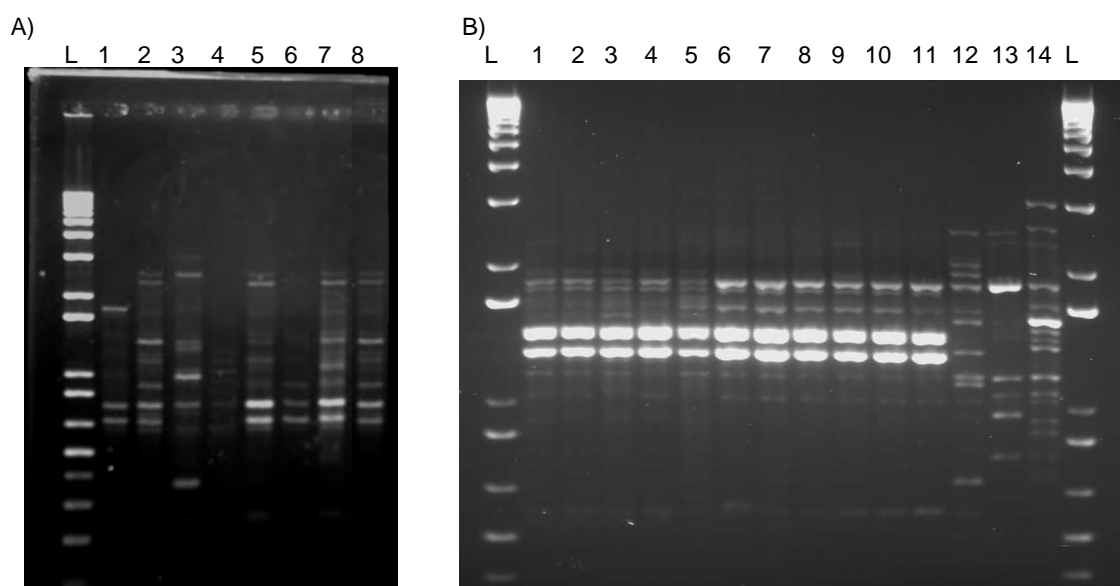


Figura 16 - Identificação molecular dos isolados ambientais e clínicos de *Cryptococcus* spp.

A) *C. gattii*: L – 1Kb DNA ladder; linhas 1 a 4 – VGI, VGII; VGIII, VGIV_ cepas de referência linhas; 5 a 7 – cepas clínicas VGII; 8 – cepa ambiental VGII.

B) *C. neoformans*: L – 1Kb DNA ladder; linhas 1 a 5 - cepas clínicas VNI; linhas de 6 a 10 – cepas ambientais VNI; linhas 11 a 14 – VNI, VNII, VNIII, VNIV_ cepas de referência.

5. DISCUSSÃO

As espécies *C. neoformans* e *C. gattii* tem ocorrência saprofítica na natureza (LITVINTSEVA *et al.*, 2005), estando associadas a diferentes nichos ecológicos, incluindo excrementos de pássaros e detritos de árvores (PEDROSO; FERREIRA; CANDIDO, 2007).

Nesse estudo, das 54 amostras de material fecal de aves analisadas, em 11 (21%) foi encontrado *Cryptococcus* spp., sendo que a proporção entre as espécies foi de 82% para *C. neoformans*, 9% para *Cryptococcus laurentii* e de 9% para *Cryptococcus albidus*, em concordância com outros autores (Anexo A, tabela 8), que também observaram que material fecal de pássaros, principalmente pombos, é um substrato importante para manutenção de *C. neoformans* na natureza. Contudo, outras espécies de *Cryptococcus* spp. também podem ser encontradas nesse tipo de material (PEDROSO; FERREIRA; CANDIDO, 2007; ROSARIO; ACOSTA; COLOM, 2008), inclusive *C. gattii*, que foi encontrado em material fecal de pássaros psitacídeos no Rio Grande do Sul (ABEGG *et al.*, 2006).

A ocorrência de *C. laurentii* e *C. albidus*, embora em menores proporções em excremento fecal, é um dado preocupante, visto que, estas espécies têm sido isoladas como agentes oportunistas de micoses sistêmicas em pacientes imunossuprimidos (FILION; KIDD; AGUIRRE, 2006; KOBAYASHI *et al.*, 2005; RANDHAWA; MUSSA; KHAN, 2001; ROSARIO; ACOSTA; COLOM, 2008). Neste estudo, *C. albidus*, especificamente, foi isolado de uma gaiola de Agapornis (pássaro do amor) que vivia sozinho no momento da coleta em uma loja de animais, indicando que gaiolas de pássaros, se não higienizadas adequadamente, podem também ser fonte de infecção de *Cryptococcus* spp. em área urbana.

Entre as 290 amostras coletadas de material proveniente de árvores, *Cryptococcus* spp. foi encontrado em 9 (3,0%) delas (Anexo A, tabela 9) e a proporção entre as espécies foi 67% *C. neoformans*, 22% para *C. gattii* e 11%

para *C. laurentii*. Os resultados deste estudo coincide com o de Nishikawa *et al.* (2003) que isolaram *C. neoformans* não somente de fezes de pombos, mas também de material proveniente de árvores, indicando que os nichos de ocorrência do *C. neoformans* na natureza são bastante variáveis.

Um isolado de *C. gattii*, foi obtido de uma árvore em Pedro Canário, região localizada ao norte do Estado do ES e caracterizada por apresentar desmatamentos recentes, mas que ainda resguarda resquícios de Floresta Atlântica. Outro isolado dessa espécie foi obtido em Sooretama (norte do Estado) que é uma região também marcada pela presença de Floresta Atlântica, tanto próxima como afastada dos centros populacionais. Ambas possuem árvores em avançado estado de decomposição, condição que favorece o isolamento de *C. gattii* (BALTAZAR; RIBEIRO, 2008; NISHIKAWA *et al.*, 2003; RANDHAWA; MUSSA; KHAN, 2001). A baixa prevalência encontrada desta espécie na natureza está de acordo os dados de outros autores (Anexo A, tabela 9). A amostra isolada de Sooretama não resistiu ao congelamento por isso os estudos das enzimas, testes de suscetibilidade e identificação do genotipo não foram realizados.

As amostras de material de árvores positivas para *C. neoformans*, foram coletadas na região norte do Estado (Água Doce do Norte e Sooretama), região Serrana (Afonso Cláudio) e Grande Vitória (Bairro Maruípe).

Entre as amostras de material de árvores obtidas na região Norte do Estado: em Sooretama apenas uma amostra, de uma árvore de grande porte existente no interior da Floresta Atlântica foi positiva, já em Água Doce do Norte houve duas amostras positivas (0,68%), sendo uma foi proveniente de detritos de um tronco bastante lignificado (indicando que a árvore é antiga) e outro de um tronco com sinais de avançado estado de decomposição, ambos próximos a um galinheiro. Em Afonso Cláudio (Região Serrana) as duas amostras positivas (0,68%) foram obtidas a partir de detritos troncos de árvores em decomposição existente no interior da área preservada de Floresta Atlântica. E na Grande Vitória, uma amostra positiva (0,34%) foi coletada do tronco de uma árvore de

Pinus sp. (pinheiro). Isolamento de *C. neoformans* de pinheiro já foi relatado também por Gramados e Castañeda (2005).

O fato do *C. neoformans* e *C. gattii* serem encontrados em árvores existentes em Floresta de Mata Atlântica indica que esse pode ser um ambiente propício para seu desenvolvimento, com a presença de árvores antigas, elevada umidade e sombreamento (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001), e podem ser fontes de propagação do fungo para cidades próximas destas áreas. Perturbações deste ambiente por vento, animais e/ou desmatamentos podem dispersar propágulos do fungo no ar e causar infecções humanas (LAZERA *et al.*, 2000).

Autores têm relacionado à sobrevivência do fungo em árvores à presença de fissuras ou ocos presentes no tronco, abrigando e protegendo o fungo da dessecação, da exposição à luz ultravioleta e dos ventos (RANDHAWA; MUSSA; KHAN, 2001).

Os resultados desse estudo reforçam a idéia de que ambas as espécies, *C. neoformans* e *C. gattii* não ocorrem em espécies específicas de árvores, indicando, como salienta Randhawa, Kowshik e Khan (2003), que elas podem ter distribuição muito generalizada, o que dificulta sua detecção na natureza (Anexo A, tabela 10).

Entre os isolados clínicos, 48 (94%) foram da espécie *C. neoformans* e apenas 3 (6%) foram da espécie *C. gattii*, proporção equivalente àquela observada também na natureza, que de acordo com outros estudos, *C. neoformans* é a espécie com maior distribuição mundial e o agente etiológico mais comum das criptococoses (BOVERS; HAGEN; BOEKHOUT, 2008). Nos Estados Unidos, entre 42 isolados clínicos, 40 (95,2%) foram de *C. neoformans* e nenhum de *C. gattii* (LITVINTSEVA *et al.*, 2005). Na Venezuela, o estudo de 132 cepas clínicas de *Cryptococcus* spp., revelou que 120 (91%) eram *C. neoformans* e 12 (9%) *C. gattii* (PÉREZ *et al.*, 2008).

Considerando o total de amostras clínicas e ambientais, o atual estudo mostrou que *C. neoformans* ocorreu em maior número que a espécie *C. gattii* tanto entre as amostras clínicas, respectivamente, 94% e 6%, como entre as ambientais, 88% e 12%, respectivamente, padrão semelhante ao relatado no Brasil por Trilles *et al.* (2008): 73% e 27% e confirmando que a ocorrência de *C. gattii* é menor que a do *C. neoformans*. Contudo, se observa certas variações regionais dentro do próprio país: *C. gattii* apresenta menor ocorrência nas regiões sul e sudeste que *C. neoformans*, mas é considerado endêmico nas regiões centro-oeste, norte, nordeste (TRILLES *et al.*, 2008).

Em relação ao perfil de suscetibilidade de todos os isolados, observou-se que 100% deles foram sensíveis a anfotericina B e voriconazol. Entre os azólicos, voriconazol tem demonstrado ser a droga com melhor ação *in vitro* contra *Cryptococcus* spp. Apresentando, neste estudo, CIMs 90% $\leq 0,064$ $\mu\text{g/mL}$, em concordância com outros autores (THOMPSON *et al.*, 2009).

Considerando a origem dos isolados, se clínicos ou ambientais, assim como em outros estudos, não foram encontradas diferenças importantes quanto à suscetibilidade a voriconazol, anfotericina B e itraconazol. Essa semelhança no perfil de inibição para os fármacos avaliados entre isolados ambientais e clínicos corrobora a hipótese de que a infecção pode ser adquirida a partir de fontes ambientais. A ausência de isolados resistentes no meio ambiente demonstra que a resistência primária a drogas entre estes isolados é rara (KHAN *et al.*, 2007; TORRES-RODRÍGUEZ *et al.*, 2008; TRILLES *et al.*, 2004; YILDIRAN *et al.*, 2000).

Franzot e Hamdan (1996), ao estudarem 51 isolados de *C. neoformans* (ambientais e clínicos) em Belo Horizonte, Minas Gerais, observaram um modelo uniforme no perfil de suscetibilidade, não evidenciando diferenças entre isolados clínicos e ambientais. Igual resultado também foi relatado em Goiânia, Goiás, após análise de 110 isolados clínicos e ambientais de *C. neoformans* (SOUZA *et al.*, 2005). Em ambos os estudos utilizou-se a metodologia da microdiluição em placas.

Também não foram encontradas diferenças no perfil suscetibilidade antifúngica entre isolados clínicos e ambientais estudados por Moraes, Prímola e Hamdan (2003) (64 isolados de *C. neoformans* e *C. gattii*) e Trilles *et al.* (2004) (87 isolados de *C. neoformans* e *C. gattii*), obtidas de diferentes regiões do Brasil (FRANZOT; HAMDAN, 1996; MORAES; PRÍMOLA; HAMDAN, 2003; TRILLES *et al.*, 2004).

Num estudo realizado no Rio Grande do Sul, com 82 isolados (clínicos e ambientais) de *C. neoformans*, os autores encontraram similar perfil de suscetibilidade entre os isolados de origem clínica e ambiental para as drogas anfotericina B, itraconazol e cetoconazol, porém, para fluconazol, os isolados clínicos foram menos suscetíveis que os ambientais (ALVES *et al.*, 2001). Da mesma forma, Thompson *et al.* (2009) relataram que fluconazol foi, juntamente com flucitocina, o fármaco que apresentou menor atividade, tanto para *C. neoformans* como para *C. gattii* (clínicos e ambientais).

No presente estudo, a droga que mais se mostrou diferente entre as espécies, em relação à suscetibilidade, foi fluconazol. As CIMs das drogas avaliadas entre os poucos isolados de *C. gattii* se mostraram altas, incluindo CIM >256 µg/mL, enquanto todos os isolados (clínicos e ambientais) de *C. neoformans* foram inibidos em concentrações ≤32 µg/mL desta droga, resultado semelhante ao do relatado por Alves *et al.* (2001) e por Franzot e Hamdan (1996), que observaram que a maioria dos isolados de *C. neoformans* (clínicos e ambientais) foram inibidos em concentrações ≤16 µg/mL.

Entre os isolados clínicos de *C. gattii*, 33% foram resistentes ao fluconazol, mas sem resistência cruzada com outros azólicos. Amostras clínicas de *C. gattii* resistente a esse fármaco já foi relatada também por Tay *et al.* (2006) e Gomez-Lopez *et al.* (2008). Contudo, nenhuma amostra ambiental foi resistente ao fluconazol ou outro azólico.

As CIMs dos antifúngicos para *C. gattii* (ambientais e clínicas) foram, de maneira geral, maiores ou iguais que as de *C. neoformans*, indicando que

mesmo os isolados ambientais de *C. gattii* são menos suscetíveis as drogas antifúngicas utilizadas no tratamento da criptococose, fato também foi relatado por outros autores (CHEN *et al.*, 2000; KHAN *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2005; TORRES-RODRÍGUEZ *et al.*, 2008, THOMPSON *et al.*, 2009; TRILLES *et al.*, 2004).

Entre os isolados ambientais de *C. neoformans*, considerando a origem se de árvores ou de excrementos de aves, não foram observadas diferenças quanto ao perfil de suscetibilidade a drogas, exceto para o itraconazol, que apresentou menor CIM 90% da droga para os isolados obtidos de árvores, semelhante aos achados de Khan *et al.* (2007). A CIM 90% observada para a droga fluconazol entre os isolados de árvores neste estudo foi maior que a encontrada por Khan *et al.* (2007).

Para os isolados de *C. neoformans* obtidos de excrementos de aves, observamos que as CIMs 90% das drogas, fluconazol e itraconazol foram maiores que as relatadas por Yildiran *et al.* (2000) ao estudar, por meio da técnica da microdiluição em placas, 27 isolados ambientais de *C. neoformans* obtidos de excrementos de pombos na Turquia, enquanto que para as drogas voriconazol e anfotericina B, as CIMs 90% observadas no presente estudo foram, respectivamente, menores ou similares (YILDIRAN *et al.*, 2000). As CIMs 50 e 90% para os fármacos voriconazol, itraconazol e fluconazol encontradas no presente trabalho foram menores que as informadas por Morera-López *et al.* (2005) avaliando o perfil de suscetibilidade, utilizando também a microdiluição em placas, de 22 isolados ambientais de excrementos de aves de *C. neoformans* em Barcelona, Espanha. Entretanto as CIMs 50 e 90% para a anfotericina B foram similares (MORERA-LÓPEZ *et al.*, 2005).

Nesse estudo, assim como já informado por outros autores, não detectamos nenhum isolado resistente a anfotericina B, todos (clínicos e ambientais de *C. neoformans* e *C. gattii*) foram inibidos em concentrações $\leq 1,0$ $\mu\text{g/mL}$ da droga (FRANZOT; HAMDAN, 1996; TRILLES *et al.*, 2004; YILDIRAN *et al.*, 2000). A anfotericina B é principal droga para o tratamento da criptococose, portanto a ausência de cepas resistentes entre as cepas clínicas demonstra que mesmo

com o aumento do número de casos de SIDA observados na década passada, a resistência a essa droga ainda é rara (SOUZA *et al.*, 2005).

Considerando todos os 67 isolados de *Cryptococcus* spp. estudados, a produção de fosfolipase foi classificada como alta em 84% destes, como intermediária em 13% e em 3%, não foi possível a detecção da enzima, considerada como produção negativa de fosfolipase. O atual estudo está em concordância com outros trabalhos que também relataram produção de fosfolipase tanto em isolados clínicos quanto em ambientais (CASALI *et al.*, 2003; CHEN *et al.*, 1997; VIDOTTO *et al.*, 1998).

Chen *et al.* (1997), ao estudar 25 isolados de *C. neoformans* e 25 de *C. gattii* (clínicos e ambientais) encontraram que somente um isolado clínico de *C. gattii* apresentou produção negativa da enzima. Vidotto *et al.* (1996) ao avaliarem a produção da enzima em 18 amostras de *C. neoformans*, de pacientes com infecção pelo HIV e 5 de pacientes sem infecção pelo vírus HIV, encontraram também somente um isolado com produção negativa. Casali *et al.* (2003) num estudo realizado no Rio Grande do Sul, observaram que entre os 124 isolados clínicos e ambientais de *C. neoformans* e *C. gattii*, 11 (9%) não produziam a enzima. Baixo número de isolados com produção negativa da fosfolipase também foi encontrado nesse estudo.

Os dados do presente trabalho não evidenciam diferenças quanto à produção da enzima fosfolipase entre isolados de *Cryptococcus* spp. de origem clínica ou ambiental. Fato também relatado por outros autores como: Chen *et al.* (1997), Vidotto *et al.* (1998) e Casali *et al.* (2003). Em geral, os isolados ambientais assim como os clínicos apresentaram alta produção da enzima, talvez porque esse comportamento seja intrínseco ao microrganismo (STEENBERGEN; CASADEVALL, 2003).

Analisando somente os isolados clínicos de *C. neoformans* e *C. gattii*, a maioria apresentou produção alta da fosfolipase, sendo que o número de amostras, com este nível, isoladas de pacientes HIV-positivos foi menor que de HIV-negativos (77% e 90%, respectivamente).

Apenas um isolado (10%) de *C. neoformans* de paciente HIV-positivo não produziu a enzima, fato também relatado por Vidotto *et al.* (1998), que em seu estudo observaram que 4 (19%) de 21 amostras de *C. neoformans* de pacientes HIV-positivos não produziram a enzima e por Casali *et al.* (2003), que observaram produção negativa em 4 (3,8%) de 105 amostras clínicas de *C. neoformans* e *C. gattii*. Esses resultados sugerem, portanto que há uma relação entre produção de fosfolipase extracelular e virulência (CASALI *et al.*, 2003; VIDOTTO *et al.*, 1998).

A elevada produção de fosfolipase por isolados clínicos de ambas as espécies indica que esta enzima pode ser realmente considerada como um importante fator de virulência, atribuída à sua capacidade de invadir tecidos do hospedeiro através de desorganização de membranas celulares das células hospedeiras (CHEN *et al.*, 1997; COX *et al.* 2001; SIAFAKAS *et al.*, 2007; VIDOTTO *et al.*, 2005). Estudos relatam que altos níveis de produção da enzima estão relacionados com maior número de células fúngicas em tecido pulmonar e cerebral, após infecção experimental em camundongos, quando comparada a cepas com produção intermediária ou baixa da enzima (CHEN *et al.*, 1997; VIDOTTO *et al.*, 1998).

Vidotto *et al.* (1998) e Casali *et al.* (2003) relataram que o número de isolados de *C. neoformans* com produção negativa da enzima foi maior entre os isolados ambientais do que entre os clínicos reforçando a importância desta enzima na patogênese da criptococose humana.

Chen *et al.* (1997), consideram inesperada a produção de fosfolipase extracelular por isolados ambientais, uma vez que o ambiente onde estas habitavam é constituído por material (casca, oco de árvores e excrementos de aves) com baixa concentração de fosfolipídios. Entretanto, nossos resultados indicam que esses isolados já se apresentam virulentas no meio ambiente. Cafarchia *et al.* (2008), relatam que amostras obtidas de excrementos de aves apresentam alta produção de fosfolipase, e, dessa forma atuando como dispersores de cepas com alta produção da enzima no meio ambiente.

Embora em nosso estudo uma comparação entre espécies não fosse possível, uma vez que tínhamos apenas 3 isolados de *C. gattii*, interessante, um isolado clínico de *C. gattii* obtido de um paciente HIV-negativo com uma única lesão cutânea, não produziu fosfolipase, indicando que esta enzima possa estar correlacionada mais com a patogênese da criptococose no sistema nervoso central e tecido pulmonar, do que em quadros mais brandos, como o da criptococose cutânea. Diferente dos nossos resultados, Casali *et al.* (2003) encontraram isolados clínicos de *C. gattii* com produção negativa de fosfolipase entre as amostras de pacientes HIV-positivos.

Entre os isolados clínicos de *C. neoformans*, maior porcentagem de isolados com produção alta foi observada entre as amostras de pacientes HIV-negativos (100%) do que de HIV-positivos (77% alta) (tabela 7). Entretanto, a produção da enzima não variou em relação às formas clínicas de criptococose apresentadas pelos pacientes, apresentando altos níveis de produção tanto os isolados de pacientes com meningoencefalite como os de pacientes com fungemia e lesões cutâneas.

Detecção de produção de fosfolipase em isolados de *C. neoformans* de pacientes HIV-positivos com meningoencefalite também foi observada por Clancy *et al.* (2006), a média de Pz, considerando todas as 18 cepas estudadas foi de 0,66 (variando de 0,59 a 0,73), não houveram cepas com produção alta.

Entre os 67 isolados de *Cryptococcus* spp. avaliados, quanto à atividade de fenoloxidase, 47 (71%) apresentaram atividade baixa, 13 (19%) intermediária e 7 (10%), alta. Tanto as cepas clínicas como as ambientais apresentaram similar padrão de atividade da fenoloxidase uma vez que, nestes dois grupos, houve predomínio de cepas com baixa atividade, 33 (65%) e 14 (88%) respectivamente. Nenhum isolado ambiental, tanto de excrementos de aves como de detritos de árvores, foi classificado com atividade alta.

Diferentes estudos, porém utilizando metodologias variadas, já relataram a atividade da fenoloxidase em cepas de *C. neoformans* e *C. gattii*. Vidotto *et al.*

(1998) observaram atividade da fenoloxidase entre isoaldos de *C. neoformans* clínicos e ambientais e não encontrou diferenças significativas relacionadas com a origem do isolado. Em outro trabalho realizado em 2002, Vidotto *et al.* (2002) também relataram atividade da enzima entre isolados clínicos (13 cepas) e ambientais (7 cepas) de *C. neoformans*. Alvarado-Ramírez *et al.* (2008) ao estudarem amostras de *C. gattii* isoladas de bodes que morreram de criptococose também observaram atividade da enzima. Este estudo relata ainda que uma amostra de *C. gattii* isolada de paciente humano com meningite criptocócica foi a que apresentou maior atividade da enzima (ALVARADO-RAMÍREZ *et al.*, 2008).

O fato de detectarmos atividade, mesmo baixa, da fenoloxidase na maioria dos isolados ambientais, é importante uma vez que esta enzima está envolvida na síntese do pigmento melanina que protege as células fúngicas de temperaturas mais elevadas, luz ultravioleta e de predadores amebóides (NOSANCHUK *et al.*, 1999b; STEENBERGEN; CASADEVALL, 2003; WANG; CASADEVALL, 1994). Provavelmente, a menor atividade da fenoloxidase entre os isolados originados de árvores, em relação aos originados de excrementos de aves, se deva a particularidades existentes no micro-habitat onde se encontravam.

A maioria dos isolados ambientais de *C. neoformans* tanto de árvores como de excrementos de aves apresentaram baixa atividade da enzima. Detecção de atividade da enzima fenoloxidase entre amostras de *C. neoformans* ambientais obtidas de excrementos de aves também foi relatada por Pedroso, Ferreira e Candido (2007) que observaram atividade em 14 (93,3%) dos 15 isolados analisadas.

Somente entre os isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. houveram amostras com alta atividade da fenoloxidase (tabela 7), talvez porque as condições do hospedeiro podem ser mais adversas que as ambientais, fazendo com que o fungo necessite de mais recursos para ser capaz de se proteger dos mecanismos de defesa existentes no hospedeiro (LIU; TEWARI, WILLIAMSON, 1999; ZHU *et al.*, 2001; ZHU; WILLIAMSON, 2004). Em estudos utilizando isolados clínicos, Clancy *et al.* (2006) também detectaram atividade da

fenoloxidase entre isolados de *C. neoformans*. Blackstock *et al.* (1999) ao estudarem 2 amostras de *C. neoformans*, sendo uma alta e outra fracamente virulenta, observaram, além da produção da enzima, que a amostra mais virulenta apresentou maior atividade da fenoloxidase.

Entre as amostras clínicas de *C. neoformans*, aquelas obtidas de indivíduos HIV-positivos em geral, apresentaram maior atividade da fenoloxidase que aquelas obtidas de HIV-negativos. Sabendo-se que a maioria (63%) dos pacientes HIV-positivos apresentou criptococose na forma de meningoencefalite, a maior atividade da fenoloxidase nos isolados destes pacientes coincide com relato de outros autores e é justificada pelo envolvimento da enzima no processo de oxidação das catecolaminas (neurotransmissores), que funcionam também como substrato da enzima para produção de melanina (BOVERS; HAGEN; BOEKHOUT, 2008; POLACHEK; HEARING; KWON-CHUNG, 1982; ZHU; WILLIAMSON, 2004).

De acordo com nossos resultados, a constatação de padrões semelhantes quanto à atividade da enzima entre as amostras ambientais das duas espécies, *C. neoformans* e *C. gattii* (tabela 7) sugere um mesmo mecanismo de adaptação e sobrevivência do fungo no meio ambiente (NOSANCHUK *et al.*, 1999b; STEENBERGEN; CASADEVALL, 2003). Zhu e Williamson (2004) defendem que a atividade da fenoloxidase, mesmo sendo atributo intrínseco ao microorganismo, sofre pressão seletiva do ambiente onde se encontram.

Entre os isolados de pacientes que evoluíram para óbito 9 (47%) apresentaram baixa atividade da fenoloxidase e alta produção de fosfolipase (Anexo E; tabela 21), inferindo que este desfecho não pode ser atribuído à virulência de cepas do fungo. Os resultados sugerem que ambos os fatores de virulência (produção de fosfolipase e fenoloxidase) não estão associados com condições ou formas clínicas específicas, indicando que a patogênese pode estar relacionada com uma soma de fatores que, em conjunto, permitem que a levedura supere os mecanismos de defesa do hospedeiro (BICANIC; HARRISON, 2005; KOZEL, 1995).

Blackstock *et al.* (1999) concluíram que a expressão de fatores de virulência por isolados clínicos de *C. neoformans* varia e depende de estímulos de suas vias regulatórias. Clancy *et al.* (2006) afirmaram também que a patogênese da criptococose reflete interações entre suscetibilidade do hospedeiro, resposta imune contra o organismo infectante e potencial virulento do isolado. Nesse mesmo estudo os autores, após a análise de diferentes fatores de virulência, entre eles atividade da fenoxidase e produção de fosfolipase, em 18 amostras clínicas de *C. neoformans* concluíram que, apesar de uma variedade de fatores contribuírem para o fenótipo virulência, a contribuição limitada de um fator pode ser compensada pela expressão de outros (CLANCY *et al.*, 2006).

A ocorrência das espécies *C. neoformans* e *C. gattii* não foi diferente ao já relatado por outros autores, onde a espécie *C. neoformans* está geralmente associada à pacientes com algum tipo imunossupressão, nesse caso infecção por HIV, e a espécie *C. gattii*, a pacientes imunocompetentes (LEAL *et al.*, 2008; LINDENBERG *et al.*, 2008).

A genotipagem das cepas isoladas no Estado do ES revelou uma concordância entre cepas clínicas e ambientais, onde todas as amostras de *C. neoformans* apresentaram um único tipo genético, pertencente ao genótipo VNI, e todas as amostras de *C. gattii*, ao genótipo VGII. Esses resultados estão de acordo com o relatado por Trilles *et al.* (2008): num estudo que visava determinar os genótipos regionais existentes no Brasil, encontraram a predominância de *C. neoformans* genótipo VNI e *C. gattii* genótipo VGII. Casali *et al.* (2003), no Rio Grande do Sul também encontraram predomínio de *C. neoformans* genótipo VNI para *C. neoformans* e VGII para *C. gattii*, tanto em amostras clínicas como ambientais.

A detecção do mesmo genótipo, VNI, para isolados ambientais e clínicos de *C. neoformans* obtidos de amostras de árvores e de pacientes, respectivamente, que residiam em no bairro Maruípe, Vitória e Anfonso Cláudio, região Serrana do Espírito Santo, assim como do genótipo VGII, para uma cepa clínica de *C. gattii* isolada de uma paciente habitante do município de Pedro Canário e para uma cepa ambiental, isolada de material de árvore, da mesma região, é de

grande importância epidemiológica, auxiliando na detecção das possíveis fontes ambientais do fungo. As técnicas de biologia molecular possibilitaram Lagrou *et al.* (2005) estabelecerem também uma correlação entre isolados obtidos de excrementos de pássaros e os obtidos de pacientes.

É possível que a ocorrência desse genótipo na região Norte do Estado se deva à proximidade com o estado da Bahia, onde Trilles *et al.* (2008) também observaram o predomínio do genótipo VGII. Um fator que pode estar associado é a presença de Floresta Atlântica, que ocorre ao longo da costa do Brasil e que parece ser um ambiente propício para a ocorrência de *C. gattii* (BALTAZAR; RIBEIRO, 2008).

A menor ocorrência de *C. gattii* como agente de infecções humanas, em comparação com *C. neoformans*, pode ser explicada pela sua baixa ocorrência ambiental, que por sua vez, pode estar relacionada com a dificuldade de delimitação de seu nicho na natureza, que tem se mostrado bastante disperso e diversificado (BICANIC; HARRISON, 2005; LITVINTSEVA *et al.*, 2005; TRILLES *et al.*, 2008).

A observação do mesmo padrão genético entre isolados ambientais e clínicas destas espécies é uma confirmação de que a infecção ocorra a partir de fontes ambientais, sendo por isso importante delimitar os locais de ocorrência dessas leveduras na natureza. A ausência de transmissão indivíduo-indivíduo de *C. gattii* e *C. neoformans* também justifica a hipótese de infecção a partir de fontes ambientais (ROSARIO; ACOSTA; COLOM, 2008).

6. CONCLUSÕES

1. *C. neoformans* é a espécie de *Cryptococcus* de maior ocorrência em amostras clínicas e ambientais no Estado do Espírito Santo;
2. A espécie *C. neoformans* ocorreu em maior número que a espécie *C. gattii* tanto entre os isolados de origem clínica (94% e 6%) como entre os ambientais (88% e 12%);
3. O perfil de suscetibilidade a drogas antifúngicas foi semelhante entre isolados clínicos e ambientais sendo que voriconazol e fluconazol foram, respectivamente, os azólicos com maior e menor atividade *in vitro* sobre estes isolados;
4. Não foi observada resistência cruzada entre o azólico voriconazol com o azólico fluconazol;
5. A maioria dos isolados ambientais e clínicos de *C. neoformans* e *C. gattii* apresentaram altos níveis de produção de fosfolipase;
6. Todos os isolados ambientais e clínicos de *C. neoformans* e *C. gattii* foram produtores de fenoxidase, embora a maioria em níveis baixos;
7. Maior número de isolados com níveis mais baixos de produção de fosfolipase e níveis mais altos de produção de fenoxidase foram observados em cepas de *C. neoformans* isoladas de pacientes HIV-positivos do que de HIV-negativos.
8. Todas as cepas clínicas e ambientais da espécie *C. neoformans* analisadas pertenceram ao mesmo genótipo VNI e todas as cepas da espécie *C. gattii*, ao mesmo genótipo VGII;
9. Em geral, os resultados revelaram semelhança no padrão genético, no perfil de suscetibilidade a drogas e na produção de enzimas fenoxidase e fosfolipase entre as cepas ambientais e as clínicas de *Cryptococcus* spp. confirmando a infecção com o fungo a partir de fontes ambientais.

7. REFERÊNCIAS

Abegg MA, Cella FL, Faganello J, Valente P, Schrank A, Vainstein MH. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolated from the excreta of psittaciformes in a southern Brazilian zoological garden. *Mycopathologia*. 2006;161(2):83-91.

Aller AI, Martín-Mazuelos E, Gutiérrez MJ, Bernal S, Chávez M, Recio FJ. Comparison of the Etest and microdilution method for antifungal susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans* to four antifungal agents. *J Antimicrob Chemother*. 2000;46(6):997-1000.

Aller AI, Claro R, Castro C, Serrano C, Colom MF, Martín-Mazuelos E. Antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* isolates in HIV-infected patients to fluconazole, itraconazole and voriconazole in Spain: 1994-1996 and 1997-2005. *Chemotherapy*. 2007;53(4):300-5.

Alvarado-Ramírez E, Torres-Rodríguez JM, Sellart M, Vidotto V. Laccase activity in *Cryptococcus gattii* strains isolated from goats. *Rev Iberoam Micol*. 2008;25(3):150-3.

Alves SH, Oliveira LT, Costa JM, Lubeck I, Casali AK, Vainstein MH. In vitro susceptibility to antifungal agents of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolated in Southern of Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2001;43(5):267-70.

Aoki FH, Imai T, Tanaka R, Mikami Y, Taguchi H, Nishimura NF, Nishimura K, Miyaji M, Schreiber AZ, Branchini ML. New PCR primer pairs specific for *Cryptococcus neoformans* serotype A or B prepared on the basis of random amplified polymorphic DNA fingerprint pattern analyses. *J Clin Microbiol*. 1999;37(2):315-20.

Baltazar Lde M, Ribeiro MA. First isolation of *Cryptococcus gattii* from the environment in the State of Espírito Santo. Rev Soc Bras Med Trop. 2008;41(5):449-53.

Barchiesi F, Schimizzi AM, Caselli F, Novelli A, Fallani S, Giannini D, Arzeni D, Di Cesare S, Di Francesco LF, Fortuna M, Giacometti A, Carle F, Mazzei T, Scalise G. Interactions between triazoles and amphotericin B against *Cryptococcus neoformans*. Antimicrob Agents Chemother. 2000;44(9):2435-41.

Baró T, Torres-Rodríguez JM, Morera Y, Alía C, López O, Méndez R. Serotyping of *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Spain. J Clin Microbiol. 1999;37(4):1170-2.

Bauwens L, Swinne D, De Vroey C, De Meurichy W. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in the aviaries of the Antwerp Zoological Gardens. Mykosen. 1986;29(7):291-4.

Bicanic T, Harrison TS. Cryptococcal meningitis. Br Med Bull. 2005;72:99-118. Print 2004. Review.

Bicanic T, Harrison T, Niepieklo A, Dyakopu N, Meintjes G. Symptomatic relapse of HIV-associated cryptococcal meningitis after initial fluconazole monotherapy: the role of fluconazole resistance and immune reconstitution. Clin Infect Dis. 2006;43(8):1069-73.

Bii CC, Makimura K, Abe S, Taguchi H, Mugasia OM, Revathi G, Wamae NC, Kamiya S. Antifungal drug susceptibility of *Cryptococcus neoformans* from clinical sources in Nairobi, Kenya. Mycoses. 2007;50(1):25-30.

Blackstock R, Buchanan KL, Cherniak R, Mitchell TG, Wong B, Bartiss A, Jackson L, Murphy JW. Pathogenesis of *Cryptococcus neoformans* is associated with quantitative differences in multiple virulence factors. Mycopathologia. 1999;147(1):1-11.

Bovers M, Hagen F, Boekhout T. Diversity of the *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex. Rev Iberoam Micol. 2008;25(1):S4-12.

Bulmer GS, Sans MD, Gunn CM. *Cryptococcus neoformans*. I. Nonencapsulated mutants. J Bacteriol. 1967;94(5):1475-9.

Bulmer GS.; Taker JR. Phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* by alveolar macrophages. Infect Immunol. 1975; 11: 73-9.

Cafarchia C, Romito D, Iatta R, Camarda A, Montagna MT, Otranto D. Role of birds of prey as carriers and spreaders of *Cryptococcus neoformans* and other zoonotic yeasts. Med Mycol. 2006;44(6):485-92.

Callejas A, Ordoñez N, Rodríguez MC, Castañeda E. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, serotype C, from the environment in Colombia. Med Mycol. 1998;36(5):341-4.

Campisi E, Mancianti F, Pini G, Faggi E, Gargani G. Investigation in Central Italy of the possible association between *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* and *Eucalyptus camaldulensis*. Eur J Epidemiol. 2003;18(4):357-62.

Casadevall A, Rosas AL, Nosanchuk JD. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. Curr Opin Microbiol. 2000;3(4):354-8. Review.

Casali AK, Goulart L, Rosa e Silva LK, Ribeiro AM, Amaral AA, Alves SH, Schrank A, Meyer W, Vainstein MH. Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. FEMS Yeast Res. 2003;3(4):405-15.

Chakrabarti A, Jatana M, Kumar P, Chatha L, Kaushal A, Padhye AA. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from *Eucalyptus camaldulensis* in India. J Clin Microbiol. 1997;35(12):3340-2.

Chandenier J, Adou-Bryn KD, Douchet C, Sar B, Kombila M, Swinne D, Thérizol-Ferly M, Buisson Y, Richard-Lenoble D. In vitro activity of amphotericin B, fluconazole and voriconazole against 162 *Cryptococcus neoformans* isolates from Africa and Cambodia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2004;23(6):506-8.

Chee HY, Lee KB. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A) from pigeon droppings in Seoul, Korea. *J Microbiol*. 2005;43(5):469-72.

Chen SC, Muller M, Zhou JZ, Wright LC, Sorrell TC. Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*: a new virulence factor? *J Infect Dis*. 1997;175(2):414-20.

Chen SC, Wright LC, Golding JC, Sorrell TC. Purification and characterization of secretory phospholipase B, lysophospholipase and lysophospholipase/transacylase from a virulent strain of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Biochem J*. 2000;347(Pt 2):431-9.

Clancy CJ, Nguyen MH, Alandoerffer R, Cheng S, Iczkowski K, Richardson M, Graybill JR. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* isolates recovered from persons with AIDS demonstrate a wide range of virulence during murine meningoencephalitis that correlates with the expression of certain virulence factors. *Microbiology*. 2006;152(Pt 8):2247-55.

Connolly JH, Krockenberger MB, Malik R, Canfield PJ, Wigney DI, Muir DB. Asymptomatic carriage of *Cryptococcus neoformans* in the nasal cavity of the koala (*Phascolarctos cinereus*). *Med Mycol*. 1999;37(5):331-8.

Cox GM, McDade HC, Chen SC, Tucker SC, Gottfredsson M, Wright LC, Sorrell TC, Leidich SD, Casadevall A, Ghannoum MA, Perfect JR. Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol*. 2001;39(1):166-75.

Davel G, Abrantes R, Brudny M, Córdoba S, Rodero L, Canteros CE, Perrotta D. [1st environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Argentina] Rev Argent Microbiol. 2003;35(2):110-2. Review. Spanish.

Dromer F, Mathoulin S, Dupont B, Letenneur L, Ronin O. Individual and environmental factors associated with infection due to *Cryptococcus neoformans* serotype D. French Cryptococcosis Study Group. Clin Infect Dis. 1996;23(1):91-6.

Dromer F, Mathoulin-Pélissier S, Launay O, Lortholary O; French Cryptococcosis Study Group. Determinants of disease presentation and outcome during cryptococcosis: the CryptoA/D study. PLoS Med. 2007;4(2):e21.

Ellis DH, Pfeiffer TJ. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. J Clin Microbiol. 1990;28(7):1642-4.

Eng RH, Bishburg E, Smith SM, Kapila R. Cryptococcal infections in patients with acquired immune deficiency syndrome. Am J Med. 1986;81(1):19-23.

Escandón P, Sánchez A, Martínez M, Meyer W, Castañeda E. Molecular epidemiology of clinical and environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex reveals a high genetic diversity and the presence of the molecular type VGII mating type a in Colombia. FEMS Yeast Res. 2006;6(4):625-35.

Filion T, Kidd S, Aguirre K. Isolation of *Cryptococcus laurentii* from Canada Goose guano in rural upstate New York. Mycopathologia. 2006;162(5):363-8.

Fortes ST, Lazéra MS, Nishikawa MM, Macedo RC, Wanke B. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var *gattii* from a native jungle tree in the Brazilian Amazon rainforest. Mycoses. 2001;44(5):137-40.

Franzot SP, Hamdan JS. In vitro susceptibilities of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* to five antifungal drugs. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40(3):822-4.

Garcia-Hermoso D, Mathoulin-Pélissier S, Couprie B, Ronin O, Dupont B, Dromer F. DNA typing suggests pigeon droppings as a source of pathogenic *Cryptococcus neoformans* serotype D. *J Clin Microbiol.* 1997;35(10):2683-5.

Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev.* 2000;13(1):122-43. Review.

Gomez-Lopez A, Zaragoza O, Dos Anjos Martins M, Melhem MC, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. In vitro susceptibility of *Cryptococcus gattii* clinical isolates. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(7):727-30.

Granados DP, Castañeda E. Isolation and characterization of *Cryptococcus neoformans* varieties recovered from natural sources in Bogotá, Colombia, and study of ecological conditions in the area. *Microb Ecol.* 2005;49(2):282-90.

Grover N, Nawange SR, Naidu J, Singh SM, Sharma A. Ecological niche of *Cryptococcus neoformans* var *grubii* and *Cryptococcus gattii* in decaying wood of trunk hollows of living trees in Jabalpur City of Central India. *Mycopathologia.* 2007;164(4):159-70.

Halliday CL, Bui T, Krockenberger M, Malik R, Ellis DH, Carter DA. Presence of alpha and a mating types in environmental and clinical collections of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* strains from Australia. *J Clin Microbiol.* 1999;37(9):2920-6.

Hamasha AM, Yildiran ST, Gonlum A, Saracli MA, Doganci L. *Cryptococcus neoformans* varieties from material under the canopies of eucalyptus trees and pigeon dropping samples from four major cities in Jordan. *Mycopathologia.* 2004;158(2):195-9.

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. 2005;43(11):5733-42.

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

Kidd SE, Hagen F, Tschärke RL, Huynh M, Bartlett KH, Fyfe M, Macdougall L, Boekhout T, Kwon-Chung KJ, Meyer W. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(49):17258-63.

Kidd SE, Chow Y, Mak S, Bach PJ, Chen H, Hingston AO, Kronstad JW, Bartlett KH. Characterization of environmental sources of the human and animal pathogen *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and the Pacific Northwest of the United States. Appl Environ Microbiol. 2007;73(5):1433-43.

Kobayashi CC, Souza LK, Fernandes Ode F, Brito SC, Silva AC, Sousa ED, Silva Mdo R. Characterization of *C. neoformans* var. *neoformans* isolated from urban environmental sources in Goiânia, Goiás state, Brazil. Rev. Inst. Med. Trop, 2005; 47 (4): 203-207.

Kozel TR. Virulence factors of *Cryptococcus neoformans*. Trends Microbiol. 1995;3(8):295-9. Review.

Kurtzman CP, Fell JW. The Yeast: A taxonomic study. Elsevier Science New York, 1998.

Kwon-Chung KJ, Wickes BL, Stockman L, Roberts GD, Ellis D, Howard DH. Virulence, serotype, and molecular characteristics of environmental strains of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. Infect Immun. 1992;60(5):1869-74.

Lagrou K, Van Eldere J, Keuleers S, Hagen F, Merckx R, Verhaegen J, Peetermans WE, Boekhout T. Zoonotic transmission of *Cryptococcus neoformans* from a magpie to an immunocompetent patient. *J Intern Med*. 2005;257(4):385-8.

Lazera MS, Wanke B, Nishikawa MM. Isolation of both varieties of *C. neoformans* from saprophytic sources in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *J Med Vet Mycol*, 1993; 31:449-454.

Lazéra MS, Pires FD, Camillo-Coura L, Nishikawa MM, Bezerra CC, Trilles L, Wanke B. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in decaying wood forming hollows in living trees. *J Med Vet Mycol*. 1996;34(2):127-31.

Lazera MS, Salmito Cavalcanti MA, Londero AT, Trilles L, Nishikawa MM, Wanke B. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. *Med Mycol*. 2000;38(5):379-83.

Leal AL, Faganello J, Fuentefria AM, Boldo JT, Bassanesi MC, Vainstein MH. Epidemiological profile of cryptococcal meningitis patients in Rio Grande do Sul, Brazil. *Mycopathologia*. 2008;166(2):71-5.

Licea, BA; Garza DG; Zuniga MT. Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* var. *gatti* de *Eucalyptus tereticornis*. *Rev Iberoam Micol*. 1996; 13:27-28.

Lindenberg Ade S, Chang MR, Paniago AM, Lazéra Mdos S, Moncada PM, Bonfim GF, Nogueira SA, Wanke B. Clinical and epidemiological features of 123 cases of cryptococcosis in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2008;50(2):75-8.

Littman ML, Borok R. Relation of the pigeon to cryptococcosis: natural carrier state, heat resistance and survival of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathol Mycol Appl*. 1968;35(3):329-45.

Liu L, Tewari RP, Williamson PR. Laccase protects *Cryptococcus neoformans* from antifungal activity of alveolar macrophages. *Infect Immun*. 1999;67(11):6034-9.

Litvintseva AP, Kestenbaum L, Vilgalys R, Mitchell TG. Comparative analysis of environmental and clinical populations of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol*. 2005;43(2):556-64.

Litvintseva AP, Lin X, Templeton I, Heitman J, Mitchell TG. Many globally isolated AD hybrid strains of *Cryptococcus neoformans* originated in Africa. *PLoS Pathog*. 2007;3(8):e114.

Lozano-Chiu M, Paetznick VL, Ghannoum MA, Rex JH. Detection of resistance to amphotericin B among *Cryptococcus neoformans* clinical isolates: performances of three different media assessed by using E-test and National Committee for Clinical Laboratory Standards M27-A methodologies. *J Clin Microbiol*. 1998;36(10):2817-22.

Lugarini C, Goebel CS, Condas LA, Muro MD, de Farias MR, Ferreira FM, Vainstein MH. *Cryptococcus neoformans* Isolated from Passerine and Psittacine bird excreta in the state of Paraná, Brazil. *Mycopathologia*. 2008;166(2):61-9.

Mahmoud YA. First environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* and var *gattii* from the Gharbia Governorate, Egypt. *Mycopathologia*. 1999;148(2):83-6.

Malik R, Wigney DI, Muir DB, Love DN. Asymptomatic carriage of *Cryptococcus neoformans* in the nasal cavity of dogs and cats. *J Med Vet Mycol*. 1997;35(1):27-31.

McClelland EE, Bernhardt P, Casadevall A. Coping with multiple virulence factors: which is most important? *PLoS Pathog*. 2005;1(4):e40.

McClelland EE, Bernhardt P, Casadevall A. Estimating the relative contributions of virulence factors for pathogenic microbes. *Infect Immun*. 2006;74(3):1500-4.

Medeiros Ribeiro A, Silva LK, Silveira Schrank I, Schrank A, Meyer W, Henning Vainstein M. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* serotype D from Eucalypts in South Brazil. *Med Mycol*. 2006;44(8):707-13.

Meyer W, Marszewska K, Amirmostofian M, Igreja RP, Hardtke C, Methling K, Viviani MA, Chindamporn A, Sukroongreung S, John MA, Ellis DH, Sorrell TC. 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*. 1999;20(8):1790-9.

Meyer W, Castañeda A, Jackson S, Huynh M, Castañeda E; IberoAmerican Cryptococcal Study Group. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerg Infect Dis*. 2003;9(2):189-95.

Mitchell TG, Perfect JR. Cryptococcosis in the era of AIDS--100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Microbiol Rev*. 1995;8(4):515-48.

Montagna MT, Viviani MA, Pulito A, Aralla C, Tortorano AM, Fiore L, Barbuti S. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Italy. *J Mycol Med* 7: 93-96, 1997.

Montenegro H, Paula CR. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* and *C. neoformans* var. *neoformans* in the city of São Paulo, Brazil. *Med Mycol*. 2000;38(5):385-90.

Moraes EM, Prímola NS, Hamdan JS. Antifungal susceptibility of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* to four antifungal drugs determined by two techniques. *Mycoses*. 2003;46(5-6):164-8.

Morera-López Y, Torres-Rodríguez JM, Jiménez-Cabello T, Baró-Tomás T, Alía-Aponte C, Lázera MS. DNA fingerprinting pattern and susceptibility to

antifungal drugs in *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* isolates from Barcelona city and rural environmental samples. *Mycopathologia*. 2005;160(1):9-14.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). 2002. Reference Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard, 2nd ed., M27-A2. National for Clinical Laboratory Standarts. Wayne Pa.

Nguyen MH, Yu CY. In vitro comparative efficacy of voriconazole and itraconazole against fluconazole-susceptible and -resistant *Cryptococcus neoformans* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998;42(2):471-2.

Nishikawa MM, Lazera MS, Barbosa GG, Trilles L, Balassiano BR, Macedo RC, Bezerra CC, Pérez MA, 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*. 2003;41(1):73-7.

Nosanchuk JD, Cleare W, Franzot SP, Casadevall A. Amphotericin B and fluconazole affect cellular charge, macrophage phagocytosis, and cellular morphology of *Cryptococcus neoformans* at subinhibitory concentrations. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43(2):233-9.a

Nosanchuk JD, Rudolph J, Rosas AL, Casadevall A. Evidence that *Cryptococcus neoformans* is melanized in pigeon excreta: implications for pathogenesis. *Infect Immun*. 1999;67(10):5477-9.b

Pal, M. First report of isolation of *C. neoformans* var. *neoformans*. from avian excreta in Kathmandu, Nepal. *Rev Iberoam Micol*. 1997;14(4):181-3.

Passoni LF, Wanke B, Nishikawa MM, Lazera MS. *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*. 1998;36(5):305-11.

Passoni, LFC. Wood, animals and humans being as reservoirs for human *Cryptococcus neoformans* infection. Rev Iberoam Micol. 1999; 16: 77-81.

Pedroso RS, Ferreira JC, Candido RC. The isolation and characterization of virulence factors of *Cryptococcus* spp. from saprophytic sources in the city of Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. Microbiol Res. 2007 Apr 9.

Pérez C, Dolande M, Moya M, Roselló A, de Capriles CR, Landaeta ME, Mata-Essayag S. *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*: serotypes in Venezuela. Mycopathologia. 2008;166(3):149-53.

Pfaller MA, Diekema DJ, Rex JH, Espinel-Ingroff A, Johnson EM, Andes D, Chaturvedi V, Ghannoum MA, Odds FC, Rinaldi MG, Sheehan DJ, Troke P, Walsh TJ, Warnock DW. Correlation of MIC with outcome for *Candida* species tested against voriconazole: analysis and proposal for interpretive breakpoints. J Clin Microbiol. 2006;44(3):819-26.

Pfeiffer, TJ; Ellis DH. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. from California. J Infect Dis, 1991; 163: 929-930.

Pfeiffer, TJ; Ellis DH. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from *Eucalyptus tereticornis*. J Med Vet Mycol, 1992; 30:407-408.

Pfeiffer, TJ; Ellis DH. Additional isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* International Meeting of the Australian and New Zealand Societies of Microbiology, Christchurch, New Zealand, 1996, Abstract p.56.

Polak A. Virulence of *Candida albicans* mutants. Mycoses. 1992;35(1-2):9-16.

Polacheck I, Hearing VJ, Kwon-Chung KJ. Biochemical studies of phenoloxidase and utilization of catecholamines in *Cryptococcus neoformans*. J Bacteriol. 1982;150(3):1212-20.

Polacheck I, Platt Y, Aronovitch J. Catecholamines and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*. 1990;58(9):2919-22.

Powell KE, Dahl BA, Weeks RJ, Tosh FE. Airborne *Cryptococcus neoformans*: particles from pigeon excreta compatible with alveolar deposition. *J Infect Dis*. 1972;125(4):412-5.

Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia*. 1982;20(1):7-14.

Randhawa HS, Mussa AY, Khan ZU. Decaying wood in tree trunk hollows as a natural substrate for *Cryptococcus neoformans* and other yeast-like fungi of clinical interest. *Mycopathologia*. 2001;151(2):63-9.

Randhawa HS, Kowshik T, Khan ZU. Decayed wood of *Syzygium cumini* and *Ficus religiosa* living trees in Delhi/New Delhi metropolitan area as natural habitat of *Cryptococcus neoformans*. *Med Mycol*. 2003;41(3):199-209.

Randhawa HS, Kowshik T, Preeti Sinha K, Chowdhary A, Khan ZU, Yan Z, Xu J, Kumar A. Distribution of *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans* in decayed trunk wood of *Syzygium cumini* trees in north-western India. *Med Mycol*. 2006;44(7):623-30.

Raven, PH, Evert, RT, Curtis, H. *Biologia vegetal*. 6a ed. Rio de Janeiro. Ed Guanabara, 2001.

Reimão JQ, Drummond ED, Terceti Mde S, Lyon JP, Franco MC, de Siqueira AM. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from hollows of living trees in the city of Alfenas, MG, Brazil. *Mycoses*. 2007;50(4):261-4.

Ribeiro MA, Ngamskulrungraj P. Molecular characterization of environmental *Cryptococcus neoformans* isolated in Vitoria, ES, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2008;50(6):315-20.

Rhodes JC, Polacheck I, Kwon-Chung KJ. Phenoloxidase activity and virulence in isogenic strains of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*. 1982;36(3):1175-84.

Rhodes JC. A simplified assay for cryptococcal phenoloxidase. *Mycologia*. 1986; 78 (5): 867-868.

Rodrigues ML, Alviano CS, Travassos LR. Pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*: virulence factors and immunological mechanisms. *Microbes Infect*. 1999;1(4):293-301. Review.

Rosario I, Acosta B, Colom MF. Pigeons and other birds as a reservoir for *Cryptococcus* spp. *Rev Iberoam Micol*. 2008;25(1):S13-8. Review.

Saag MS, Graybill RJ, Larsen RA, Pappas PG, Perfect JR, Powderly WG, Sobel JD, Dismukes WE. Practice guidelines for the management of cryptococcal disease. Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2000;30(4):710-8.

Saito K, Sugatani J, Okumura T. Phospholipase B from *Penicillium notatum*. *Methods Enzymol*. 1991;197:446-56.

Schmiel DH, Miller VL. Bacterial phospholipases and pathogenesis. *Microbes Infect*. 1999;1(13):1103-12. Review.

Siafakas AR, Sorrell TC, Wright LC, Wilson C, Larsen M, Boadle R, Williamson PR, Djordjevic JT. Cell wall-linked cryptococcal phospholipase B1 is a source of secreted enzyme and a determinant of cell wall integrity. *J Biol Chem*. 2007;282(52):37508-14.

Silva PR, Rabelo RA, Terra AP, Teixeira DN. Susceptibility to antifungal agents among *Cryptococcus neoformans* varieties isolated from patients at a university hospital. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008;41(2):158-62.

Soares MC, Paula CR, Dias AL, Caseiro MM, Costa SO. Environmental strains of *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* in the city of Santos, SP, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2005;47(1):31-6.

Sorrell TC, Brownlee AG, Ruma P, Malik R, Pfeiffer TJ, Ellis DH. Natural environmental sources of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. J Clin Microbiol. 1996 May;34(5):1261-3.a

Sorrell TC, Chen SC, Ruma P, Meyer W, Pfeiffer TJ, Ellis DH, Brownlee AG. Concordance of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* by random amplification of polymorphic DNA analysis and PCR fingerprinting. J Clin Microbiol. 1996;34(5):1253-60.b

Souza LK, Fernandes Ode F, Kobayashi CC, Passos XS, Costa CR, Lemos JA, Souza-Júnior AH, Silva Mdo R. Antifungal susceptibilities of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* in Goiânia city, Goiás, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2005;47(5):253-6.

Staib, F. *Cryptococcus neoformans* and *Guizotia abyssinica* fabrication for *C. neoformans*. Zentralbl Hig, 1962,v.148, p.466-75.

Steenbergen JN, Casadevall A. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. Microbes Infect. 2003;5(7):667-75. Review.

Stephen C, Lester S, Black W, Fyfe M, Raverty S. Multispecies outbreak of cryptococcosis on southern Vancouver Island, British Columbia. Can Vet J. 2002;43(10):792-4.

Tay ST, Chai HC, Na SL, Hamimah H, Rohani MY, Soo-Hoo TS. The isolation, characterization and antifungal susceptibilities of *Cryptococcus neoformans* from bird excreta in Klang Valley, Malaysia. Mycopathologia. 2005;159(4):509-13.

Tay ST, Tanty Haryanty T, Ng KP, Rohani MY, Hamimah H. In vitro susceptibilities of Malaysian clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii* to five antifungal drugs. *Mycoses*. 2006;49(4):324-30.

Thompson GR 3rd, Wiederhold NP, Fothergill AW, Vallor AC, Wickes BL, Patterson TF. Antifungal susceptibilities among different serotypes of *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(1):309-11.

Tintelnot K, Schär G, Polak A. Epidemiological data of cryptococcosis in Austria, Germany and Switzerland: part of the ECMM survey in Europe. *European Confederation of Medical Mycology. Mycoses*. 2001;44(9-10):345-50.

Torres-Rodríguez JM, Alvarado-Ramírez E, Murciano F, Sellart M. MICs and minimum fungicidal concentrations of posaconazole, voriconazole and fluconazole for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *J Antimicrob Chemother*. 2008;62(1):205-6.

Trilles L, Lazéra M, Wanke B, Theelen B, Boekhout T. Genetic characterization of environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex from Brazil. *Med Mycol*. 2003;41(5):383-90.

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

Trilles L, Lazéra Mdos S, Wanke B, Oliveira RV, Barbosa GG, Nishikawa MM, Morales BP, Meyer W. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008;103(5):455-62.

Universidade Federal do Espírito Santo. Biblioteca Central. Normalização e apresentação de trabalhos científicos e acadêmicos/ Universidade Federal do Espírito Santo, Biblioteca Central. – Vitória, ES: A Biblioteca, 2006.

van Belkum A. DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR. *Clin Microbiol Rev.* 1994;7(2):174-84. Review.

van Duin D, Cleare W, Zaragoza O, Casadevall A, Nosanchuk JD. Effects of voriconazole on *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(6):2014-20.

Vassart G, Georges M, Monsieur R, Brocas H, Lequarre AS, Christophe D. A sequence in M13 phage detects hypervariable minisatellites in human and animal DNA. *Science.* 1987;235(4789):683-4.

Vidotto V, Sinicco A, Di Fraia D, Cardaropoli S, Aoki S, Ito-Kuwa S. Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia.* 1996-1997;136(3):119-23.

Vidotto V, Leone R, Sinicco A, Ito-kuwa S, Criseo G. Comparison of phospholipase production in *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients and bird droppings. *Mycopathologia.* 1998;142(2):71-6.

Vidotto V, Melhem M, Pukinskas S, Aoki S, Carrara C, Pugliese A. Extracellular enzymatic activity and serotype of *Cryptococcus neoformans* strains isolated from AIDS patients in Brazil. *Rev Iberoam Micol.* 2005;22(1):29-33.

Vidotto V, Defina N, Pugliese A, Aoki S, Nakamura K, Takeo K. Effect of different K⁺ concentrations on *Cryptococcus neoformans* phenoloxidase activity. *Mycopathologia.* 2002;156(3):171-6.

Vilcins I, Krockenberger M, Agus H, Carter D. Environmental sampling for *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from the Blue Mountains National Park, Sydney, Australia. *Med Mycol.* 2002;40(1):53-60.

Wang Y, Casadevall A. Decreased susceptibility of melanized *Cryptococcus neoformans* to UV light. *Appl Environ Microbiol.* 1994;60(10):3864-6.

Williamson, PR. Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans*: identification as a lactase. *J Bacteriol,* 1994; 140:19-26.

Yildiran ST, Saracli MA, Fothergill AW, Rinaldi MG. In vitro susceptibility of environmental *Cryptococcus neoformans* variety *neoformans* isolates from Turkey to six antifungal agents, including SCH56592 and voriconazole. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2000;19(4):317-9.

Zhu X, Gibbons J, Garcia-Rivera J, Casadevall A, Williamson PR. Laccase of *Cryptococcus neoformans* is a cell wall-associated virulence factor. *Infect Immun.* 2001;69(9):5589-96.

Zhu X, Williamson PR. Role of laccase in the biology and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Yeast Res.* 2004;5(1):1-10. Review.

ANEXO A – Tabelas de isolamento ambiental de *Cryptococcus* spp.

Tabela 8 - Isolamento de *C. neoformans* no Brasil e em diferentes partes do mundo a partir de excrementos de aves.

| Local | Amostras positivas (%) | Total de amostras | Referência |
|----------|------------------------|-------------------|-------------------------------------|
| Nepal | 7 (25) | 28 | Pal (1997) |
| Jordânia | 9 (2) | 509 | Hamasha <i>et al.</i> (2004) |
| Coreia | 17 (24) | 72 | Chee; Lee, (2005) |
| Malásia | 20 (0,4) | 544 | Tay <i>et al.</i> (2005) |
| França | 29 (100) | 29 | Garcia-Hermoso <i>et al.</i> (1997) |
| Espanha | 12 (17) | 71 | Morera-López <i>et al.</i> (2005) |
| Brasil | 10 (26) | 38 | Montenegro e Paula (2000) |
| Brasil | 11 (13,9) | 16 | Soares <i>et al.</i> (2005) |
| Brasil | 36 (20,3) | 177 | Kobayashi <i>et al.</i> (2005) |
| Brasil | 10 (18,18) | 55 | Abegg <i>et al.</i> (2006) |
| Brasil | 41 (48) | 86 | Pedroso <i>et al.</i> (2007) |
| Brasil | 35 (25,53) | 141 | Lugarini <i>et al.</i> (2008) |
| Brasil | 10 (30) | 30 | Ribeiro e Ngamskulrungrroj (2008) |

Tabela 9 - Isolamento ambiental de *Cryptococcus gattii* no Brasil.

| Local | Amostras positivas (%) | Total de amostras | Tipo de material vegetal | Referências |
|-------------------|------------------------|-------------------|---|-----------------------------|
| Norte | | | | |
| Amazônia | - | - | oco de <i>Guettarda acreana</i> | Fortes <i>et al.</i> (2001) |
| Piauí | 9 (28%) | 32 | <i>Moquilea tomentosa</i> e duas da espécie <i>Cassia grandis</i> | Lazera <i>et al.</i> (2000) |
| São Paulo | 2 (8,3%) | 24 | detritos de <i>Eucalyptus</i> spp. | Montenegro e Paula (2000) |
| Sudeste | | | | |
| Espírito Santo | 0 (0%) | 136 | <i>Mangifera indica</i> (mangueira), <i>Cassia fistula</i> (cássia-imperial), <i>Licania tomentosa</i> (oiti), <i>Caesalpinia ferrea</i> (pau ferro), <i>Senna siamea</i> (cássia amarela), <i>Cassia ferruginea</i> (canafístula), <i>Tabebuia rosea</i> (ipê rosa), <i>Tabebuia impetiginosa</i> (ipê roxo), <i>Pinus</i> sp. (pinheiro), <i>Bauhinia variegata</i> (unha-de-vaca), <i>Persea gratissima</i> (abacaterio), <i>Caesalpinia peltophoroides</i> (sibipiruna), <i>Cestrum nocturnum</i> (dama-da-noite), <i>Chorisia speciosa</i> (paineira rosa), <i>Caesalpinia echinata</i> (pau brasil), <i>Tibouchina granulosa</i> (quaresmeira), <i>Piptadenia colubrina</i> (angico branco), <i>Delonix regia</i> (flamboyant), <i>Ficus microcarpa</i> (figueira), <i>Tamarindus indica</i> (tamarindo), <i>Carica papaya</i> (pé-de-mamão), <i>Spondias mombin</i> (pé-de-cajá), troncos de árvores em decomposição, árvores de Ecossistemas Costeiros (Floresta de Restinga) e árvores de grande e médio porte da Floresta Atlântica . | Baltazar e Ribeiro (2008) |
| Espírito Santo | 2 (6,2%) | 32 | Árvores nativas de Mata Atlântica | Baltazar e Ribeiro (2008) |
| Sul | | | | |
| Rio Grande de Sul | 13 (34%) | 38 | material fecal de pássaros | Abegg <i>et al.</i> (2006) |

Tabela 10 – Isolamento, a partir de material de árvores, de *Cryptococcus gattii* e *C. neoformans* em diferentes regiões geográficas do mundo.

| Pais | Amostras positivas (%) | Total de amostras | Tipo de material vegetal | Referências |
|------------------|------------------------|-------------------|---|---------------------------------------|
| Oceania | | | | |
| Austrália | 3 (3%) | 99 | <i>Syncarpia glomulifera</i> , <i>A. costata</i> , <i>E. punctata</i> , <i>E. pauciflora</i> , <i>E. piperita</i> , <i>E. racemosa</i> , <i>E. tetrapleura</i> , <i>Melaleuca quinquenerua</i> e outra árvores não identificada. | Vilcins <i>et al.</i> (2002) |
| Ásia | | | | |
| Índia | 5 (1,3%) | 368 | <i>Eucalyptus camaldulensis</i> , <i>Eucalyptus citriodora</i> e <i>Eucalyptus tereticornis</i> | Chakrabarti <i>et al.</i> (1997) |
| Índia | 4 (0,7%) | 543 | <i>Eucalyptus camaldulensis</i> , <i>Eucalyptus tereticornis</i> , <i>Syzygium cumini</i> , <i>Ficus religiosa</i> , <i>Sphagnum</i> sp., <i>Acácia arábica</i> , <i>Melia azaderechta</i> | Randhawa, Mussa e Khan (2001) |
| Índia | 14 (21%) | 66 | <i>Syzygium cumini</i> e <i>Ficus religiosa</i> | Randhawa, Kowshik e Khan (2003) |
| Índia | 82 (41%) | 200 | <i>Syzygium cumini</i> | Randhawa <i>et al.</i> (2006) |
| Índia | 10 (6,7%) | 148 | oco de <i>Mangifera indica</i> , <i>Tamarindus indica</i> , <i>Pithecolobium dulce</i> e tronco de <i>Syzygium cumini</i> | Grover <i>et al.</i> (2007) |
| Jordânia | 0 (0%) | 500 | <i>Eucalyptos</i> spp. | Hamasha <i>et al.</i> (2004) |
| Egito | 3 (1,2%) | 245 | flor de <i>Eucalyptus camaldulensis</i> | Mahmoud (1999) |
| Europa | | | | |
| Espanha | 0 (0%) | 232 | poeira e <i>Eucalyptus</i> spp. | Morera-López <i>et al.</i> (2005) |
| Itália | - | - | detritos de <i>Eucalyptus camaldulensis</i> | Montagna <i>et al.</i> (1997) |
| Itália | 7 (0,7%) | 900 | <i>Eucalyptus camaldulensis</i> | Campisi <i>et al.</i> (2003) |
| América de Norte | | | | |
| Canadá | 58 (0,8%) | 732 | <i>Alluns</i> spp., <i>Cedrus</i> spp., <i>Pseudotsuga</i> spp. e outras não identificadas e material de árvores, solo, ar, água potável, água do mar | Kidd <i>et al.</i> (2004) |
| Canadá | 519 (9%) | 5.704 | material de árvores, solo, ar, água potável, água do mar | Kidd <i>et al.</i> (2007) |
| Estados Unidos | - | - | <i>Eucalyptus camaldulensis</i> | Pfeiffer e Ellis (1991) |
| América Central | | | | |
| México | 7 (28%) | 25 | detritos (tronco, folhas e solo) de <i>Eucalyptus tereticornis</i> | Licea <i>et al.</i> (1996) |
| América do Sul | | | | |
| Colômbia | 2 (3%) | 68 | detritos de <i>Terminalia catappa</i> | Callejas <i>et al.</i> (1998) |
| Colômbia | 38 (7,9%) | 480 | <i>Ficus soatensis</i> , <i>Ficus tequendamae</i> , <i>Croton bogotanus</i> , <i>Croton funkianus</i> , <i>Coussapoa</i> sp., <i>Pinus radiata</i> , <i>Cupressus lusitanica</i> , <i>Acacia decurrens</i> , <i>Eucalyptus</i> spp. | Gramados e Castañeda (2005) |
| Colômbia | 57 (2%) | 2.816 | <i>Eucalyptus</i> spp., <i>Laurus</i> spp. | Escandon <i>et al.</i> (2006) |
| Argentina | 2 (2%) | 100 | <i>Eucalyptos</i> spp. | Davel <i>et al.</i> (2003) |
| Brasil | 5 (14,3%) | 35 | <i>Eucalyptos</i> spp. | Kobayashi <i>et al.</i> (2005) |
| Brasil | 2 (4%) | 54 | <i>Caesalpinia peltophoroides</i> , <i>Anadenanthera peregrina</i> | Reimão <i>et al.</i> (2007) |
| Brasil | 4 (4%) | 96 | <i>Eucalyptos</i> spp. | Montenegro e Paula (2000) |
| Brasil | 9 (9%) | 99 | <i>Eucalyptus camaldulensis</i> e <i>Eucalyptus tereticornis</i> | Medeiros Ribeiro <i>et al.</i> (2006) |

ANEXO B – Identificação bioquímica das espécies de *Cryptococcus* spp.

Tabela 11 - Identificação bioquímica de *Cryptococcus* spp. de origem clínica

| Amostra | Gli | Lac | Ino | Raf | Dul | Cel | Rham | Mel | NO3 | Nankin | Urease | CBG | Espécie |
|---------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|--------|--------|-----|----------------------|
| 1 | + | - | + | - | + | - | + | - | - | + | + | - | <i>C. neoformans</i> |
| 2 | + | - | + | - | + | - | + | - | - | + | + | - | <i>C. neoformans</i> |
| 3 | + | - | + | - | + | - | + | - | - | + | + | - | <i>C. neoformans</i> |
| 4 | + | - | + | - | + | - | + | - | - | + | + | - | <i>C. neoformans</i> |
| 5 | + | - | + | - | + | - | + | - | - | + | + | - | <i>C. neoformans</i> |
| 6 | + | - | + | - | + | + | + | - | - | + | + | - | <i>C. neoformans</i> |
| 7 | + | - | + | - | + | + | + | + | - | + | + | - | <i>C. neoformans</i> |
| 8 | + | - | + | - | + | + | + | - | - | + | + | - | <i>C. neoformans</i> |
| 10 | + | - | + | - | + | - | + | - | - | + | + | - | <i>C. neoformans</i> |
| 11 | + | - | + | + | + | - | + | - | - | + | + | - | <i>C. neoformans</i> |
| 13 | + | - | + | - | + | + | + | - | - | + | + | - | <i>C. neoformans</i> |
| 14 | + | - | + | - | + | - | + | - | - | + | + | - | <i>C. neoformans</i> |
| 15 | + | - | + | - | + | - | + | - | - | + | + | - | <i>C. neoformans</i> |
| 16 | + | - | + | - | + | - | + | - | - | + | + | - | <i>C. neoformans</i> |
| 17 | + | - | + | - | + | - | + | - | - | + | + | - | <i>C. neoformans</i> |
| 18 | + | - | + | - | + | + | + | - | - | + | + | - | <i>C. neoformans</i> |
| 19 | + | - | + | - | + | + | + | - | - | + | + | - | <i>C. neoformans</i> |
| 20 | + | - | + | - | + | + | + | - | - | + | + | - | <i>C. neoformans</i> |
| 21 | + | - | + | + | + | + | + | - | - | + | + | - | <i>C. neoformans</i> |
| 24 | + | - | + | + | + | - | + | - | - | + | + | - | <i>C. neoformans</i> |
| 28 | + | - | + | - | | + | + | - | - | + | + | + | <i>C. gattii</i> |
| 30 | + | - | + | - | + | - | + | - | - | + | + | - | <i>C. neoformans</i> |

(continua)

Tabela 11 - Identificação bioquímica de *Cryptococcus* spp. de origem clínica

| Amostra | Gli | Lac | Ino | Raf | Dul | Cel | Rham | Mel | NO3 | Urease | Nankin | CBG | (continuação) |
|---------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|--------|--------|-----|----------------------|
| | | | | | | | | | | | | | Espécie |
| 31 | + | - | + | - | + | - | + | - | - | + | + | - | <i>C. neoformans</i> |
| 33 | + | - | + | - | + | - | + | - | - | + | + | - | <i>C. neoformans</i> |
| 35 | + | - | + | - | + | - | + | - | - | + | + | - | <i>C. neoformans</i> |
| 36 | + | - | + | - | + | - | + | - | - | + | + | - | <i>C. neoformans</i> |
| 38 | + | - | + | - | + | - | + | - | - | + | + | - | <i>C. neoformans</i> |
| 40 | + | - | + | - | + | - | + | - | - | + | + | + | <i>C. gattii</i> |
| 41 | + | - | + | - | + | - | + | - | - | + | + | - | <i>C. neoformans</i> |
| 45 | + | - | + | - | + | - | + | - | - | + | + | - | <i>C. neoformans</i> |
| 49 | + | - | + | - | + | - | + | - | - | + | + | - | <i>C. neoformans</i> |
| 50 | + | - | + | - | + | - | + | - | - | + | + | - | <i>C. neoformans</i> |
| 51 | + | - | | - | + | + | + | - | - | + | + | - | <i>C. neoformans</i> |
| 52 | + | - | + | - | + | + | + | + | - | + | + | - | <i>C. neoformans</i> |
| 53 | + | - | + | - | + | - | + | - | - | + | + | - | <i>C. neoformans</i> |
| 54 | + | - | + | - | + | - | + | - | - | + | + | - | <i>C. neoformans</i> |
| 56 | + | - | + | + | + | - | + | - | - | + | + | - | <i>C. neoformans</i> |
| 57 | + | - | + | - | + | + | + | - | - | + | + | - | <i>C. neoformans</i> |
| 58 | + | - | + | - | + | - | + | - | - | + | + | - | <i>C. neoformans</i> |
| 59 | + | - | + | - | + | - | + | - | - | + | + | - | <i>C. neoformans</i> |
| 60 | + | - | + | - | + | - | + | - | - | + | + | - | <i>C. neoformans</i> |
| 62 | + | - | + | - | + | - | + | - | - | + | + | + | <i>C. gattii</i> |
| 63 | + | - | + | - | + | - | + | - | - | + | + | - | <i>C. neoformans</i> |
| 64 | + | - | + | - | + | - | + | - | - | + | + | - | <i>C. neoformans</i> |
| 65 | + | - | + | - | + | - | + | - | - | + | + | - | <i>C. neoformans</i> |
| 66 | + | - | + | + | + | + | + | - | - | + | + | - | <i>C. neoformans</i> |
| 67 | + | - | + | + | + | - | + | - | - | + | + | - | <i>C. neoformans</i> |

Tabela 11 - Identificação bioquímica de *Cryptococcus* spp. de origem clínica

| Amostra | Gli | Lac | Ino | Raf | Dul | Cel | Rham | Mel | NO3 | Urease | Nankin | CBG | (conclusão) |
|---------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|--------|--------|-----|----------------------|
| | | | | | | | | | | | | | Espécie |
| 68 | + | - | + | + | + | - | + | - | - | + | + | - | <i>C. neoformans</i> |
| 69 | + | - | + | + | + | - | + | - | - | + | + | - | <i>C. neoformans</i> |
| 70 | + | - | + | + | + | - | + | - | - | + | + | - | <i>C. neoformans</i> |
| 71 | + | - | + | + | + | - | + | - | - | + | + | - | <i>C. neoformans</i> |

Gli – glicose, Lac – lactose, Ino – inositol, Raf – rafinose, Dul – dulcitol, Cel – celobiose, Rham – rhaminose, Mel – melobiose, NO3 – não assimilação de Nitrato, Nankin – visualização de cápsula ao microscópio óptico, CGB – viragem da cor do meio de amarelo para azul.

Tabela 12 - Identificação bioquímica de *Cryptococcus* spp. de origem ambiental

| Amostra | Gli | Lac | Ino | Raf | Dul | Cel | Rham | Mel | NO3 | Urease | Nankin | CBG | (continua) |
|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|--------|--------|-----|----------------------|
| | | | | | | | | | | | | | Espécie |
| 48 | + | - | + | + | + | + | + | - | - | + | + | + | <i>C. gattii</i> |
| 146 | + | - | + | + | + | + | + | - | - | + | + | + | <i>C. gattii</i> |
| 243 | + | - | + | - | + | - | + | - | - | + | + | - | <i>C. neoformans</i> |
| 250 | + | - | + | - | + | - | + | - | - | + | + | - | <i>C. neoformans</i> |
| 106 | + | - | + | - | + | - | + | - | - | + | + | - | <i>C. neoformans</i> |
| 240 | + | - | + | - | + | - | + | - | - | + | + | - | <i>C. neoformans</i> |
| 254 | + | - | + | + | + | + | + | + | - | + | + | - | <i>C. neoformans</i> |
| 101 | + | - | + | + | + | - | + | - | - | + | + | - | <i>C. neoformans</i> |
| 148 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | <i>C. laurentii</i> |
| A2P1A2 | + | - | + | + | - | + | + | - | - | + | + | - | <i>C. neoformans</i> |
| SCM P2A2 | + | - | + | + | - | + | + | - | - | + | + | - | <i>C. neoformans</i> |
| SCM P1A2 | + | - | + | + | - | + | + | - | - | + | + | - | <i>C. neoformans</i> |
| MT P3A2 | + | - | + | + | - | + | + | - | - | + | + | - | <i>C. neoformans</i> |
| EPCP1A1 | + | - | + | + | - | + | + | - | - | + | + | - | <i>C. neoformans</i> |

Tabela 12 - Identificação bioquímica de *Cryptococcus* spp. de origem ambiental

| Amostra | Gli | Lac | Ino | Raf | Dul | Cel | Rham | Mel | NO3 | Urease | Nankin | CBG | (conclusão) |
|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|--------|--------|-----|----------------------|
| | | | | | | | | | | | | | Espécie |
| EPCP1A2 | + | - | + | + | - | + | + | - | - | + | + | - | <i>C. neoformans</i> |
| CFP2 | + | - | + | + | - | + | + | - | - | + | + | - | <i>C. neoformans</i> |
| P4A3A2 | + | - | + | + | - | + | + | - | - | + | + | - | <i>C. neoformans</i> |
| M. AMB. | + | - | + | + | - | + | + | - | - | + | + | - | <i>C. neoformans</i> |
| SCM P4A2 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | <i>C. laurentii</i> |
| PSJC P1A1 | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | - | <i>C. albidus</i> |

Gli – glicose, Lac – lactose, Ino – inositol, Raf – rafinose, Dul – dulcitol, Cel – celobiose, Rham – rhaminose, Mel – melobiose, NO3 – não assimilação de Nitrato, Nankin – visualização de cápsula ao microscópio óptico, CGB – viragem da cor do meio de amarelo para azul.

ANEXO C – Resultados dos testes de suscetibilidade dos isolados clínicos e ambientais de *Cryptococcus* spp.

Tabela 13 - Resultados do teste de suscetibilidade (em CIM) das cepas ambientais de *Cryptococcus neoformans*

| Nº amostra | ITZ | AMB | FCZ | VCZ |
|------------|-------|-------|------|-------|
| 101 | 0,19 | 0,008 | 12,0 | 0,047 |
| 240 | 0,047 | 0,008 | 6,0 | 0,064 |
| 250 | 0,094 | 0,008 | 12,0 | 0,064 |
| 254 | 0,094 | 0,094 | 8,0 | 0,023 |
| 106 | 0,094 | 0,19 | 12,0 | 0,047 |
| 243 | 0,094 | 0,25 | 12,0 | 0,047 |
| EPC P1A1 | 0,094 | 0,19 | 6,0 | 0,032 |
| A2 P1A2 | 0,38 | 0,19 | 12,0 | 0,064 |
| P4 A3A1 | 0,25 | 0,125 | 12,0 | 0,032 |
| CF P2 | 0,094 | 0,094 | 8,0 | 0,047 |
| MT P3A2 | 0,094 | 0,125 | 12,0 | 0,047 |
| SCM P2A1 | 0,25 | 0,125 | 12,0 | 0,047 |
| EPC P1A2 | 0,125 | 0,125 | 8,0 | 0,047 |
| SCM P2A2 | 0,032 | 0,25 | 12,0 | 0,032 |
| M. AMB. | 0,094 | 0,25 | 8,0 | 0,023 |

Tabela 14 - Resultados do teste de suscetibilidade (em CIM) das cepas clínicas de *C. neoformans*.

| Nº amostra | ITZ | AMB | FCZ | (continua) |
|------------|-------|-------|------|------------|
| | | | | VZC |
| 1 | 0,064 | 0,094 | 12,0 | 0,032 |
| 2 | 0,064 | 0,125 | 4,0 | 0,016 |
| 3 | 0,094 | 0,25 | 8,0 | 0,016 |
| 4 | 0,064 | 0,25 | 8,0 | 0,023 |
| 5 | 0,125 | 0,25 | 8,0 | 0,016 |
| 6 | 0,064 | 0,38 | 6,0 | 0,016 |
| 7 | 0,125 | 0,50 | 8,0 | 0,032 |
| 8 | 0,125 | 0,50 | 8,0 | 0,064 |
| 10 | 0,25 | 0,25 | 12,0 | 0,047 |
| 11 | 0,094 | 0,38 | 4,0 | 0,016 |
| 13 | 0,125 | 0,38 | 8,0 | 0,047 |
| 14 | 0,38 | 0,25 | 6,0 | 0,047 |
| 15 | 0,125 | 0,38 | 3,0 | 0,012 |
| 16 | 0,19 | 0,50 | 12,0 | 0,047 |
| 17 | 0,19 | 0,25 | 8,0 | 0,032 |
| 18 | 0,25 | 0,38 | 6,0 | 0,032 |
| 19 | 0,25 | 0,25 | 12,0 | 0,032 |
| 20 | 0,012 | 0,094 | 2,0 | 0,006 |
| 21 | 0,064 | 0,38 | 4,0 | 0,012 |
| 24 | 0,043 | 0,50 | 6,0 | 0,047 |

Tabela 14 - Resultados do teste de suscetibilidade (em CIM) das cepas clínicas de *C. neoformans*.

| N° amostra | (continuação) | | | |
|------------|---------------|-------|------|-------|
| | ITZ | AMB | FCZ | VCZ |
| 30 | 0,064 | 0,25 | 8,0 | 0,032 |
| 31 | 0,125 | 0,25 | 16,0 | 0,064 |
| 33 | 0,19 | 0,25 | 12,0 | 0,032 |
| 35 | 0,016 | 0,50 | 4,0 | 0,006 |
| 36 | 0,19 | 0,50 | 8,0 | 0,064 |
| 38 | 0,19 | 0,25 | 16,0 | 0,016 |
| 41 | 0,064 | 0,094 | 32,0 | 0,016 |
| 45 | 0,064 | 0,19 | 8,0 | 0,032 |
| 49 | 0,125 | 0,38 | 6,0 | 0,016 |
| 50 | 0,125 | 0,25 | 16,0 | 0,032 |
| 51 | 0,064 | 0,25 | 8,0 | 0,023 |
| 52 | 0,094 | 0,19 | 6,0 | 0,032 |
| 53 | 0,38 | 0,50 | 12,0 | 0,094 |
| 54 | 0,125 | 0,38 | 32,0 | 0,094 |
| 56 | 0,125 | 0,38 | 16,0 | 0,064 |
| 57 | 0,125 | 0,125 | 6,0 | 0,032 |
| 58 | 0,094 | 0,38 | 4,0 | 0,012 |
| 59 | 0,047 | 0,38 | 4,0 | 0,012 |
| 60 | 0,19 | 0,25 | 8,0 | 0,047 |
| 63 | 0,047 | 0,008 | 12,0 | 0,047 |
| 64 | 0,094 | 0,25 | 12,0 | 0,047 |
| 65 | 0,032 | 0,032 | 0,75 | 0,016 |
| 66 | 0,094 | 0,023 | 8,0 | 0,032 |
| 67 | 0,125 | 0,016 | 16,0 | 0,064 |
| 68 | 0,25 | 0,125 | 8,0 | 0,047 |
| 69 | 0,125 | 0,19 | 8,0 | 0,064 |
| 70 | 0,50 | 0,094 | 16,0 | 0,032 |
| 71 | 0,064 | 0,064 | 12,0 | 0,008 |
| 30 | 0,064 | 0,25 | 8,0 | 0,032 |
| 31 | 0,125 | 0,25 | 16,0 | 0,064 |
| 33 | 0,19 | 0,25 | 12,0 | 0,032 |
| 35 | 0,016 | 0,50 | 4,0 | 0,006 |
| 36 | 0,19 | 0,50 | 8,0 | 0,064 |
| 38 | 0,19 | 0,25 | 16,0 | 0,016 |
| 53 | 0,38 | 0,50 | 12,0 | 0,094 |
| 54 | 0,125 | 0,38 | 32,0 | 0,094 |
| 56 | 0,125 | 0,38 | 16,0 | 0,064 |
| 57 | 0,125 | 0,125 | 6,0 | 0,032 |
| 58 | 0,094 | 0,38 | 4,0 | 0,012 |
| 59 | 0,047 | 0,38 | 4,0 | 0,012 |
| 60 | 0,19 | 0,25 | 8,0 | 0,047 |
| 62 | 0,75 | 0,25 | >256 | 0,125 |
| 63 | 0,047 | 0,008 | 12,0 | 0,047 |
| 64 | 0,094 | 0,25 | 12,0 | 0,047 |
| 65 | 0,032 | 0,032 | 0,75 | 0,016 |

Tabela 14 - Resultados do teste de suscetibilidade (em CIM) das cepas clínicas de *C. neoformas*.

| N° amostra | ITZ | AMB | FCZ | (conclusão) |
|------------|-------|-------|------|-------------|
| | | | | VCZ |
| 66 | 0,094 | 0,023 | 8,0 | 0,032 |
| 67 | 0,125 | 0,016 | 16,0 | 0,064 |
| 68 | 0,25 | 0,125 | 8,0 | 0,047 |
| 69 | 0,125 | 0,19 | 8,0 | 0,064 |
| 70 | 0,50 | 0,094 | 16,0 | 0,032 |
| 71 | 0,064 | 0,064 | 12,0 | 0,008 |

Tabela 15 - Resultados do teste de suscetibilidade (em CIM) cepas clínicas e ambientais de *C. gattii*.

| N° amostra | ITZ | AMB | FCZ | VCZ |
|------------|-------|-------|------|-------|
| 28 | 0,38 | 0,38 | 48,0 | 0,064 |
| 40 | 0,094 | 0,38 | 4,0 | 0,012 |
| 62 | 0,75 | 0,25 | >256 | 0,125 |
| 48 | 0,125 | 0,008 | 12,0 | 0,064 |

ANEXO D - Detecção de fatores de virulênciaTabela 16 - Medida semi-quantitativa da produção da enzima fosfolipase de *Cryptococcus* spp. de origem ambiental.

(continua)

| Nº amostra | 1ºLeitura | 2º Leitura | 3ºLeitura | Pz: dc/ dh (média) | Classificação |
|---------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------|---------------|
| 106 | dc= 0.9 cm dh= 2.4 cm | dc= 1.0 cm dh= 2.5 cm | dc= 0.9 cm dh= 1.5 cm | Pz= 0.43 cm | Alta |
| 243 | dc= 0.9 cm dh= 2.0 cm | dc= 0.7 cm dh= 2.9 cm | dc= 1.0 cm dh= 2.9 cm | Pz= 0.33 cm | Alta |
| 240 | dc= 1.0 cm dh= 2.0 cm | dc= 0.8 cm dh= 3.0 cm | dc= 1.0 cm dh= 2.9 cm | Pz= 0.35 cm | Alta |
| 254 | dc= 0.7 cm dh= 2.9 cm | dc= 0.7 cm dh= 1.1 cm | dc= 0.7 cm dh= 2.1 cm | Pz= 0.34 cm | Alta |
| 48 | dc= 1.1 cm dh= 2.5 cm | dc= 1.0 cm dh= 3.2 cm | dc= 1.0 cm dh= 3.0 cm | Pz= 0.35 cm | Alta |
| 101 | dc=1.1 cm dh= 2.5 cm | dc= 1.0 cm dh= 3.1 cm | dc= 1.2 cm dh= 3.3 cm | Pz= 0.37 cm | Alta |
| 250 | dc= 1.3 cm dh= 2.0 cm | dc= 1.2 cm dh= 1.5 cm | dc= 1.0 cm dh= 2.5 cm | Pz= 0.58 cm | Intermediária |
| SCM | dc= 1.0 cm | dc= 0.8 cm | dc= 0.8 cm | Pz= 0.42 cm | Alta |
| P2A1 | dh= 2.0 cm | dh= 2.4 cm | dh= 1.7 cm | | |
| P4 | dc= 0.9 cm | dc= 0.9 cm | dc= 0.9 cm | Pz= 0.40 cm | Alta |
| A3A2 | dh= 1.6 cm | dh= 2.4 cm | dh= 2.7 cm | | |
| MT | dc= 1.0 cm | dc= 0.8 cm | dc= 0.7 cm | Pz= 0.35 cm | Alta |
| P3A2 | dh= 2.6 cm | dh= 2.1 cm | dh= 2.3 cm | | |
| A2 | dc= 0.9 cm | dc= 1.0 cm | dc= 0.9 cm | Pz= 0.41 cm | Alta |
| P1A2 | dh= 2.2 cm | dh= 2.5 cm | dh= 2.0 cm | | |
| Meio Ambiente | dc= 0.9 cm dh= 2.1 cm | dc= 1.0 cm dh= 2.5 cm | dc= 1.0 cm dh= 2.7 cm | Pz= 0.39 cm | Alta |
| EPC | dc= 0.9 cm | dc= 0.9 cm | dc= 1.0 cm | Pz= 0.33 cm | Alta |
| P1A1 | dh= 2.8 cm | dh= 2.5 cm | dh= 3.0 cm | | |
| CF | dc= 1.0 cm | dc= 0.5 cm | dc= 1.0 cm | Pz= 0.33 cm | Alta |
| P2 | dh= 2.9 cm | dh= 1.4 cm | dh= 3.1 cm | | |
| EPC | dc= 0.9 cm | dc= 0.9 cm | dc= 0.9 cm | Pz= 0.41 cm | Alta |
| P1A2 | dh= 1.4 cm | dh= 3.0 cm | dh= 2.1 cm | | |
| SCM | dc= 1.0 cm | dc= 0.9 cm | dc= 1.0 cm | Pz= 0.38 cm | Alta |
| P2A2 | dh= 2.1 cm | dh= 2.6 cm | dh= 2.8 cm | | |

dc_ diâmetro da colônia; dh_ diâmetro do halo; Pz_ dc/dh.

Tabela 17 - Medida semi-quantitativa da produção da enzima fosfolipase de *Cryptococcus* spp. de origem clínica.

(continua)

| Nº amostra | 1ºLeitura | 2º Leitura | 3ºLeitura | Pz:dc/ dh (média) | Classificação |
|------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------|---------------|
| 1 | dc= 1.1 cm dh= 1.8 cm | dc= 0.6 cm dh= 1.6 cm | dc= 0.9 cm dh= 1.8 cm | Pz= 0.50 cm | Alta |
| 2 | dc= 0.8 cm dh= 2.0 cm | dc= 1.2 cm dh= 4.2 cm | dc= 0.8 cm dh= 2.0 cm | Pz= 0.34 cm | Alta |
| 3 | dc= 0.9 cm dh= 2.2 cm | dc= 1.0 cm dh= 2.0 cm | dc= 0.9 cm dh= 3.2 cm | Pz= 0.37 cm | Alta |
| 4 | dc= 0.7 cm dh= 2.5 cm | dc= 0.7 cm dh= 1.2 cm | dc= 1.0 cm dh= 3.0 cm | Pz= 0.35 cm | Alta |
| 5 | dc= 0.8 cm dh= 1.7 cm | dc= 0.7 cm dh= 1.7 cm | dc= 1.0 cm dh= 3.0 cm | Pz= 0.39 cm | Alta |
| 6 | dc= 0.9 cm dh= 2.6 cm | dc= 1.0 cm dh= 2.4 cm | dc= 0.9 cm dh= 3.6 cm | Pz= 0.32 cm | Alta |
| 7 | dc=1.0 cm dh= 1.9 cm | dc= 0.9 cm dh= 1.2 cm | dc= 0.9 cm dh= 2.3 cm | Pz= 0.52 cm | Intermediária |
| 8 | dc= 0.7 cm dh= 3.0 cm | dc= 0.6 cm dh= 1.6 cm | dc= 0.7 cm dh= 1.7 cm | Pz= 0.31 cm | Alta |
| 10 | dc= 0.8 cm dh= 0 cm | dc= 0.8 cm dh= 0 cm | dc= 0.7 cm dh= 0 cm | Pz= 0 | Nula |
| 11 | dc= 0 cm dh= 0 cm | dc= 0.7 cm dh= 1.5 cm | dc= 0.6 cm dh= 1.8 cm | Pz= 0.39 cm | Alta |
| 13 | dc= 1.0 cm dh= 2.0 cm | dc= 1.0 cm dh= 1.2 cm | dc= 0.8 cm dh= 3.3 cm | Pz= 0.43 cm | Alta |
| 14 | dc= 1.0 cm dh= 2.0 cm | dc= 1.0 cm dh= 2.3 cm | dc= 1.1 cm dh= 3.9 cm | Pz= 0.38 cm | Alta |
| 15 | dc= 1.3 cm dh= 2.0 cm | dc= 1.0 cm dh= 2.0 cm | dc= 1.0 cm dh= 3.6 cm | Pz= 0.43 cm | Alta |
| 16 | dc= 1.3 cm dh= 2.0 cm | dc= 1.2 cm dh=1.5 cm | dc= 1.0 cm dh= 2.5 cm | Pz= 0.58 cm | Intermediária |
| 17 | dc= 1.3 cm dh= 1.9 cm | dc= 1.0 cm dh= 1.7 cm | dc= 0.9 cm dh= 2.3 cm | Pz= 0.54 cm | Intermediária |
| 18 | dc= 1.0 cm dh= 2.6 cm | dc= 1.0 cm dh= 2.4 cm | dc= 0.8 cm dh= 2.7 cm | Pz= 0.36 cm | Alta |
| 19 | dc= 1.0 cm dh= 2.5 cm | dc= 1.0 cm dh= 1.9 cm | dc= 0.6 cm dh= 2.2 cm | Pz= 0.39 cm | Alta |
| 20 | dc= 1.0 cm dh= 2.4 cm | dc= 1.2 cm dh= 2.9 cm | dc= 0.9 cm dh= 3.2 cm | Pz= 0.36 cm | Alta |
| 21 | dc=1.0 cm dh= 2.0 cm | dc= 1.0 cm dh= 1.3 cm | dc= 0.7 cm dh= 2.1 cm | Pz= 0,50 cm | Alta |
| 24 | dc= 1.1 cm dh= 1.9 cm | dc= 1.0 cm dh= 2.1 cm | dc= 0.7 cm dh= 2.6 cm | Pz= 0.42 cm | Alta |
| 28 | dc= 1.0 cm dh= 2.2 cm | dc= 1.0 cm dh= 2.6 cm | dc= 0.9 cm dh= 2.9 cm | Pz= 0.38 cm | Alta |
| 30 | dc= 1.0 cm dh= 2.3 cm | dc= 1.0 cm dh= 1.5 cm | dc= 0.9 cm dh= 2.6 cm | Pz= 0.45 cm | Alta |

Tabela 17 - Medida semi-quantitativa da produção da enzima fosfolipase de *Cryptococcus* spp. de origem clínica.

| (continuação) | | | | | |
|---------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------|---------------|
| Nº amostra | 1ºLeitura | 2º Leitura | 3ºLeitura | Pz:dc/ dh (média) | Classificação |
| 31 | dc= 1.0 cm dh= 2.2 cm | dc= 1.0 cm dh= 2.2 cm | dc= 1.0 cm dh= 3.3 cm | Pz= 0.39 cm | Alta |
| 33 | dc= 0.8 cm dh= 1.9 cm | dc= 0.8 cm dh= 2.6 cm | dc= 0.8 cm dh= 1.9 cm | Pz= 0.37 cm | Alta |
| 35 | dc= 0.8 cm dh= 1.5 cm | dc= 0.6 cm dh= 1.5 cm | dc= 0.9 cm dh= 3.0 cm | Pz= 0.38 cm | Alta |
| 36 | dc= 0.7 cm dh= 1.7 cm | dc= 0.7 cm dh= 1.4 cm | dc= 0.8 cm dh= 2.7 cm | Pz= 0.37 cm | Alta |
| 38 | dc= 0.7 cm dh= 1.8 cm | dc= 0.8 cm dh= 1.8 cm | dc= 1.0 cm dh= 2.9 cm | Pz= 0.38 cm | Alta |
| 40 | dc= 0.9 cm dh= 2.5 cm | dc= 0.9 cm dh= 2.5 cm | dc= 0.5 cm dh= 1.3 cm | Pz= 0.36 cm | Alta |
| 41 | dc= 0.8 cm dh= 1.5 cm | dc= 1.0 cm dh= 3.0 cm | dc= 0.6 cm dh= 1.6 cm | Pz= 0.38 cm | Alta |
| 45 | dc= 0.5 cm dh= 1.4 cm | dc= 0.6 cm dh= 1.1 cm | dc= 0.8 cm dh= 2.1 cm | Pz= 0.39 cm | Alta |
| 49 | dc= 0.7 cm dh= 1.2 cm | dc= 0.7 cm dh= 1.5 cm | dc= 0.9 cm dh= 2.4 cm | Pz= 0.45 cm | Alta |
| 50 | dc= 0.8 cm dh= 1.9 cm | dc= 0.8 cm dh= 1.6 cm | dc= 1.0 cm dh= 3.1 cm | Pz= 0.39 cm | Alta |
| 51 | dc= 0.8 cm dh= 0 cm | dc= 0.8 cm dh= 2.5 cm | dc= 0.7 cm dh= 2.1 cm | Pz= 0.50 cm | Alta |
| 52 | dc= 0.8 cm dh= 0 cm | dc= 0.9 cm dh= 2.9 cm | dc= 0.8 cm dh= 2.0 cm | Pz= 0.51 cm | Intermediária |
| 53 | dc= 0,6 cm dh= 1,4 cm | dc= 0,6 cm dh= 1,6 cm | dc= 0,8 cm dh= 2,2 cm | Pz= 0,38 cm | Alta |
| 54 | dc=0,8 cm dh= 2,6 cm | dc= 0,9 cm dh= 3,0 cm | dc= 0,9 cm dh= 2,5 cm | Pz= 0,32 cm | Alta |
| 56 | dc= 0,9 cm dh= 1,2 cm | dc= 0,7 cm dh= 1,5 cm | dc= 0,7 cm dh= 1,4 cm | Pz= 0,56 cm | Intermediária |
| 57 | dc= 0,6 cm dh= 1,4 cm | dc= 0,5 cm dh= 1,5 cm | dc= 0,8 cm dh= 1,5 cm | Pz= 0,43 cm | Alta |
| 58 | dc= 0,7 cm dh= 2,0 cm | dc= 0,9 cm dh= 2,5 cm | dc= 0,9 cm dh= 2,6 cm | Pz= 0,35 cm | Alta |
| 59 | dc= 0,8 cm dh= 1,4 cm | dc= 0,7 cm dh= 1,1 cm | dc= 0,8 cm dh= 1,1 cm | Pz= 0,63 cm | Intermediária |
| 60 | dc= 0,8 cm dh= 2,0 cm | dc= 1,2 cm dh= 2,4 cm | dc= 1,0 cm dh= 2,5 cm | Pz= 0,43 cm | Alta |
| 62 | dc= 0,6 cm dh= 0 cm | dc= 0,7 cm dh= 0 cm | dc= 0,6 cm dh= 0 cm | Pz= 0 cm | Nula |
| 63 | dc= 1.0 cm dh= 2.7 cm | dc= 1.1 cm dh= 3.0 cm | dc= 1.0 cm dh= 3.1 cm | Pz=0.35 cm | Alta |
| 64 | dc= 0.8 cm dh= 3.1 cm | dc= 0.7 cm dh= 1.9 cm | dc= 0.8 cm dh= 2.1 cm | Pz= 0.32 cm | Alta |

Tabela 17 - Medida semi-quantitativa da produção da enzima fosfolipase de *Cryptococcus* spp. de origem clínica.

(conclusão)

| Nº amostra | 1ºLeitura | 2º Leitura | 3ºLeitura | Pz:dc/ dh (média) | Classificação |
|------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|-------------------|---------------|
| 65 | dc= 1.0 cm dh= 2.0 cm | dc= 1.0 cm dh= 1.8 cm | dc= 1.0 cm dh= 3.0 cm | Pz= 0.44 cm | Alta |
| 66 | dc= 0.9 cm dh= 1.9 cm | dc= 1.1 cm dh= 1.9 cm | dc= 0.9 cm dh= 3.1 cm | Pz= 0.42 cm | Alta |
| 67 | dc= 1,0 cm dh= 2,4 cm | dc= 0, 8 cm dh= 2,7 cm | dc= 1,1 cm dh= 3,5 cm | Pz= 0,33 cm | Alta |
| 68 | dc= 0.7 cm dh= 2.3 cm | dc= 0.6 cm dh= 1.6 cm | dc= 0.7 cm dh= 1.7 cm | Pz= 0.35 cm | Alta |
| 69 | dc= 0.6 cm dh= 1.4 cm | dc= 0.8 cm dh= 2.8 cm | dc= 0.8 cm dh= - cm | Pz= 0.52 cm | Intermediária |
| 70 | dc= 0.7 cm dh= 2.3 cm | dc= 0.6 cm dh= 1.6 cm | dc= 0.7 cm dh= 1.7 cm | Pz= 0.35 cm | Alta |
| 71 | dc= 1.0 cm dh= 2.0 cm | dc= 1.8 cm dh= 1.7 cm | dc= 0.9 cm dh= 3.1 cm | Pz= 0.54 cm | Intermediária |

dc_diâmetro da colônia; dh_diâmetro do halo; Pz_ dc/dh

Tabela 18 – Avaliação da atividade da fenoloxidase de *Cryptococcus* spp. de origem clínica.

(continua)

| Amostra | UE/100mg | Classificação |
|---------|----------|---------------|
| 1 | 3,724 | Intermediária |
| 2 | 2,724 | Baixa |
| 3 | 1,416 | Baixa |
| 4 | 1,720 | Baixa |
| 5 | 744,0 | Baixa |
| 6 | 368,0 | Baixa |
| 7 | 428,0 | Baixa |
| 8 | 612,0 | Baixa |
| 10 | 4,128 | Alta |
| 11 | 3,768 | Intermediária |
| 13 | 2,512 | Baixa |
| 14 | 3,880 | Alta |
| 15 | 376,0 | Baixa |
| 16 | 3,068 | Intermediária |
| 17 | 2,532 | Baixa |
| 18 | 3,128 | Intermediária |
| 19 | 4,172 | Alta |
| 20 | 3,428 | Intermediária |
| 21 | 792,0 | Baixa |
| 24 | 732,0 | Baixa |
| 28 | 912,0 | Baixa |

Tabela 18 – Avaliação da atividade da fenoloxidase de *Cryptococcus* spp. de origem clínica.

| Amostra | UE/100mg | (conclusão) Classificação |
|---------|----------|------------------------------|
| 30 | 1,644 | Baixa |
| 31 | 2,628 | Baixa |
| 33 | 112,0 | Baixa |
| 35 | 332,0 | Baixa |
| 36 | 2,512 | Baixa |
| 38 | 556,0 | Baixa |
| 40 | 680,0 | Baixa |
| 41 | 1,280 | Baixa |
| 45 | 1,684 | Baixa |
| 49 | 3,908 | Alta |
| 50 | 2,848 | Intermediária |
| 51 | 664,0 | Baixa |
| 52 | 732,0 | Baixa |
| 53 | 3,556 | Intermediária |
| 54 | 1,204 | Baixa |
| 56 | 3,296 | Intermediária |
| 57 | 592,0 | Baixa |
| 58 | 2,112 | Baixa |
| 59 | 1,204 | Baixa |
| 60 | 3,304 | Intermediária |
| 62 | 1,776 | Baixa |
| 63 | 3,032 | Intermediária |
| 64 | 3,868 | Alta |
| 65 | 1,512 | Baixa |
| 66 | 3,872 | Alta |
| 67 | 4,376 | Alta |
| 68 | 176,0 | Baixa |
| 69 | 2,848 | Intermediária |
| 70 | 416,0 | Baixa |
| 71 | 2,296 | Baixa |

UE_ Unidades de enzima.

Tabela 19 – Avaliação da atividade da fenoloxidase de *Cryptococcus* spp. de origem ambiental.

| Amostra | UE/100mg | Classificação |
|---------|----------|---------------|
| 106 | 1,340 | Baixa |
| 243 | 2,184 | Baixa |
| 240 | 1,368 | Baixa |
| 254 | 544,0 | Baixa |
| 48 | 648,0 | Baixa |
| 101 | 652,0 | Baixa |
| 250 | 824,0 | Baixa |
| SCMP2A1 | 848,0 | Baixa |
| P4A3A2 | 3,644 | Intermediária |
| MTP3A2 | 924,0 | Baixa |
| A2P1A2 | 1,038 | Baixa |
| M.AMB. | 1,668 | Baixa |
| EPCP1A1 | 384,0 | Baixa |
| EPCP1A2 | 484,0 | Baixa |
| SCMP2A2 | 3,268 | Intermediária |
| CFP2 | 2,568 | Baixa |

UE_ Unidades de enzima.

ANEXO E - Relação entre fatores de virulência e evolução clínica da criptococose

Tabela 20 - Relação entre as características apresentadas pelos isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. e a evolução da criptococose.

(continua)

| Amostra | Espécie | Fosfolipase | Fenoloxidase | Doença de Base | Formas clínica | Óbito |
|---------|---------------------|---------------|---------------|----------------|-----------------------------|-------|
| 1 | <i>C. neformans</i> | Alta | Intermediária | HIV+ | Meningoencefalite | Sim |
| 2 | <i>C. neformans</i> | Alta | Baixa | HIV- | Meningoencefalite | Não |
| 3 | <i>C. neformans</i> | Alta | Baixa | HIV+ | Meningoencefalite | Não |
| 4 | <i>C. neformans</i> | Alta | Baixa | HIV+ | Meningoencefalite | Não |
| 5 | <i>C. neformans</i> | Alta | Baixa | HIV- | Meningoencefalite | Não |
| 6 | <i>C. neformans</i> | Alta | Baixa | HIV+ | Meningoencefalite | Não |
| 7 | <i>C. neformans</i> | Intermediária | Baixa | HIV+ | Fungemia | Não |
| 8 | <i>C. neformans</i> | Alta | Baixa | HVI+ | Lesão cutânea + Fungemia | Sim |
| 10 | <i>C. neformans</i> | Nula | Alta | HVI+ | Meningoencefalite | Não |
| 11 | <i>C. neformans</i> | Alta | Intermediária | HIV- | Fungemia | Sim |
| 13 | <i>C. neformans</i> | Alta | Baixa | HVI+ | Meningoencefalite | Não |
| 14 | <i>C. neformans</i> | Alta | Alta | HVI+ | Fungemia | Não |
| 15 | <i>C. neformans</i> | Alta | Baixa | Não informada | Meningoencefalite | Não |
| 16 | <i>C. neformans</i> | Intermediária | Intermediária | HIV+ | Fungemia | Sim |
| 17 | <i>C. neformans</i> | Intermediária | Baixa | HVI+ | Meningoencefalite | Sim |
| 18 | <i>C. neformans</i> | Alta | Intermediária | HVI+ | Meningoencefalite | Sim |
| 19 | <i>C. neformans</i> | Alta | Alta | HVI+ | Meningoencefalite | Sim |
| 20 | <i>C. neformans</i> | Alta | Intermediária | HVI+ | Meningoencefalite | Sim |
| 21 | <i>C. neformans</i> | Alta | Baixa | HVI+ | Meningoencefalite | Sim |
| 24 | <i>C. neformans</i> | Alta | Baixa | HVI+ | Meningoencefalite | Não |
| 28 | <i>C. gattii</i> | Alta | Baixa | HIV - | Meningoencefalite | Sim |
| 30 | <i>C. neformans</i> | Alta | Baixa | HVI+ | Fungemia | Não |
| 31 | <i>C. neformans</i> | Alta | Baixa | HVI+ | Meningoencefalite | Sim |
| 33 | <i>C. neformans</i> | Alta | Baixa | HVI+ | Meningoencefalite | Sim |
| 36 | <i>C. neformans</i> | Alta | Baixa | HVI+ | Fungemia | Sim |
| 38 | <i>C. neformans</i> | Alta | Baixa | HIV - | Meningoencefalite | Não |
| 40 | <i>C. neformans</i> | Alta | Baixa | HIV + | Meningoencefalite | Sim |
| 41 | <i>C. gattii</i> | Alta | Baixa | Não informada | Meningoencefalite | Não |
| 45 | <i>C. neformans</i> | Alta | Baixa | HIV + | Meningoencefalite | Não |
| 49 | <i>C. neformans</i> | Alta | Baixa | HVI+ | Fungemia | Sim |
| 50 | <i>C. neformans</i> | Alta | Alta | HIV+ | Meningoencefalite | Sim |
| 51 | <i>C. neformans</i> | Alta | Intermediária | HVI+ | Fungemia | Sim |
| 52 | <i>C. neformans</i> | Alta | Baixa | HIV+ | Fungemia | Não |
| 53 | <i>C. neformans</i> | Intermediária | Baixa | HIV+ | Meningoencefalite | Não |
| 54 | <i>C. neformans</i> | Alta | Intermediária | HIV - | Meningoencefalite | Não |
| 56 | <i>C. neformans</i> | Alta | Baixa | HIV- | Meningoencefalite | Não |
| 57 | <i>C. neformans</i> | Intermediária | Intermediária | HIV+ | Meningoencefalite | Sim |
| 58 | <i>C. neformans</i> | Alta | Baixa | HIV- | Meningoencefalite | Sim |
| 59 | <i>C. neformans</i> | Alta | Baixa | HIV+ | Meningoencefalite | Não |
| 60 | <i>C. neformans</i> | Intermediária | Baixa | HIV+ | Meningoencefalite | Não |

Tabela 20 - Relação entre as características apresentadas pelos isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. e a evolução da criptococose.

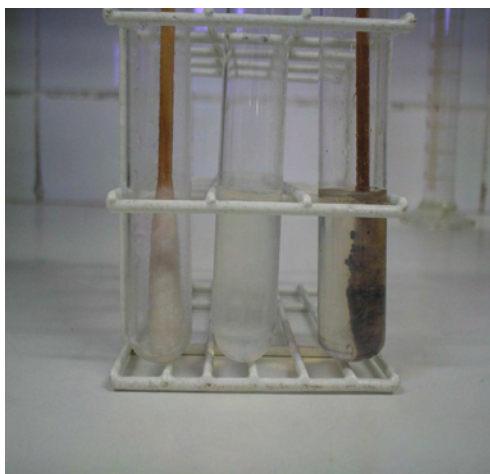
| | | | | | | | (conclusão) |
|---------|----------------------|---------------|---------------|----------------|-------------------|-------|-------------|
| Amostra | Espécie | Fosfolipase | Fenoxidase | Doença de Base | Formas clínica | Óbito | |
| 64 | <i>C. neformans</i> | Alta | Intermediária | HIV+ | Meningoencefalite | Não | |
| 62 | <i>C. gattii</i> | Nula | Baixa | HIV- | Lesão cutânea | Não | |
| 64 | <i>C. neformans</i> | Alta | Alta | HIV+ | Fungemia | Não | |
| 65 | <i>C. neformans</i> | Alta | Baixa | HIV- | Não informada | Não | |
| 66 | <i>C. neformans</i> | Alta | Alta | HIV+ | Meningoencefalite | Não | |
| 67 | <i>C. neformans</i> | Alta | Alta | HIV+ | Não informada | Não | |
| 68 | <i>C. neformans</i> | Alta | Baixa | HIV+ | Meningoencefalite | Não | |
| 63 | <i>C. neformans</i> | Alta | Intermediária | HIV+ | Não informada | NI | |
| 69 | <i>C. neoformans</i> | Intermediária | Intermediária | HIV+ | Meningoencefalite | Não | |
| 70 | <i>C. neoformans</i> | Alta | Baixa | HIV+ | Fungemia | Não | |
| 71 | <i>C. neformans</i> | Intermediária | Baixa | HIV + | Fungemia | Não | |

Tabela 21 – Relação entre óbitos ocorridos de acordo com as formas clínicas e os níveis de produção da fosfolipase e atividade fenoxidase.

| Amostra | Formas clínicas | Fosfolipase | Fenoxidase |
|---------|-----------------|-------------------|---------------|
| 35 | Fungemia | Alta | Baixa |
| 45 | | Alta | Baixa |
| 8 | | Alta | Baixa |
| 11 | | Alta | Intermediária |
| 50 | | Alta | Intermediária |
| 17 | | Intermediária | Intermediária |
| 49 | | Meningoencefalite | Alta |
| 19 | Alta | | Alta |
| 57 | Alta | | Baixa |
| 38 | Alta | | Baixa |
| 28 | Alta | | Baixa |
| 33 | Alta | | Baixa |
| 24 | Alta | | Baixa |
| 31 | Alta | | Baixa |
| 5 | Alta | | Intermediária |
| 20 | Alta | | Intermediária |
| 18 | Alta | | Intermediária |
| 40 | Intermediária | | Intermediária |
| 17 | Intermediária | | Baixa |

ANEXO F – Fotografias

Fotografia 01 - Processamento das amostras ambientais coletas com colheres e/ou espátulas.



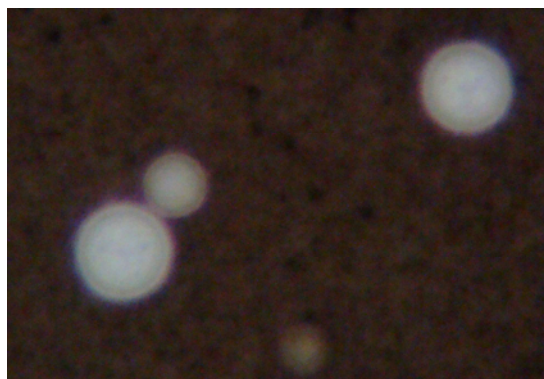
Fotografia 02 - Coletas das amostras ambientais com swabs.



Fotografia 03 – Colônias de *Cryptococcus* spp. em agar Níger.



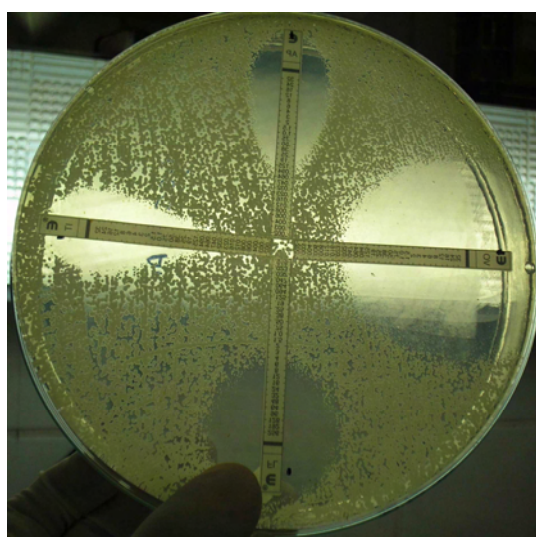
Fotografia 04 - Colônias de *Cryptococcus* spp. em agar Sabourad dextrose.



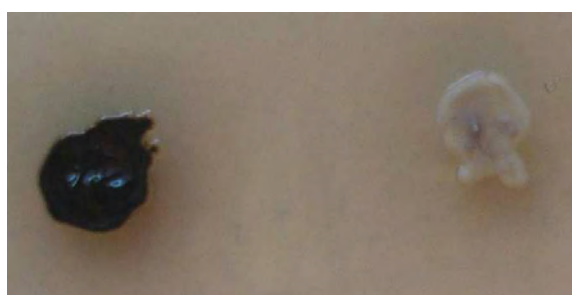
Fotografia 05 – Visualização de *Cryptococcus* spp. ao microscópio ótico com tinta nankin.



Fotografia 06 - *Cryptococcus* spp. cultivado em meio CGB.



Fotografia 07 – Teste de suscetibilidade de um isolado de *C. neoformans*.



Fotografia 8 – Produção de pigmento escuro por um isolado de *C. neoformans* e não produção por um isolado de *C. albicans*, em agar DOPA.

ANEXO G - Meios de cultura

a) Meio agar Níger ou Girassol

| | |
|---|----------------|
| Clorafenicol ¹ | 1,0 % |
| Agar bacteriológico | 20 gramas |
| Creatinina | 0,800 gramas |
| Extrato de Níger ou girassol ² | 200 mililitros |
| Glicose | 10 gramas |
| Água destilada..... | 800 mililitros |

¹clorafenicol

Dissolver 0,5 gramas em 10 mL de etanol P.A. e adicionar 1 mL para cada 100 mL de meio

² Extrato de Níger ou Girassol

Setenta gramas de semente de Níger ou Girassol foram adicionadas a quantidade suficiente de água para homogeneizar em liquidificador. Após a homogeneização a mistura foi filtrada e acrescentada de água até atingir 350 mL. Destes, foram retirados 200 mL para cada 1000 mL de meio.

b) Meio Dihidroxifenilalanina (DOPA)

| | |
|--|----------------|
| L-asparagina | 1,0 grama |
| Glicose | 1,0 grama |
| Fosfato de potássio (K ₂ HPO ₄) | 3,0 gramas |
| MgSO ₄ . 7 H ₂ O | 0,25 gramas |
| Tiamina | 1,0 miligramas |
| DOPA | 0,10 gramas |

Agar bacteriológico (Difco) 20 gramas

Água destilada 1 000 mililitros

Esterilizar em autoclave por 15 minutos a 120° C a 900 mL de água destilada juntamente com o agar bacteriológico desidratado. Estando este meio morno adicionar os demais componentes, sendo que estes devem anteriormente ser dissolvidos em 100 mililitros de água destilada, o pH corrigido para 5,6, e por último adicionado de tiamina e esterilizado por filtração. Após adição de todos os componentes do meio distribuir em placas de petri estéreis.

c) Meio de transporte de Stuart

Cloreto de sódio3,0 gramas

Cloreto de potássio0,20 gramas

Fosfato dissódico (Na_2HPO_4)1,15 gramas

Fosfato monopotássico (KH_2PO_4)0,20 gramas

Agar bacteriológico (Difco)5,0 gramas

Água destilada1000 mililitros

Dissolver todas as substâncias em água destilada, fundir o meio e distribuir em tubos de ensaio com tampa. Autoclavar a 120° C por 15 minutos. Deixar o meio solidificar em tubos. Não é necessário inclinar.

d) Meio para congelamento

Peptona 2,0 gramas

Glicerina 40,0 mililitros

Água destilada 200 mililitros

Dissolver a peptona em água destilada e adicionar a glicerina. Autoclavar por 15 minutos a 120 °C e reservar na geladeira.

e) Meio CGB (Canavanina, Glicina, Azul de Bromotimol)

Composição:

Solução A

Glicina..... 10 gramas
 Fosfato monopotássico (KH₂PO₄)1,0 grama
 Sulfato de magnésio (Mg SO₄)1,0 grama
 L-canavanina30 miligramas
 Água destilada1000 mililitros
 Acertar o pH para 5,6 e esterilizar por filtração. Distribuir em alíquotas de 100 mL e estocar a frio.

Solução B

Azul de bromotimol 0,4 gramas
 Solução de Hidróxido de sódio 0,01N* 64 mililitros
 Água destilada 36 mililitros
 Dissolver o azul de bromotimol na solução de NAOH, adicionar água destilada e acondicionar em frasco de cor âmbar e manter sob refrigeração.

*Solução de Hidróxido de sódio 0,01N

Hidróxido de Sódio (NaOH) 0,04 gramas
 Água destilada 100 mililitros
 Meio base
 Solução B 20 mililitros
 Ágar bacteriológico (Difco) 20 gramas

Água destilada 880 mililitros

Autoclavar a 120° C por 15 minutos

Momento de uso

Adicionar 100 mililitros da solução A ao meio base. Distribuir em tubos com tampa e deixar solidificar inclinados.

f) Agar Sabouraud-dextrose

Ágar Sabouraud dextrose Agar (Difco).....65,0 gramas

Água destilada1000 mililitros

Dissolver o meio de cultura Sabouraud desidratado em água destilada e aquecer a solução até completa dissolução do agar. Após homogeneização, esterilizar em autoclave a 120° C por 15 minutos e distribuir em placas de Petri 90 X 15 mm ou em tubos de ensaio.

g) Agar uréia de Christensen (Difco)

Peptona1,0 grama

Glicose.....1,0 grama

NaCl..... 5,0 gramas

Fosfato monopotássico..... 2,0 gramas

Vermelho de fenol..... 0,012 gramas

Agar bacteriológico (Difco)..... 15 gramas

Água destilada.....950 mililitros

Adicionar 1,0 g do meio desidratado da Difco em 950 mL de água destilada.

Aquecer até dissolver completamente. Esterilizar em autoclave a 120° C por

15 minutos. Preparar uma solução de uréia a 40%. Juntar 50 mL da solução ao meio esfriado a 55° C. Distribuir em tubos (10 mL em cada tubo) e inclinar

h) Meio para assimilação de Carboidratos (YNB –Difco)

Meio Base

Agar bacteriológico (Difco)..... 20 gramas

Água destilada1000 mililitros

Dissolver o agar em água destilada. Autoclavar, por 15 minutos, a 120 °C.

Distribuir alíquotas de 40 mL

Solução-estoque de *Yeast Nitrogen Base* (YNB – Difco)

Yeast Nitrogen Base 6,7 gramas

Água destilada q. s. p.100 mililitros

Dissolver o *Yeast Nitrogen Base* em 100 mL de água destilada e deionizada e esterilizar por filtração. Estocar em frasco de cor âmbar na geladeira.

Preparo Final do Meio

Fazer uma diluição 1:10 da solução-estoque em meio base. Atenção: só acrescentar a solução de *Yeast Nitrogen Base* quando o meio basal estiver com a temperatura aproximada de 48° C.

i) Meio para assimilação de Nitrato (YCB – Difco)

Meio Base

Agar bacteriológico (Difco).....20 gramas

Água destilada q.s.p.1000 mililitros

Dissolver o agar em água destilada. Autoclavar, por 15 minutos, a 120° C.

Solução-estoque de *Yeast Carbon Base* (YCB - Difco)

Yeast Carbon Base 11,7 gramas

Água destilada 100 mililitros

Dissolver o *Yeast Carbon Base* em água destilada e esterilizar por filtração

Preparo Final do Meio

Fazer uma diluição 1:10 da solução-estoque em meio base. Atenção: só acrescentar a solução de *Yeast Carbon Base* quando o meio basal estiver com a temperatura aproximada de 48° C.

j) Meio agar RPMI 1640 com L-glutamina e sem bicarbonato (Gibco BRL)

Meio RPMI

Dissolver o meio já pronto em água destilada. Ajustar o pH para 7,0 com (ácido 2-[N-morfolino] – propanosulfônico) MOPS e esterilizar por filtração. Acondicionar em refrigeração.

Meio Base

Agar-agar (Difco) 10 gramas

Água destilada 375 mililitros

Dissolver todas as substâncias em água destilada. Autoclavar, por 15 minutos, a 121° C.

Momento de uso

Fundir o meio base e resfriá-lo até cerca de 55°C. Adicionar 125 mL de RPMI. Homogeneizar bem e distribuir em placas de Petri 90 X 15 mm, estéreis.

k) Meio para detecção de fosfolipase

Meio base

| | |
|----------------------------------|----------------|
| Peptona | 1,0 grama |
| Glicose | 2,0 gramas |
| Cloreto de sódio | 5,7 gramas |
| Cloreto de cálcio | 0,05 gramas |
| Agar bacteriológico (Difco)..... | 1,5 gramas |
| Água destilada | 100 mililitros |

Dissolver todas as substâncias em água destilada. Autoclavar, por 15 minutos, a 121° C.

Emulsão de gema de ovo:

Homogeneizar uma gema de ovo em erlenmeyer contendo pérolas de vidro e solução salina (0,85% em água destilada) estéreis. Antes do preparo da emulsão, o ovo deve ser deixado imerso em álcool iodado por cerca de 20 minutos. Depois, romper cuidadosamente a casca e separe a gema da clara.

Momento de uso:

Fundir o meio base e resfriá-lo até cerca de 55°C. Adicionar cerca de 10 mL de emulsão de ovo. Homogeneizar bem e distribuir em placas de Petri 90 X 15 mm estéreis.

l) Tampão fosfato de sódio (Na_2HPO_4) 1M, pH 7,0

| | |
|-----------------------------------|-----------------|
| Na_2HPO_4 | 142,07 gramas |
| Água destilada | 1000 mililitros |

Dissolver o Na_2HPO_4 em água destilada com auxílio do agitador magnético. Acertar o pH para 7,0 com ácido clorídrico concentrado. Autoclavar por 15 minutos a 120°C . Reservar a temperatura ambiente.

m) Dihidroxifenilalanina (DOPA) 10 mM

DOPA..... 1,9 gramas

Água destilada 10,0 mililitros

Dissolver o DOPA em água destilada estéril, homogeneizar em vórtex.

Reservar na geladeira em frasco estéril. Desta solução eram utilizadas 0,1 mL.

n) Solução de tolueno-etanol (1v:4v)

Tolueno 1,0 mililitros

Etanol P.A. 4,0 mililitros

Misturar o tolueno ao etanol, homogeneizar em vórtex. Reservar na geladeira em frasco estéril.

o) Solução de Yeast Nitrogen Base (YNB – DIFCO) 10x

Yeast Nitrogen Base 6,7 gramas

Água destilada 100 mililitros

Dissolver o *Yeast Nitrogen Base* em 100 mL de água destilada e deionizada e esterilizar por filtração. Estocar em frasco de cor âmbar na geladeira. Desta solução eram utilizadas somente 5,0 mL.

ANEXO H - Tampões e soluções usados em Biologia Molecular

a) Solução de Tris-HCl 1M

Tris-HCl (sigma T- 6066) 121,1 gramas

Água miliQ 1 000 mililitros

Dissolver inicialmente em 800 mL de água miliQ e ajustar o pH que deve ser de 7,6 (utilizar HCl 1M), depois completar com auxílio de proveta para 1000 mL. Autoclavar a 120°C por 15 minutos. Reservar a temperatura ambiente.

b) Solução de SDS (extenso) 10%

SDS (sigma L-4390)..... 100 gramas

Água miliQ 1 000 mililitros

Dissolver SDS em 900 mL de água miliQ, homogeneizar. Completar com auxílio de proveta o volume até 1 000 mL. Manter em temperatura ambiente e em frasco estéril.

c) Solução de Cloreto de Sódio (NaCl) 5 M

NaCl 29,22 gramas

Água miliQ 100 mililitros

Dissolver NaCl em 80 mL de água miliQ, homogeneizar. Completar com auxílio de proveta para o volume para 100 mL. Autoclavar a 120°C por 15 minutos. Manter em temperatura ambiente em frasco estéril (este deve ser armazenado por no máximo 6 meses).

d) Solução de EDTA 0,5 M pH: 8,0

EDTA . 2 H₂O (Sigma)..... 186,1 gramas

Água miliQ 1 000 mililitros

Dissolver inicialmente em 600 mL de água miliQ, homogeneizar. Ajustar o pH para 8,0. Completar com auxílio de proveta o volume para 1000 mL. Autoclavar a 120°C por 15 minutos. Reservar a temperatura ambiente em frasco estéril.

e) Tampão de lise

Tris-HCl 1M..... 20 mililitros

Cloreto de Sódio 5 M 25 mililitros

EDTA 0,5 M pH: 8,0..... 10 mililitros

SDS 10%..... 10 mililitros

Água miliQ 100 mililitros

Adicionar na proveta cada uma das soluções e completar com água miliQ até atingir 100 ml. Manter em temperatura ambiente em frasco estéril.

f) Tampão TRIS – ÁCIDO BÓRICO – EDTA (TBE) 10x

Tris-base 1M..... 24,2 gramas

Ácido bórico 1 M..... 12,37 gramas

EDTA 5M..... 800 microlitros

Adicionar na proveta as soluções e completar com água destilada até atingir 1 000 ml. Ajustar o pH que deve ser de 8,0. Autoclavar a 120°C por 15 minutos e reservar na geladeira.

g) Tampão TRIS – ÁCIDO BÓRICO – EDTA (TBE) 0,5x

Diluir 20X o tampão acima em Água miliQ estéril

h) Tampão TRI-EDTA (TE)

Tris-base 1M..... 500 microlitros

EDTA 5M..... 10 microlitros

Água miliQ 50 mililitros

Adicionar na proveta as substâncias e completar com água destilada até atingir 50 ml. Reservar a temperatura ambiente.

i) Etanol 70%

Etanol P.A. 70 mililitros

Água destilada 30 mililitros

Misturar o álcool com a água destilada e reservar na geladeira.

j) Gel de Agarose (1,4%) para eletroforese

Agarose..... 1,4 gramas

Tampão TBE 0,5x..... 100 mililitros

Dissolver a agarose no tampão TBE 0,5X. Aquecer no forno microondas até atingir fervura e despejar na forma, já montada com pente para formação dos poços onde será depositado o produto da PCR. Aguardar solidificar.

ANEXO I – Protocolo de pesquisa: Cryptococcose

Número do prontuário: _____ Nº isolado no lab: _____

Nome do paciente: _____

Endereço e telefone do paciente: _____

Isolados de *Cryptococcus* desse paciente:

data ___/___/_____ No. isolado no lab. do hospital

Notas relevantes

_____**1) INFORMAÇÃO DEMOGRÁFICA**

1.1 Data do Nascimento: ___/___/_____ (DD/MM/YYYY)

1.2 Sexo: Masculino Feminino1.3 Raça: Branco Negro Mulato/ Pardo Asiático Índio Outro Desconhecido1.5 Contato com pombos e/ou outras aves: Sim Não Desconhecido**2) INFORMAÇÃO MICROBIOLÓGICA**

2.1 Data da coleta do material: ___/___/_____ (DD/MM/AAAA)

2.2) Espécie de *Cryptococcus*2.2 Variedade de *Cryptococcus*: neoformans (D) gattii (B;C) grubii (A)

2.3 Material Clínico:

 LCR Sangue Urina Tec.cutâneo Escarro Outros:

2.4 Associação com outros microorganismos:

 Pneumocistis carinii *Histoplasma* *Candida* Micobactérias Outros: _____2.5 Nos 14 dias ANTES da cryptococcose incidente, havia outras culturas positivas para *Cryptococcus*? Sim Não Não sei

2.5.1 Se sim, indique as espécies, data e os locais das culturas:

Espécie 1 _____ data ___/___/_____
(DD/MM/YYYY) Trato Respiratório Sangue LCR urina
outro: _____Espécie 2 _____ data ___/___/_____
(DD/MM/YYYY) Trato Respiratório Sangue LCR urina outro: _____2.6 Nos 30 dias DEPOIS da cryptococcose incidente houve outra cultura positiva para *Cryptococcus*?

Sim Não Não sei

2.6.1 Se Sim, indique as espécies, data e os locais das culturas:

Espécie 1 _____ data ___/___/___ (DD/MM/YY)

Trato Respiratório Sangue LCR urina outro: _____

Espécie 2 _____ data ___/___/___

(DD/MM/YYYY)

Trato Respiratório Sangue LCR urina outro: _____

4) Pesquisa dos fatores de risco para Cryptococose

História nos 3 meses antes da cryptococose incidente

4.1 Neoplasia: Sim Não Não sei

Se sim: Hematológica Tumor sólido Não sei

Se hematológica: Linfoma Leucemia Hodgkin's

4.2 Paciente transplantado: Sim Não Não sei

4.2.1 Se sim, especifique o órgão transplantado:

Rim Coração Pulmão Fígado Pâncreas Medula óssea Outro
(especificar)

4.3 HIV +: Sim Não Não sei

4.3.1 Se sim, o paciente preenche critérios para AIDS? Sim Não Não sei

4.3.2 Contagem mais recente de CD4 : _____ Não sei

4.3.3 Data do exame de CD4: ___/___/___ (DD/MM/YYYY) Não sei

4.4 Doença pulmonar obstrutiva crônica: Sim Não Não sei

4.5 Doença Hepática: Sim Não Não sei

4.6.1 Se sim, tem cirrose? Sim Não Não sei

4.6 Diabetes Mellitus: Sim Não Não sei

4.7.1 Se sim, é tratado com insulina?: Sim Não Não sei

4.7 Insuficiência Renal: Sim Não Não sei

4.8.1 Se sim, era insuficiência renal crônica? Sim Não Não sei

4.8.2 O paciente estava em diálise crônica antes da cryptococose? Sim Não

Não sei

4.8 Doença Auto-imune: Sim Não Não sei

Se sim, qual? lupus artrose sarcoidose Não sei Outra: _____

4.9 Doença Neurológica: Sim Não Não sei

4.10 Mucosite secundária a quimioterapia: Sim Não Não sei

4.11 Neutropenia (neutrófilos <500/mm³): Sim Não Não sei

Se sim,

4.14.1 Durante este período, o paciente teve neutropenia (<500/mm³) prolongada (≥10 dias)?

Sim Não Não sei

4.14.2 Durante este período o paciente teve neutropenia profunda (neutrófilos <100/mm³)? :

Sim Não Não sei

5) INFORMAÇÕES CLÍNICAS

5.1 Principais sintomas:

- febre dispnéia cefaléia vômitos
 confusão mental
 tosse produtiva tosse não-produtiva vertigem objetiva
 vertigem subjetiva fraqueza nos membros desordem visual
 Linfadenopatia hemoptise

5.6 Raio X e/ou tomografia computadorizada:

- Nódulos pulmonares: Sim Não Não sei
 Nódulos cerebrais: Sim Não Não sei

5.7 Nas 72 horas antes da cryptococose incidente, o paciente estava neutropênico (<500 neutrófilos/mm³)?

- Sim Não Não sei

5.8 Nas 72 horas antes da cryptococose incidente, o paciente estava com neutropenia profunda (<100 neutrófilos/mm³)?

- Sim Não Não sei

5.9 Presença de lesão cutânea?

- Sim Não Não sei

6) HISTÓRIA DE MEDICAÇÃO

ATÉ 14 DIAS ANTES DA CRYPTOCOCOSE INCIDENTE:

Nos 14 dias antes da cryptococose incidente, o paciente estava ou tinha recebido algum dos seguintes?

6.1 Antibiótico (oral ou IV) por >24 horas?

- Sim Não Não sei

- 8.1.1 Se sim, especifique:
- 1 a 2 antibióticos
 - 3 a 4 antibióticos
 - 5 a 6 antibióticos
 - 7 ou mais antibióticos

6.2 Corticosteróides sistêmicos (oral ou IV)?

- Sim, dose

adminisrada: _____ Não Não sei

6.3 Outras drogas imunossupressoras?

- Sim Não Não sei

6.4 Quimioterapia contra o câncer?

- Sim Não Não sei

6.5 Terapia anti-retroviral (até 2 meses antes) ?

- Sim Não Não sei

Se sim, quais drogas

- AZT Análogos de nucleosídeo Inibidor de protease HAART

6.6 Bloqueadores H2?

- Sim Não Não sei

6.7 O paciente recebeu ou estava recebendo drogas antifúngicas?

- Sim Não Não sei

6.7.1 Se sim, qual era a razão para o seu uso?

- Profilático ou empírico
- Tratamento de uma infecção conhecida não incluída neste episódio de cryptococose
- Não sei

6.7.2 Se sim, que antifúngico(s) estava(m) sendo usado(s)? Marque todos que se aplicarem.

- Anfotericina B Ambisome Abelcet Fluconazol
- Itraconazol Voriconazol Posaconazol Caspofungina
- Fluorocitosina Amphocyl Micafungina Outro
- Paciente em estudo cego (droga desconhecida)

ATÉ 30 DIAS APÓS A CRYPTOCOCOSE INCIDENTE:

6.8 O paciente recebeu algum tratamento antifúngico para ESTE episódio de cryptococose?

Sim Não Não sei

Se sim, indique o código de antifúngico(s), data em que o tratamento foi iniciado, e data da última dose para tratamento desta cryptococose.

| Código | Data do início (DD/MM/YYYY) | Data da última dose (DD/MM/YYYY) |
|--------|--------------------------------|-------------------------------------|
| | __/__/____ | __/__/____ |
| | __/__/____ | __/__/____ |
| | __/__/____ | __/__/____ |
| | __/__/____ | __/__/____ |

| Código | Antifúngico |
|---------------|--|
| 01 | Anfotericina B |
| 02 | Ambisome |
| 03 | Abelcet |
| 04 | Amphocyl |
| 05 | Fluconazol |
| 06 | Itraconazol |
| 07 | Voriconazol |
| 08 | Posaconazol |
| 09 | Caspofungina |
| 10 | Fluorocitosina |
| 11 | Micafungina |
| 12 | Outro |
| 13 | Paciente em estudo cego (droga desconhecida) |

ENTRE 14 DIAS ANTES E 30 DIAS DEPOIS DA CRYPTOCOCOSE INCIDENTE**6.9 HISTÓRIA DE USO DE DROGAS ANTIFÚNGICAS**

Para todas as drogas antifúngicas recebidas, entre o código do(s) antifúngico(s) administrados e a dose, começando 14 dias antes da cryptococose incidente até 30 dias depois da cryptococose incidente. Se o paciente estava recebendo apenas um antifúngico, registre as informações em “Antifúngico 1”. Registre um segundo antifúngico em “Antifúngico 2”, se for o caso.

Código**Antifúngico**

1. Anfotericina B
2. Ambisome
3. Abelcet
4. Amphocyl
5. Fluconazol
6. Itraconazol
7. Voriconazol
8. Posaconazol
9. Caspofungina
10. Micafungina
11. Outro
12. Paciente em estudo cego (droga desconhecida)

| Dia | Antifúngico 1 Código | Dose total diária (mg) | Antifúngico 2 Código | Dose total diária (mg) |
|---------------------------|-------------------------|---------------------------|-------------------------|---------------------------|
| -14 | | | | |
| -13 | | | | |
| -12 | | | | |
| -11 | | | | |
| -10 | | | | |
| -9 | | | | |
| -8 | | | | |
| -7 | | | | |
| -6 | | | | |
| -5 | | | | |
| -4 | | | | |
| -3 | | | | |
| -2 | | | | |
| -1 | | | | |
| Cryptococose Incidente | | | | |
| 1 | | | | |
| 2 | | | | |
| 3 | | | | |
| 4 | | | | |
| 5 | | | | |
| 6 | | | | |
| 7 | | | | |
| 8 | | | | |
| 9 | | | | |
| 10 | | | | |
| 11 | | | | |
| 12 | | | | |
| 13 | | | | |
| 14 | | | | |
| 15 | | | | |
| 16 | | | | |
| 17 | | | | |
| 18 | | | | |
| 19 | | | | |
| 20 | | | | |
| 21 | | | | |
| 22 | | | | |
| 23 | | | | |
| 24 | | | | |
| 25 | | | | |
| 26 | | | | |
| 27 | | | | |
| 28 | | | | |
| 29 | | | | |
| 30 | | | | |

7) INFORMAÇÃO SOBRE A EVOLUÇÃO

ATÉ 30 DIAS DEPOIS DA CRYPTOCOSE INCIDENTE:

7.1 Houve sinais de envolvimento de outros locais pelo *Cryptococcus*? (NOTA: Evidência inclui resultados de métodos de imagem, como TC, ecocardiograma, histopatologia, exame físico, como em endoftalmite, ou cultura de um local estéril).

Sim Não Não sei

7.1.1 Se sim, indique o(s) órgão(s):

Pulmões Sistema nervoso central Fígado/baço Pele Rins Outro
(especificar _____)

7.2 O paciente recebeu alta após esta hospitalização?

Sim Não Não foi internado Não sei

7.2.2 Se sim, qual foi a data da alta? : ____/____/____ (DD/MM/YYYY)

Não recebeu alta até 30 dias após a cryptococose incidente
 Não sei

7.3 O paciente foi transferido para outra instituição?

Sim Não Não foi hospitalizado Não sei

7.4 O paciente sobreviveu >30 dias da data da cryptococose incidente? Sim Não

Não sei

7.4.1 Se não, Data do óbito: ____/____/____ (DD/MM/YYYY)

7.4.2 Foi realizada necrópsia? Sim Não Não sei

7.4.3 Se sim, havia envolvimento de *Cryptococcus* em órgãos?

Sim Não Não sei

7.4.4 Se sim, indique o(s) órgão(s):

Coração Pulmões Fígado/baço Ossos Sistema nervoso central
 Olhos Rins Outro (especificar)

7.4.5 Se Sim, a cryptococose foi a causa do óbito?

Sim Não Não sei

7.5 Houve recorrência durante o tratamento?

Sim Não Não sei

8) Dados laboratoriais

8.1 Como foi feito o diagnóstico da Cryptococose?

Exame direto Cultura Sorologia