

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Marília Martins Nishikawa

**PERFIL DE SENSIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS E DIVERSIDADE GENÉTICA DE
CEPAS DE *Cryptococcus neoformans* E *Cryptococcus gattii*
PRESERVADAS EM COLEÇÕES DE CULTURAS DA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

Rio de Janeiro

2012

Marília Martins Nishikawa

PERFIL DE SENSIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS E DIVERSIDADE GENÉTICA DE
CEPAS DE *Cryptococcus neoformans* E *Cryptococcus gattii*
PRESERVADAS EM COLEÇÕES DE CULTURAS DA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do Título de Doutorado em Vigilância Sanitária

Orientadoras: Márcia dos Santos Lázera
Paola Cardarelli Leite

Rio de Janeiro

2012

Catálogo na fonte
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Nishikawa, Marília Martins

Perfil de Sensibilidade a Antifúngicos e diversidade genética de cepas de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* preservadas em Coleções de Culturas da Fundação Oswaldo Cruz./Marília Martins Nishikawa.- Rio de Janeiro: INCQS

/FIOCRUZ, 2012.

156 f.: il., tab.

Tese de (Doutorado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária; Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, 2012.

Orientadoras: Márcia dos Santos Lázera e Paola Cardarelli Leite

1. *Cryptococcus neoformans*. 2. *Cryptococcus gattii*. 3. Teste de sensibilidade a antifúngicos. 4. AFLP.

Marília Martins Nishikawa

PERFIL DE SENSIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS E DIVERSIDADE GENÉTICA DE
CEPAS DE *Cryptococcus neoformans* E *Cryptococcus gattii*
PRESERVADAS EM COLEÇÕES DE CULTURAS DA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Vigilância Sanitária

Orientadoras: Márcia dos Santos Lázera
Paola Cardarelli Leite

Aprovado em ___ / ___ / ___

BANCA EXAMINADORA

Dra. Manuela da Silva
Vice-Presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência – Fiocruz

Dra. Luciana Trilles
Laboratório de Micologia do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas – Fiocruz

Dra. Marcia de Souza Carvalho Melhem
Instituto Adolfo Lutz – São Paulo

Dra. Maria Helena Villas Boas
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - Fiocruz

Dr. Paulo Murillo Neufeld
Universidade Federal do Rio de Janeiro

**Sem o esforço da busca é impossível
a alegria do encontro.
(Autor desconhecido)**

**A Deus pelo Dom da Vida,
Aos meus filhos Luís Antonio, Milena e Ana Maria
A todos que colaboraram na realização deste trabalho,
A minha gratidão.**

RESUMO

A criptococose é micose cosmopolita causada pelas leveduras *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*. O *C. neoformans* tem caráter predominante oportunista, constituindo importante causa de meningoencefalite e morte em pacientes aids em todo o mundo. O *C. gattii* é um agente de micose sistêmica em indivíduos aparentemente normais, sendo endêmico nas regiões norte e nordeste do Brasil, atingindo crianças e indivíduos jovens, HIV-negativos e ocorrendo esporadicamente nas demais regiões. O aparecimento de resistência aos antifúngicos utilizados durante o tratamento de criptococose entre cepas de *C. neoformans* e *C. gattii* é uma questão preocupante e importante. Avaliou-se a sensibilidade *in vitro* aos antifúngicos anfotericina B (AMB), 5-fluocitosina (5FC), itraconazol (ICZ), fluconazol (FCZ) e voriconazol (VCZ) em 99 cepas clínicas e 10 ambientais de *C. neoformans*, e em 61 cepas clínicas e seis ambientais de *C. gattii*, todos isolados da região norte do Brasil. Utilizou-se o método de microdiluição em caldo M27-A3, padronizado pelo CLSI para determinação dos valores de CIM e dois métodos comerciais Etest e Vitek 2. A resistência para AMB foi 2% (2/99) e 6,56% (4/61) em cepas clínicas de *C. neoformans* e *C. gattii* respectivamente. A sensível dose dependente (S-DD) foi observada para 5FC 18% (11/61), ICZ 75,4% (46/61) e FCZ 22,9% (14/61) em cepas clínicas de *C. gattii*. As cepas ambientais de *C. neoformans* foram sensíveis aos antifúngicos testados, enquanto que nas cepas ambientais de *C. gattii* a resistência para AMB foi de 33,3% (2/6), S-DD para ICZ 50% (3/6) e para FCZ 16,6% (1/6). A Concordância Essencial (EA) observada para os valores de CIM obtidos pelo CLSI e Etest foi para AMB 1% ($p < 0,0001$) significativamente diferente, e para ICZ, FCZ e VCZ a EA foi de 95% \pm 2 em cepas clínicas de *C. neoformans* e *C. gattii*. Para os valores de CIM obtidos pelo CLSI e Vitek 2, a EA foi para AMB 100%, para 5FC foi 26,5% ($p < 0,0004$) significativamente diferente em cepas clínicas de *C. neoformans* e *C. gattii*, foi para o FCZ 62,2% para *C. neoformans* e 91,8% para *C. gattii* e não foi determinada para VCZ nas cepas estudadas. Observou-se em cepas clínicas de *C. neoformans* que a Concordância Categórica (CC) entre os valores de CIM obtidos pelo CLSI e Etest foi para AMB 98% e pelo CLSI e Vitek 2 foi 99%. A CC para FCZ foi 100% entre as metodologias comparadas. Observou-se em cepas clínicas de *C. gattii* que a CC entre os valores de CIM obtidos pelo CLSI e Etest foi para AMB 93,4% e para FCZ 67,2%. A CC obtida pela comparação CLSI e Vitek para *C. gattii* foi para AMB 95% e para FCZ 77%. A diversidade genética foi estudada por AFLP em outras 52 cepas de *C. neoformans*, sendo 44 de origem clínica e oito ambientais, e 30 cepas de *C. gattii*, sendo 26 de origem clínica e três ambientais, oriundas de diferentes estados do Brasil. Os genótipos AFLP1 (86,6%), AFLP1A (7,7%), AFLP2 (3,8%) e AFLP3 (1,9%) foram observados em cepas de *C. neoformans* e AFLP4 (10%), AFLP5 (6,67%) e AFLP6 (80%) ocorreram em cepas de *C. gattii*. Foram expressos fenotipicamente os fatores de virulência: termotolerância, produção de cápsula, fosfolipase extracelular e de melanina em todas as cepas de *C. neoformans* e *C. gattii* preservadas na Coleção de Culturas e utilizadas neste estudo. Foi observada resistência para AMB em cepas clínicas de *C. neoformans* e para AMB e FCZ em cepas clínicas e ambientais de *C. gattii*, indicando a circulação dessas cepas resistentes no ambiente na região norte do Brasil. O Eteste não identificou resistência *in vitro* para AMB. O Vitek 2 não determinou o valor de CIM para VCZ nas cepas de *C. neoformans* e *C. gattii* analisadas. A evidência de resistência aos antifúngicos implica no estabelecimento de ações para o seu monitoramento e influencia protocolos de utilização de drogas antifúngicas *in vitro*.

Palavras chaves: *C. neoformans*, *C. gattii*, Teste de Sensibilidade *in vitro*, AFLP.

ABSTRACT

Cryptococcosis is a cosmopolitan mycosis caused by the yeasts *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii*. *C. neoformans* infections occur worldwide and are an important cause of mortality in immunocompromised hosts, especially AIDS-patients. *C. gattii* usually infects normal hosts; it is endemic in North and Northeast of Brazil infecting children and young adults, but it seldom occurs in the other regions of the country. The emergence of resistance to the antifungal drugs commonly used for cryptococcosis treatment is an important issue of concern. Thus, the *in vitro* antifungal susceptibility of 99 clinical and 10 environmental strains of *C. neoformans* and 61 clinical and six environmental strains of *C. gattii* against amphotericin B (AMB), 5-fluorocytosine (5FC), fluconazole (FCZ), voriconazole (VCZ) and itraconazole (ICZ) was evaluated. Minimal Inhibitory Concentration (CIM) was determined using the commercial systems Etest and Vitek 2 and the standardized methodology of broth microdilution (CLSI), with spectrophotometrical analysis after 72 h incubation at 35°C. Besides all strains studied were phenotypically tested for thermotolerance, capsule production, phospholipase and melanin production. Resistance to AMB was found in 2% (2/99) and 6.56% (4/61) of the clinical strains of *C. neoformans* and *C. gattii* respectively. Susceptibility dose-dependent (S-DD) was identified in 18% (11/61), 75.5% (46/61) and 22.95% (14/61) of clinical *C. gattii* strains against 5FC, ICZ and FCZ respectively. *C. neoformans* environmental strains were susceptible (S) to all antifungal tested, while 33.33% (2/6) of *C. gattii* environmental strains were resistant to AMB, and 50% (3/6) and 16.67% (1/6) were S-DD to ICZ and FCZ respectively. Considering clinical strains of *C. neoformans* and *C. gattii*, the Essential Agreement (EA) of MICs observed between the methodologies CLSI and Etest was 1% for AMB ($p < 0.0001$) and $95\% \pm 2.07$ for ICZ, FCZ and VCZ. However the EA between CLSI and Vitek was 100% for AMB and, 26.5% 5FC ($p < 0.0004$), for FCZ 62.24% and 91.8% (*C. neoformans* and *C. gattii* respectively). EA for VCZ was not determined. The Categorical Agreement (CA) of *C. neoformans* clinical strains between CLSI and Etest was 98% for AMB, and between CLSI and Vitek 2 was 95%. The CA between CLSI and Etest among clinical strains of *C. gattii* was 93.4% for AMB and 67.2% for FCZ, while the CA between CLSI and Vitek 2 was 95% for AMB and 77% for FCZ. Genetic diversity was assessed by AFLP and 82 other clinical and environmental strains from different states of Brazil were added to the study, 52 *C. neoformans* and 30 *C. gattii*. The genotypes identified among *C. neoformans* Brazilian strains were AFLP1 (86.6%), AFLP1A (7.7%), AFLP2 (3.8%) e AFLP3 (1.9%), and among *C. gattii* AFLP4 (10%), AFLP5 (6.67%) e AFLP6 (80%). The study detected clinical *C. neoformans* strains resistant to AMB and environmental and clinical *C. gattii* strains resistant to FCZ, indicating the presence of those resistant strains in northeastern Brazil. Etest did not detect any resistance to AMB and Vitek failed to determine the MIC for VCZ. The evidence of resistance to antifungal drugs require the establishment of a continued surveillance of antifungal susceptibility of clinical and environmental strains of *C. neoformans* and *C. gattii* in order to ensure more successful therapy of cryptococcosis.

Keywords: Antifungal Susceptibility Testing *in vitro*, *C. neoformans*, *C. gattii*, AFLP.

LISTA DE FIGURA

- FIGURA 1** Representação gráfica da Tabela 1 - Crescimento de *C. neoformans* e *C. gattii* em diferentes temperaturas.....87
- FIGURA 2** Representação gráfica da Tabela 2 - Atividade enzimática de fosfolipase extracelular.....89
- FIGURA 3** Representação gráfica da Tabela 3 - CLSI - M27-A3 - Variação de CIM em cepas clínicas de *C. neoformans*.....92
- FIGURA 4** Representação gráfica da Tabela 3 - CLSI - M27-A3 - Variação de CIM em cepas clínicas de *C. gattii*.....92
- FIGURA 5** Representação gráfica da Tabela 3 - CLSI - M27-A3 - Média Geométrica em cepas clínicas de *C. neoformans* e *C. gattii*.....93
- FIGURA 6** Representação gráfica da Tabela 4 - CLSI - M27-A3 - % por categoria para cepas clínicas de *C. neoformans*.....95
- FIGURA 7** Representação gráfica da Tabela 4 - CLSI - M27-A3 - % por categoria para cepas clínicas de *C. gattii*.95
- FIGURA 8** Representação gráfica da Tabela 5 - CLSI - M27-A3 - Variação de CIM em cepas ambientais de *C. neoformans*.97
- FIGURA 9** Representação gráfica da Tabela 5 - CLSI - M27-A3 - Variação de CIM em cepas ambientais de *C. gattii*.....97
- FIGURA 10** Representação gráfica da Tabela 5 - CLSI - M27-A3 - Média Geométrica em cepas ambientais de *C. neoformans* e *C. gatti*.....98
- FIGURA 11** Representação gráfica - CLSI - M27-A3 - % por categoria para cepas ambientais de *C. neoformans*.99
- FIGURA 12** Representação gráfica - CLSI - M27-A3 - % por categoria para cepas ambientais de *C. gattii*.....99

FIGURA 13	Representação gráfica da Tabela 6 - Etest - Variação de CIM em cepas clínicas de <i>C. neoformans</i>	101
FIGURA 14	Representação gráfica da Tabela 6 - Etest - Variação de CIM em cepas clínicas de <i>C. gattii</i>	102
FIGURA 15	Representação gráfica da Tabela 6 - Etest - Média Geométrica em cepas clínicas de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i>	102
FIGURA 16	Representação gráfica da Tabela 7 - Etest - % por categoria para cepas clínicas de <i>C. neoformans</i>	104
FIGURA 17	Representação gráfica da Tabela 7 - Etest - % por categoria para cepas clínicas de <i>C.gattii</i>	105
FIGURA 18	Representação gráfica da Tabela 8 - Etest - Variação de CIM em cepas ambientais de <i>C. neoformans</i>	106
FIGURA 19	Representação gráfica da Tabela 8 - Etest - Variação de CIM em cepas ambientais de <i>C. gattii</i>	107
FIGURA 20	Representação gráfica da Tabela 8 - Etest – Média Geométrica em cepas ambientais de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i>	107
FIGURA 21	Representação gráfica - Etest - % por categoria para cepas ambientais de <i>C. neoformans</i>	108
FIGURA 22	Representação gráfica - Etest - % por categoria para cepas ambientais de <i>C. gattii</i>	109
FIGURA 23	Representação gráfica da Tabela 9 – Vitek 2 - Variação de CIM em cepas clínicas de <i>C. neoformans</i>	111
FIGURA 24	Representação gráfica da Tabela 9 - Vitek 2 - Variação de CIM em cepas clínicas de <i>C. gattii</i>	111
FIGURA 25	Representação gráfica da Tabela 9 – Vitek 2 – Média Geométrica em cepas clínicas de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i>	112
FIGURA 26	Representação gráfica da Tabela 10 – Vitek 2 - % por categoria para cepas clínicas de <i>C. neoformans</i>	113

FIGURA 27	Representação gráfica da Tabela 10 – Vitek 2 - % por categoria para cepas clínicas de <i>C.gattii</i>	114
FIGURA 28	Representação gráfica da Tabela 11 – Vitek 2 - Variação de CIM em cepas ambientais de <i>C. neoformans</i>	115
FIGURA 29	Representação gráfica da Tabela 11 - Vitek 2 - Variação de CIM em cepas ambientais de <i>C. gattii</i>	116
FIGURA 30	Representação gráfica da Tabela 11 - Vitek 2 – Média Geométrica em cepas ambientais de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i>	116
FIGURA 31	Representação gráfica – Vitek 2 - % por categoria para cepas ambientais de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i>	117
FIGURA 32	Representação gráfica das Tabelas 12 e 13 - Concordância Essencial (EA) entre os valores de CIM obtidos pelo Etest e pelo CLSI em cepas de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> de origem clínica.....	119
FIGURA 33	Representação gráfica das Tabelas 14 e 15 - Concordância Essencial (EA) entre os valores de CIM obtidos pelo Vitek 2 e pelo CLSI em cepas de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> de origem clínica.....	120
FIGURA 34	Representação gráfica da Concordância Essencial (EA) entre os valores de CIM obtidos pelo Etest e pelo CLSI em cepas de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> de origem ambiental.....	121
FIGURA 35	Concordância Essencial (EA) entre os valores de CIM obtidos pelo Vitek 2 e pelo CLSI em cepas de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> de origem ambiental.....	122
FIGURA 36	Perfil molecular obtido por AFLP de cepas de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> obtido pela correlação de Pearson e UPGMA.....	131

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Crescimento de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> em diferentes temperaturas.....	87
TABELA 2	Análise da Atividade Enzimática de Fosfolipase Extracelular.....	89
TABELA 3	Variação de CIM, valores de CIM ₅₀ , CIM ₉₀ e MG dos antifúngicos testados para <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> de origem clínica obtidos segundo o protocolo CLSI M27-A3 (2008).....	91
TABELA 4	Comparação dos percentuais de sensibilidade aos antifúngicos testados pelo Método de Microdiluição em Caldo, pelos parâmetros propostos no protocolo CLSI M27-A3, por Aller colaboradores (2000), e S e R com base no ECV proposto por Espinel-Ingroff e colaboradores (2012) para cepas de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> de origem clínica.....	94
TABELA 5	Variação de CIM, valores de CIM ₅₀ , CIM ₉₀ e MG dos antifúngicos testados para <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> de origem ambiental obtidos segundo o protocolo CLSI M27-A3 (2008).....	96
TABELA 6	Variação de CIM, valores de CIM ₅₀ , CIM ₉₀ e MG dos antifúngicos testados para <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> de origem clínica obtidos segundo o protocolo Etest.....	101
TABELA 7	Comparação dos percentuais de sensibilidade aos antifúngicos testados pelo Etest, pelos parâmetros propostos no protocolo CLSI M27-A3, por Aller e colaboradores (2000), e S e R com base no ECV proposto por Espinel-Ingroff e colaboradores (2012) para cepas de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> de origem clínica.....	104
TABELA 8	Variação de CIM, valores de CIM ₅₀ , CIM ₉₀ e MG dos antifúngicos	

	testados para <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> de origem ambiental obtidos segundo o protocolo Etest.....	106
TABELA 9	Variação de CIM, valores de CIM ₅₀ , CIM ₉₀ e MG aos antifúngicos testados para <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> de origem clínica obtidos segundo o Sistema Vitek 2.....	110
TABELA 10	Comparação dos percentuais de sensibilidade aos antifúngicos testados pelo sistema Vitek 2, pelos parâmetros propostos no protocolo CLSI M27-A3, por Aller e colaboradores (2000), e S e R com base no ECV proposto por Espinel-Ingroff e colaboradores (2012) para cepas de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> de origem clínica.....	113
TABELA 11	Variação de CIM, valores de CIM ₅₀ , CIM ₉₀ e MG aos antifúngicos testados para <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> de origem ambiental obtidos segundo o Sistema Vitek 2.....	115
TABELA 12	Diferentes distribuições de CIM para as 99 cepas de <i>C. neoformans</i> de origem clínica e percentual de concordância dentro de ± 2 diluições pelos os métodos CLSI e Etest.....	118
TABELA 13	Diferentes distribuições de CIM para as 61 cepas de <i>C. gattii</i> de origem clínica e percentual de concordância dentro de ± 2 diluições pelos métodos CLSI e Etest.....	118
TABELA 14	Diferentes distribuições de CIM para 98 cepas de <i>C. neoformans</i> de origem clínica e percentual de concordância dentro de ± 2 diluições pelos métodos CLSI e Vitek 2.....	119
TABELA 15	Diferentes distribuições de CIM para as 61 cepas de <i>C.gattii</i> de origem clínica e percentual de concordância dentro de ± 2 diluições pelos métodos CLSI e Vitek 2	120

TABELA 16	Classificação de erros dos resultados discrepantes em relação a interpretação de sensibilidade aos antifúngicos testados segundo o protocolo CLSI M27-A3 comparado com os métodos comerciais Etest e Vitek 2 para <i>C. neoformans</i> de origem clínica.....	123
TABELA 17	Classificação de erros dos resultados discrepantes em relação à interpretação de sensibilidade aos antifúngicos testados segundo o protocolo CLSI M27-A3 comparado com os métodos comerciais Etest e Vitek 2 para <i>C. gattii</i> de origem clínica.....	124
TABELA 18	<i>P</i> -valor obtido pela comparação de CIM segundo o protocolo CLSI M27-A3 e os métodos comerciais Etest e Vitek 2 para <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> de origem clínica.....	126
TABELA 19	<i>P</i> -valor obtido pela comparação de CIM segundo o protocolo CLSI M27-A3 e os métodos comerciais Etest e Vitek 2 para <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> de origem ambiental.....	127
TABELA 20	Cepas de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> de origem clínica utilizadas na genotipagem por AFLP, distribuídas por região geográfica, sexo e resultado do teste de HIV do paciente.....	128
TABELA 21	Distribuição dos genótipos obtidos por AFLP para <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> do Brasil, Austrália e Estados Unidos.....	130

LISTA DE SIGLAS, ABREVIações E SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
≥	Maior ou igual
≤	Menor ou igual
µg/mL	Micrograma/Milésima parte de um litro
5FC	Flucitosina
5-FU	5-fluorouracil
AB	<i>Applied Biosystems</i>
ABC	Proteínas da superfamília de transportadores conhecido como bomba de efluxo de azólicos
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polimorphism</i>
<i>afr1</i>	Gene mutante - <i>Antifungal Resistance1</i>
<i>AFR1</i>	<i>Gene Antifungal Resistance1</i>
AM	Amazonas
AMB	Anfotericina B
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AO	<i>Acridine Orange</i>
ASN	Ágar Semente de Niger
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenina trifosfato
AU	Austrália
BA	Bahia
BH2	Modelo de microscópio óptico Olympus
BR	Brasil
CC	Concordância categorial
CCr	Controle do crescimento
<i>CAP</i>	Gene da cápsula polissacarídica
CATREM	Comissão de Assessoria Técnica em Resistência Microbiana em Serviços de Saúde

CBS	<i>Centraalbureau voor Schimmelcultures</i>
Cdc42	Proteína que regula a morfogênese celular em todos os eucariontes
cDNA	<i>Complementary Deoxyribonucleic Acid</i>
CE	Ceará
CEM	Controle de esterilidade do meio
CGB	Canavanina-glicina-azul de bromotimol
CGLAB	Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública
CIEVS	Centro de Informações Estratégicas em Vigilância em Saúde
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
CMRVS	Coleção de Micro-organismos de Referência em Vigilância Sanitária
CNEMDR1	Proteína - <i>Cryptococcus neoformans</i> Multi-Drug Resistance 1
<i>CneMDR1</i>	Gene - <i>Cryptococcus neoformans</i> Multi-Drug Resistance 1
CNEMDR2	Proteína - <i>Cryptococcus neoformans</i> Multi-Drug Resistance 2
<i>CneMDR2</i>	Gene - <i>Cryptococcus neoformans</i> Multi-Drug Resistance 2
<i>CNLAC1</i>	<i>Gene Laccase Enzyme</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CURAREM	Comitê Técnico Assessor para Uso Racional de Antimicrobiano e Resistência Microbiana
Dc	Diâmetro da colônia
Dcp	Diâmetro da colônia mais a zona de precipitação
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
EA	<i>Essential Agreement</i>
<i>EcoRI</i>	Enzima endonuclease isolada de <i>Escherichia coli</i>
ECVs	<i>Epidemiologic cutoff values</i>
EM	Erro grave
EMG	Erro gravíssimo
EMi	Erros leves ou menores
<i>ERG</i>	<i>E-twenty six Related Gene</i>

ERG11	<i>E-twenty six Related Gene 11</i>
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
FCZ	Fluconazol
FDA	<i>Food and Drugs Administration</i>
FdUMP	5-fluoro-2-deoxiuridina-5-monofosfato
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
<i>FKS1</i>	<i>Glucan Synthase</i>
FUMP	5-fluoro-uridina-monofosfato
FUTP	5-fluoro-uridina-trifosfato
G	Glicina
GalXM	Galactoxilomanana
GIPEA	Gerência de Investigação e Prevenção das Infecções e dos Eventos Adversos
GlcpA	D-glucopiranosil-ácido urônico
GO	Goiás
GT	Grupo de Trabalho
GXM	Glucuronoxilomanana
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
I	Intermediário
ICZ	Itraconazol
IGS	<i>Intergenic Spacer</i>
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IP	Iodeto de Propídeo
IPCS	Infecções Primárias da Corrente Sanguínea
IPEC	Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas
ITS	<i>Intragenic Spacer</i>
LACENs	Laboratórios Centrais de Saúde Pública
LCR	Líquido Céfalo Raquidiano
LPL	Lisofosfolipase

LPTA	Lisofosfolipase Transacilase
LRNMS	Laboratório de Referência Nacional em Micoses Sistêmicas
M	Molar
<i>MATa</i>	<i>Mating Type a</i>
<i>MATα</i>	<i>Mating Type α</i>
<i>MDR1</i>	<i>Gene Multi-Drug Resistance 1</i>
<i>MseI</i>	Enzima de restrição de <i>Micrococcus</i> sp
MFS	<i>Major Facilitator Superfamily</i>
MG	Média Geométrica
MG	Minas Gerais
Mm	Milímetro
MOPS	3-(N-morpholino)propanesulfonic acid
MP	Manoproteína
MS	Ministério da Saúde
mtLrRNA	<i>Mitochondrial large ribosomal RNA</i>
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PA	Pará
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PCZ	Posaconazol
pH	Potencial Hidrogeniônico
PI	Piauí
<i>PLB1</i>	<i>Gene fosfolipase B</i>
Pz	É um valor de medida. Calculado pelo diâmetro da colônia dividido pelo diâmetro da colônia mais a zona de precipitação.
R	Resistente
RAS	Calcineurina
RCB	Rede Criptococose Brasil

Rede RM	Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde.
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RJ	Rio de Janeiro
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RPMI	Instituto Roswell Park Memorial
RR	Roraima
rRNA	<i>Ribosomal Ribonucleic Acid</i>
RS	Rio Grande do Sul
RT	Transcriptase Reversa
S	Sensível
S	Serina
S-DD	Sensível - dose dependente
SDA 2%	Ágar Sabouraud com glicose a 2%
SDB 2%	Caldo Sabouraud com glicose a 2%
SNC	Sistema Nervoso Central
SP	São Paulo
SUS	Sistema Único de Saúde
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
SYS	<i>Sensititre YeastOne System</i>
TC	Termo de Cooperação
TSA	Testes de Sensibilidade aos Antifúngicos
<i>TPS1</i>	Gene Trealose-6-fosfato Sintase
UF	Unidade Federativa
UPRTase	Uracil Fosforribosil Transferase
<i>URA5</i>	<i>Gene Orotidine-5'-phosphate decarboxylase</i>
UTI	Unidades de Terapia Intensiva
VCZ	Voriconazol
WFCC	<i>World Federation for Culture Collections</i>

Xylp	D-xilopiranosil
YMA	Extrato de levedura, Extrato de malte e ágar
YPDA	Extrato de levedura, peptona, glicose e Agar
YPDB	Extrato de levedura, peptona, dextrose caldo
UFC	Unidades formadoras de colônia
UPGMA	<i>Unweighted pair group method using arithmetic averages</i>
URA	Uso Racional de Antimicrobianos
USA	<i>United States of America</i>
v/v	Volume a volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
1.1 HISTÓRICO.....	25
1.2 FATORES DE VIRULÊNCIA.....	27
1.2.1 Termotolerância.....	28
1.2.2 Cápsula.....	29
1.2.3 Melanina.....	31
1.2.4 Fosfolipase.....	32
1.2.5 <i>Mating Type</i>	33
1.3 ECOLOGIA.....	34
1.4 CRIPTOCOCOSE.....	35
1.4.1 Epidemiologia da Criptococose.....	36
1.4.2 Criptococose no Brasil.....	39
1.4.3 Tratamento da criptococose.....	40
1.5 DIFERENTES GRUPOS DE AGENTES ANTIFÚNGICOS.....	42
1.5.1 Mecanismo de ação de Azóis.....	43
1.5.2 Mecanismo de ação de Polienos.....	44
1.5.3 Mecanismo de ação de análogos de nucleosídeos.....	44
1.5.4 Mecanismo de ação de Alilaminas.....	45
1.5.5 Mecanismo de ação de inibidores da síntese da parede celular fúngica.....	45
1.6 RESISTÊNCIA A AGENTES ANTIFÚNGICOS.....	46
1.6.1 Resistência aos Azóis.....	47
1.6.2 Resistência aos análogos de nucleosídeos.....	50
1.6.3 Resistência à Anfotericina B.....	50
1.6.4 Resistência à Equinocandina.....	51
1.7 HETERORRESITÊNCIA EM <i>Cryptococcus</i>	52
1.8 TESTES DE SENSIBILIDADE <i>IN VITRO</i> A ANTIFÚNGICOS.....	54
1.8.1 Sistemas comerciais para Teste de Sensibilidade a Antifúngico.....	55
1.8.2 Citometria de Fluxo.....	56

1.9 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA E A REDE NACIONAL DE MONITORAMENTO DA RESISTÊNCIA MICROBIANA EM SERVIÇOS DE SAÚDE.....	57
1.10 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA E INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE.....	62
1.11 PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS DE AGENTES DA CRIPTOCOCOSE NO BRASIL.....	63
1.12 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA.....	65
2 OBJETIVOS.....	67
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	67
3 METODOLOGIA.....	68
3.1 MICRO-ORGANISMOS.....	68
3.2 EXPRESSÃO FENOTÍPICA DOS FATORES DE VIRULÊNCIA.....	69
3.2.1 Termotolerância.....	69
3.2.2 Síntese de melanina.....	70
3.2.3 Produção de fosfolipase extracelular.....	71
3.2.4 Indução de cápsula.....	72
3.3 TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS.....	72
3.3.1 Método de microdiluição em caldo.....	73
3.3.1.1 <i>Drogas Antifúngicas</i>	73
3.3.1.2 <i>Meio de Cultivo</i>	73
3.3.1.3 <i>Preparo das diluições</i>	74
3.3.1.4 <i>Preparo das placas de microdiluição</i>	74
3.3.1.5 <i>Inóculo</i>	75
3.3.1.6 <i>Realização do teste</i>	75
3.3.1.7 <i>Leitura dos resultados</i>	76
3.3.2 Etest.....	76
3.3.2.1 <i>Drogas antifúngicas</i>	77
3.3.2.2 <i>Meio de cultivo</i>	77
3.3.2.3 <i>Inóculo</i>	78
3.3.2.4 <i>Realização do teste</i>	78
3.3.2.5 <i>Leitura dos resultados</i>	79

3.3.3 Vitek 2 Compact – bioMérieux.....	79
3.3.3.1 <i>Inóculo</i>	80
3.3.3.2 <i>Realização do teste</i>	80
3.3.4 Interpretação dos resultados.....	80
3.3.5 Análise dos resultados.....	82
3.3.6 Análise estatística.....	83
3.4 DIVERSIDADE GENÉTICA.....	83
4 RESULTADOS	85
4.1 MICRO-ORGANISMOS.....	85
4.2 FATORES DE VIRULÊNCIA.....	86
4.2.1 Termotolerância.....	86
4.2.2 Síntese de melanina.....	88
4.2.3 Produção de fosfolipase extracelular.....	88
4.2.4 Indução de cápsula.....	90
4.3 TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS.....	90
4.3.1 Método de microdiluição em caldo (CLSI - protocolo M27-A3).....	90
4.3.2 Etest.....	100
4.3.3 Vitek 2 Compact.....	109
4.4 CONCORDÂNCIA ESSENCIAL ENTRE AS METODOLOGIAS UTILIZADAS.....	117
4.5 DISCREPÂNCIAS ENTRE AS METODOLOGIAS UTILIZADAS.....	122
4.6 RELATO DE CASO COM VÁRIAS CEPAS ISOLADAS DO MESMO PACIENTE.....	125
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	125
4.8 ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA UTILIZANDO OS PERFIS OBTIDOS POR AFLP.....	127
5 DISCUSSÃO	132
5.1 FATORES DE VIRULÊNCIA.....	132
5.2 TESTE DE SENSIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS.....	135
5.3 DIVERSIDADE GENÉTICA.....	148
6 CONCLUSÕES	152

6.1 FATORES DE VIRULÊNCIA.....	152
6.2 TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS.....	152
6.3 COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS.....	153
6.4 DIVERSIDADE GENÉTICA.....	154
REFERÊNCIAS.....	157
APÊNDICE 1 - CEPAS DE <i>Cryptococcus neoformans</i> E <i>Cryptococcus gattii</i> DE ORIGEM CLÍNICA E AMBIENTAL ORIUNDAS DA REGIÃO NORTE DO BRASIL UTILIZADAS NO TSA.....	174
APÊNDICE 2 - CEPAS DE <i>Cryptococcus neoformans</i> E <i>Cryptococcus gattii</i> DE ORIGEM CLÍNICA E AMBIENTAL ORIUNDAS DE DIFERENTES REGIÕES GEOGRÁFICAS DO BRASIL UTILIZADAS NO AFLP.....	186
APÊNDICE 3 - CEPAS DE <i>Cryptococcus neoformans</i> E <i>Cryptococcus gattii</i> ISOLADAS DO MESMO PACIENTE.....	193
APÊNDICE 4 - CRITÉRIOS PARA INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS DE TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS.....	196

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, o gênero *Cryptococcus* inclui leveduras patogênicas e não patogênicas é constituído de 70 espécies na forma anamórfica. Algumas espécies têm a forma teleomórfica conhecida, estando distribuídas nos gêneros *Filobasidium*, *Filobasidiella*, *Cystofilobasidium* e *Kwoniella*, na classe dos Tremellomycetes do Filo Basidiomycota (FONSECA et al., 2010). *Cryptococcus neoformans* (Sanfelice) Vuillemin, na forma anamórfica, apresenta-se como levedura haplóide, globosa e ou ovóide capsulada, medindo de 3 a 8 µm de diâmetro, com brotamento único ou múltiplo a partir de qualquer ponto da parede celular. Não fermenta açúcares, assimila vários açúcares por metabolismo oxidativo como única fonte de carbono, não assimila o nitrato como fonte de nitrogênio, hidrolisa uréia, é sensível à cicloheximida, sintetiza melanina e é termotolerante, podendo crescer à temperatura de até 40°C (KWON-CHUNG, 1998).

1.1 HISTÓRICO

Cryptococcus neoformans foi identificado como patógeno humano há aproximadamente 115 anos, quando os médicos alemães Busse, em 1894, e Buschke, em 1895, referiram o caso de uma paciente de 31 anos com uma lesão na tíbia, de onde isolaram o agente, após cultivo. Descreveram os aspectos clínicos, patológicos e micológicos da criptococose e seu agente. Na mesma época, em 1894, Sanfelice, na Itália, isolou uma levedura capsulada de suco de pêssigo (apud CASADEVALL; PERFECT, 1998).

Na primeira década, após sua descoberta, muitas sinonímias foram usadas tanto para a micose quanto para o seu agente. Vuillemin, em 1901, ponderou que os organismos isolados por Busse e Sanfelice pertenciam ao gênero *Cryptococcus*, mantendo a prioridade taxonômica do epíteto específico estabelecido por Sanfelice em 1895, ficando a levedura com o binômio *C. neoformans* (apud CASADEVALL; PERFECT, 1998).

No início do século XX, importantes observações foram reconhecidas: a recuperação do micro-organismo a partir de lesões em humanos e animais, estabelecendo seu potencial patogênico, isolamento ambiental, como micro-organismo sapróbio de vida livre e o cultivo *in vitro*, demonstrando sua patogenicidade para animais de laboratório (apud CASADEVALL; PERFECT, 1998).

Em 1950, Benham sugeriu a denominação de *Cryptococcus neoformans* e criptococose para a doença, tornaram-se *nomen conservandum*, resolvendo assim a grande confusão gerada no meio científico em torno deste gênero e espécie, até então considerada uma espécie homogênea (apud KWON-CHUNG; BENNETT, 1992). Ainda em 1950, Evans identificou e descreveu três fenótipos diferentes, com base nas propriedades antigênicas do polissacarídeo capsular a soros hiperimunes. Utilizando reação de aglutinação e de precipitação pela reação capsular com anti-soro de coelho adsorvido, Evans e Kessel demonstraram que a cápsula era determinante do sorotipo específico, denominando os sorotipos A, B, e C (EVANS, 1950, EVANS; KESSEL 1951). O sorotipo D foi descrito em 1968 por Wilson, Bennett e Bailey. Algumas cepas apresentam constituintes antigênicos dos sorotipos A e D, que passaram a representar o quinto sorotipo AD, híbrido descrito em 1985 (IKEDA et al., 1985).

Na década de 1970, foi descrita a forma teleomórfica, *Filobasidiella neoformans*, por Kwon-Chung. Até o momento não se tem descrito a observação de basidiósporos *in vivo*. Os basidiósporos só foram observados *in vitro* em meios apropriados, à temperatura de 25 a 37°C, sendo o heterotalismo controlado por sistema de um locus e dois alelos *a* e α (*MATa* e *MAT α*), identificando duas variedades: *C. neoformans* var. *neoformans* e *C. neoformans* var. *gattii*, com base em diferenças fenotípicas, bioquímicas, sorológicas, ecológicas e epidemiológicas (KWON-CHUNG, 1976, KWON-CHUNG et al., 1978).

O teste bioquímico de CGB (canavanina-glicina-azul de bromotimol) é usado para diferenciar *C. neoformans* var. *neoformans* e *C. neoformans* var. *gattii*. *C. neoformans* var. *gattii* é naturalmente resistente à L-canavanina e utiliza a glicina como única fonte de carbono e nitrogênio, sendo capaz de crescer no meio de CGB, elevando o pH e alterando a cor do indicador de pH, azul de bromotimol, para azul cobalto ou azul esverdeado forte (CGB positivo), que originalmente a pH 5,8 é amarelo esverdeado. *C. neoformans* var. *neoformans* é sensível à L-canavanina e

não assimila a glicina como única fonte de carbono e nitrogênio, não crescendo no meio de CGB, portanto, não alterando o pH, permanecendo com a cor original do meio (CGB negativo) (KWON-CHUNG et al., 1982).

Fell e colaboradores, em 1989, propuseram manter o nome do gênero *Cryptococcus* Vuillemin designando o *C. neoformans* (Sanfelice) como a espécie tipo, com base na história, na necessidade de manter a continuidade e a coerência na literatura científica.

Em recente revisão filogenética, diferentes genes (*URA5*, *CNLAC1*, *CAP59*, *CAP64*, IGS e ITS rRNA, mtLrRNA) de *C. neoformans* var. *gattii* e de *C. neoformans* var. *neoformans* foram analisados, bem como a análise da progênie resultante do cruzamento entre *C. neoformans* var. *neoformans* ATCC 34874 e *C. neoformans* var. *gattii* CBS 6289 por genética molecular. Como resultado não foi observado a recombinação genética entre as duas variedades. Independente do marcador utilizado, a variedade *gattii* constitui grupo monofilético distinto e divergente da variedade *neoformans*, constituindo espécie distinta denominada *Cryptococcus gattii* (KWON-CHUNG et al., 2002). Estudos de polimorfismo de DNA através de *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) também confirmaram *C. gattii* como espécie distinta (BOEKHOUT et al., 2001).

A literatura tem utilizado o termo “complexo *C. neoformans*” para designar os agentes da criptococose incluindo as duas espécies: *C. neoformans* (sorotipos A e D) e *C. gattii* (sorotipos B e C) (KWON-CHUNG; VARMA, 2006). No presente trabalho será utilizada a classificação atual, considerando duas espécies distintas. No entanto, ao mencionar trabalhos prévios, eventualmente a taxonomia utilizada nos mesmos será reportada.

1.2 FATORES DE VIRULÊNCIA

A infecção fúngica resulta geralmente de um encontro acidental com um hospedeiro durante o ciclo de vida dos fungos, pois a grande maioria apresenta um ciclo de vida sapróbio. Entretanto, alguns fungos são capazes de causar doença no homem e animais devido à particular capacidade de sobreviver e multiplicar-se em tais hospedeiros, pela produção dos intitulados fatores de virulência.

Os agentes de criptococose representam um modelo para o estudo de virulência, pois são capazes de crescer à temperatura de 37°C e apresentam fenótipos de virulência muito particulares, que são a cápsula de natureza polissacarídica e a produção de melanina a qual é catalisada pela enzima difenoloxidase, além de importantes vias bioquímicas, como a produção de fosfolipases, proteinases e urease, além da assimilação de manitol (CASADEVAL; PERFECT, 1998).

1.2.1 Termotolerância

Um dos mais importantes fatores de virulência para os fungos patogênicos é a capacidade de crescer a temperatura corporal do hospedeiro. *C. neoformans* e *C. gattii* podem crescer e se multiplicar em temperaturas de 37 a 39°C, sendo esta característica essencial para a virulência desses patógenos. Poucas espécies de *Cryptococcus* são capazes de crescer a 37°C. Mutantes de *C. neoformans* incapazes de crescer a 37°C são avirulentos, mesmo que produzam melanina e cápsula (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992).

A resposta à mudança de 30°C para 37°C implica aumento na expressão gênica de proteínas de choque térmico, sistema tioredoxina e da subunidade de RNA polimerase II. Várias proteínas que são requeridas para a sobrevivência na temperatura de 37°C do hospedeiro já foram identificadas em *C. neoformans*, incluindo trealose-6-fosfato sintase (TPS1), calcineurina sinalização e proteínas RAS (ALSPAUGH et al., 2011).

Componentes da via de proteínas RAS demonstram controlar a arquitetura do citoesqueleto e morfogênese celular dependente de temperatura. Mutantes *ras1D* de *C. neoformans*, sensíveis à temperatura de 35°C a 37°C, são avirulentos ou exibem virulência reduzida em modelos animais de criptococose (ALSPAUGH et al., 2000).

A proteína Cdc42 regula a morfogênese celular em todos os eucariontes. A regulação precisa da morfogênese que é a chave do mecanismo pelo qual as células respondem a uma variedade de estresses. Em *C. neoformans* as proteínas

Cdc42 são necessárias para a resistência à temperatura elevada, permitindo sua sobrevivência no ambiente e no hospedeiro. Mutantes *cdc24D* se mantêm como células grandes, sem brotamento, semelhantes aos mutantes *ras1D* (BALLOU et al., 2010).

1.2.2 Cápsula

O polissacarídeo capsular de *C. neoformans* e de *C. gattii* é constituído de manose, xilose e ácido glucurônico, com várias frações biologicamente ativas. Pela ressonância nuclear magnética (NMR) chegou-se à descrição detalhada de três componentes na fração exo-polissacarídica: glucuronoxilomanana (GXM), galactoxilomanana (GalXM) e manoproteína (MP) (CHERNIAK et al., 1991).

A GXM representa aproximadamente 90% do polissacarídeo capsular e consiste de ligações lineares de (1→3) α -D-manopiranosil com β -D-xilopiranosil (Xylp), β -D-glucupiranosil-ácido urônico (Glc6pA) e substituintes 6-O-acetil. Os sorotipos são determinados pela quantidade de xilose, manose e o grau de O-acetilação (CHERNIAK; SUNDSTROM, 1994). Diferenças na estrutura de GXM entre as cepas produzem diferenças antigênicas que identificam quatro sorotipos: A, B, C e D. A maioria das cepas de *C. neoformans* pertencem ao sorotipo A e algumas são do sorotipo D, poucas cepas de *C. neoformans* apresentam constituintes antigênicos dos sorotipos A e D, originando o quinto sorotipo denominado AD, que se apresenta aneuplóide ou diplóide, resultante da formação de híbridos ou recombinantes entre os sorotipos A e D. *C. gattii* apresenta os sorotipos B e C (IKEDA et al., 1982).

Vários genes envolvidos na síntese e na formação da cápsula polissacarídica foram identificados: *CAP64*, *CAP60*, *CAP59* e *CAP10*, porém os determinantes da diferenciação dos sorotipos não são conhecidos. A deleção de alguns destes genes resulta em cepa mutante acapsulada e avirulenta. A reintrodução de uma cópia funcional de um dos genes da cápsula no mutante restaura a produção de cápsula e a virulência (CHANG; KWON CHUNG, 1994, 1998, CHANG et al., 1996).

Mutantes hipocapsulados ou acapsulados mostraram virulência atenuada ou abolida em modelos experimentais, quando comparados às cepas parentais capsuladas. A estrutura capsular é dinâmica e aumenta consideravelmente de volume durante a infecção, bem como em diferentes sítios de infecção (FROMTLING et al., 1982, CHANG; KWON CHUNG, 1994).

Estudos mostraram que a cápsula é uma matriz com grau variável de porosidade, a qual aumenta com o distanciamento da parede celular. A alta densidade da matriz impede a penetração de moléculas grandes, nas proximidades da parede celular. Em contraste, na borda da cápsula, que é a interface de interação com fagócitos, os polissacarídeos capsulares apresentam baixa densidade, conferindo maior plasticidade e permeabilidade às macromoléculas (GATES et al., 2004).

A cápsula é um importante fator de virulência, pois protege *C. neoformans* e *C. gattii* da fagocitose, interferindo na resposta imunológica do hospedeiro. A liberação do polissacarídeo capsular ocorre no interior dos macrófagos, em vesículas ao redor do fagossoma, durante esse processo as vesículas podem se acumular no citoplasma levando a disfunção e morte celular liberando as células fúngicas. O mecanismo exato no qual há inibição da fagocitose e o componente estrutural do polissacarídeo responsável por este efeito não é completamente entendido. A propriedade antifagocítica deve ser uma combinação de fatores que mascaram a estruturas de superfície, as quais podem ser reconhecidas pelos receptores nas células fagocitárias e ou pela ausência desses receptores que reconheceriam a cápsula. A ativação do sistema complemento ocorre pela via alternativa, caracterizando-se por uma disposição aleatória do C3b no interior da cápsula (KOZEL, 1995, MCQUISTON; DEL POETA, 2011).

Os possíveis mecanismos pelos quais a cápsula protege a levedura no hospedeiro incluem: inibição da fagocitose, migração e adesão de leucócitos, depleção do sistema complemento, bloqueio da parede celular à opsonização pelo anticorpo e alteração da secreção de citocinas (PERFECT et al., 1998, MCQUISTON; DEL POETA, 2011).

1.2.3 Melanina

A produção de pigmentos semelhantes à melanina em *C. neoformans* foi descrita primeiro por Staib (1963), demonstrando que a pigmentação da colônia estava relacionada com o cultivo em extrato de semente de *Guizotia abyssinica* (niger). Melaninas são pigmentos multifuncionais, escuros de alto peso molecular, produzidas por uma lacase em *C. neoformans* pela polimerização oxidativa de compostos difenólicos aromático, grupo diamino e catecolaminas nas posições orto e para, mas não em monofenólicos como o fenol, tiamina ou tirosina (POLACHECK, 1991). A produção de melanina é também observada em outros fungos patogênicos.

C. neoformans e *C. gattii* possuem uma particular atividade de lacase, uma difenoloxidase, que converte compostos difenólicos em melanina. Na presença destes precursores, os cultivos de *C. neoformans* e *C. gattii* apresentam colônias de coloração marrom claro a escuro; o pigmento está localizado na parede celular do fungo, o qual contribui na manutenção da integridade da parede celular (WILLIAMSON, 1994).

O gene *CNLAC1* que codifica esta enzima é de cópia única e a sua deleção gera um mutante Mel⁻ albino, que diminui drasticamente a síntese de melanina e apresenta virulência reduzida em modelos experimentais. A atividade de lacase é regulada pela concentração de glicose, de íons ferro e de cobre, temperatura e disponibilidade de fonte de nitrogênio (WILLIAMSON, 1994, SALAS et al., 1996).

A melanina protege a célula fúngica da ação de superóxidos e de outros agentes oxidantes, gerados pelo fluxo de radicais livres pelas células de defesa imunológicas (JACOBSON; TINNELL 1993, WANG et al., 1995). Outras funções, também atribuídas à melanina são: a resistência ao efeito fungicida da radiação ultravioleta (WANG; CASADEVALL, 1994), a diminuição da sensibilidade à anfotericina B, a resistência a agentes oxidantes (SALAS et al., 1996), anulação a ação de anticorpos mediadores da fagocitose e proteção da célula a temperaturas extremas (PERFECT et al., 1998).

A melanina tem contribuições vitais na sobrevivência e patogênese de *C. gattii* e *C. neoformans*, pois facilita a disseminação da levedura do pulmão para o cérebro. Isto ocorre em razão de o cérebro ser rico em catecolaminas, incluindo epinefrina, norepinefrina e dopamina, que funcionam como substratos para a

difenoloxidase criptocóccica, possibilita a síntese de melanina. Contudo detalhes acerca do processo de melanização ainda precisam se elucidados (TROFA et al., 2011).

1.2.4 Fosfolipase

As fosfolipases são enzimas capazes de promover a hidrólise de uma ou mais ligações éster em glicerofosfolipídios, que auxiliam na degradação e desestabilização da membrana celular ocasionando a lise da célula. Como fator de virulência, a produção de fosfolipases extracelulares ocorre devido à capacidade de degradar a membrana celular de mamíferos e permitir a penetração do fungo nos tecidos do hospedeiro. Essas enzimas podem produzidas e secretadas por muitos micro-organismos patogênicos (GHANNOUM, 2000).

A atividade de fosfolipase extracelular em *C. neoformans* foi demonstrada por Chen e colaboradores (1997), como uma zona de precipitação ao redor das colônias, devido à hidrólise dos fosfolipídios presentes no meio com gema de ovo.

A fosfolipase é uma enzima multifuncional, produto do gene *PLB1*, a qual foi purificada e caracterizada como fosfolipase B (PLB), lisofosfolipase hidrolase (LPL) e lisofosfolipase transacilase (LPTA), por Chen e colaboradores em 2000. O gene foi clonado e o que permitiu a obtenção de mutantes por disrupção gênica. Todas as atividades enzimáticas foram drasticamente reduzidas nos mutantes, em comparação às cepas originais. Testes “*in vivo*” utilizando camundongos inoculados por via respiratória demonstraram que a cepa mutante era significativamente menos virulenta que a cepa controle (COX et al., 2001, LATOUCHE et al., 2002).

Santangelo e colaboradores, em 2004, sugeriram que a fosfolipase estaria envolvida no início e no desenvolvimento da criptococose pulmonar, sendo importante para a entrada da levedura no sistema linfático e no sangue, porém, não parece estar envolvida na infecção do sistema nervoso central.

1.2.5 Mating Type

C. neoformans e *C. gattii* tiveram seus ciclos sexuais observados apenas em laboratório, e descritos a mais de três décadas. Ambas as espécies apresentam um sistema de *mating* bipolar com um único locus *MAT* contendo dois alelos α e *a*. A ocorrência de cada *mating type* $MAT\alpha$ e $MATa$ em isolados clínicos e ambientais de *C. neoformans* diferem significativamente, pois o tipo $MAT\alpha$ é 30 a 40 vezes mais frequente que o tipo $MATa$. Kwon-Chung e colaboradores, em 1992, demonstraram que a progênie do tipo $MAT\alpha$ é mais virulenta que a do tipo $MATa$, sugerindo que o tipo $MAT\alpha$ apresenta vantagem seletiva na sobrevivência ambiental, o que possibilita a sua virulência.

A filamentação a partir de leveduras haplóides, sem ocorrer conjugação, foi observada *in vitro* em meio sólido, com redução de nitrogênio e baixo teor de água tanto em cepas $MATa$ como $MAT\alpha$, levando à formação de basidiósporos monocarióticos, ainda não encontrados na natureza (WICKES et al., 1996).

Nos casos onde foram observadas diferenças na virulência entre cepas $MAT\alpha$ e $MATa$, a $MAT\alpha$ sempre foi mais virulenta. Essas observações sugerem a prevalência das cepas $MAT\alpha$ em isolados clínicos e ambientais. Isso ocorre, em parte, devido às diferenças entre os *mating type* das cepas. A identificação dessas diferenças provavelmente proverá conhecimento de como *Cryptococcus* responde a vários tipos de estresses ambientais e como ele causa doença em humanos e animais (NIELSEN; KWON-CHUNG, 2011).

Estudos dos fatores de virulência são fundamentais para melhor compreensão da patogenicidade dos agentes da criptococose e podem indicar novas estratégias para o controle desta micose sistêmica de importância médica e veterinária.

1.3 ECOLOGIA

C. neoformans é sapróbio de diversos substratos orgânicos, frequentemente associados ao habitat de aves, rico em fontes de nitrogênio como uréia e creatinina. Condições favoráveis ao crescimento abundante deste agente levam à formação de microfocos, notadamente em centros urbanos onde prevalecem àqueles relacionados a pombos. Porém, habitat de outras espécies de aves também são encontrados contaminados, sobretudo de aves gregárias e em cativeiro (PASSONI et al., 1998).

A poeira domiciliar pode apresentar contaminação bastante significativa, chegando a 50% (PASSONI et al., 1998), com risco aumentado de infecção oportunista associada à aids para pacientes moradores em domicílios contaminados. Novo habitat natural foi descrito recentemente, relacionado à madeira em decomposição em árvores tropicais, nativas ou introduzidas no Brasil, como cassia rosa (*Cassia grandis*), cassia amarela (*Senna multijuga*), ficus (*Ficus microcarpa*), jambolão (*Sygygium jambolana*), cacauieiro (*Theobroma cacao*), cabori (*Miroxylum peruiferum*) e sibipiruna (*Caesalpinia peltophoroides*) (LAZERA et al., 1993, 1996, 2000, MONTENEGRO et al., 2000).

O habitat natural de *C. gattii* foi inicialmente associado a restos vegetais de *Eucalyptus camaldulensis* na Austrália (ELLIS; PFEIFFER, 1990), seguindo-se outros achados em eucaliptos: no Parque do Ibirapuera na cidade de São Paulo (SP) e em plantação experimental da Embrapa em Teresina (PI) (MONTENEGRO et al., 2000; NISHIKAWA et al., 2003). No entanto este conceito se ampliou e ficou evidente que esta espécie está relacionada também a árvores tropicais de diferentes gêneros no Brasil (cássia, oiti, ficus, mulungu, "guettarda") (LAZERA et al., 1998, 2000, FORTES et al., 2001) e na Colômbia (algodoeiro-da-praia) (CALLEJAS et al., 1998). Recentemente, no Canadá, *C. gattii* foi encontrado em árvores nativas como elmo, cedro, espécies de pinheiros e carvalho, mas não em eucaliptos (KIDD et al., 2004). Portanto, não há habitat ou associação específica de *C. gattii* com eucaliptos, mas sim diferentes padrões geográficos de ocorrência do fungo em madeira em decomposição (LAZERA et al., 2000, TRILLES et al., 2003, NISHIKAWA et al., 2003).

C. neoformans e *C. gattii* são distribuídos globalmente em uma variedade de habitats ambientais. Vários estudos comparando os fatores de virulência desses fungos mostram diferenças entre isolados clínicos e ambientais, comprovado por

genotipagem e análise filogenética. Pesquisas que tem como objetivo a determinação dos fatores de virulência são fundamentais, já que várias publicações demonstraram claramente que a criptococose tem agentes etiológicos complexos (LITVINTSEVA et al., 2011).

1.4 CRIPTOCOCOSE

A criptococose é uma micose de natureza sistêmica causada por *C. neoformans* e *C. gattii*, adquirida por inalação de leveduras desidratadas e/ou basidiosporos, provenientes de fontes sapróbias ambientais. Propágulos dispersados pelo ar, ao atingir os bronquíolos terminais e alvéolos pulmonares, iniciam a infecção sob a forma de leveduras no tecido hospedeiro (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992).

A infecção pulmonar primária é seguida de disseminação linfo-hematogênica, com formação de focos secundários para outros órgãos e tendência à regressão espontânea. Somente uma pequena parte dos casos evolui progressivamente, em sua maioria os de localização no sistema nervoso central (SNC). Lesões pulmonares são diagnosticadas principalmente quando associadas à lesão de SNC ou quando se apresentam em forma pseudo-tumoral. Não há antígenos disponíveis para estimar a prevalência da infecção em populações através de inquéritos com testes intradérmicos, porém, com base em detecção de anticorpos séricos específicos, sugere-se que a infecção possa ser adquirida na infância (GOLDMAN et al., 2001).

A criptococose coloca-se entre as infecções fúngicas humanas de maior letalidade, principalmente sob a forma de meningoencefalite. Apresenta-se como duas entidades distintas do ponto de vista clínico e epidemiológico: criptococose oportunística, cosmopolita, associada a condições de imunocomprometimento celular, causada predominantemente por *C. neoformans*; e criptococose primária, endêmica em áreas tropicais e subtropicais, atingindo indivíduos imunocompetentes, causada por *C. gattii* (CASADEVALL; PERFECT, 1998).

1.4.1 Epidemiologia da Criptococose

A criptococose por *C. neoformans* é de ocorrência cosmopolita, marcadora de imunodepressão. Dados do Ministério da Saúde (MS) mostram que dos 215.810 casos de aids notificados no Brasil de 1980 a 2002, 6% apresentavam criptococose (PAPPALARDO et al., 2003). Essa associação ocorre em todas as regiões brasileiras, principalmente sul, sudeste e centro-oeste (ROZENBAUM et al., 1994), sendo a infecção por HIV a condição predisponente mais comum para o desenvolvimento da criptococose. Outros fatores ou condições predisponentes do hospedeiro, tais como: uso de corticóides, lupus eritematoso sistêmico e outras doenças autoimunes, diabetes, tuberculose, alcoolismo, gravidez, transplante de órgãos sólidos, linfomas, câncer, sarcoidose e uso de drogas imunossupressoras utilizadas nestas condições, entre outros, são também condições predisponentes para o desenvolvimento da criptococose (FRIES; COX, 2011).

A criptococose por *C. gattii* predomina em regiões tropicais e subtropicais, ocorrendo na América Latina (México, Colômbia, Venezuela, Brasil, Peru, Argentina), sul dos Estados Unidos, países da África Central, Austrália, Nova Guiné e sudeste da Ásia (Índia, Tailândia, Camboja) (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992). No Brasil, estudos clínico-epidemiológicos mostraram a importância da criptococose *gattii* de SNC em crianças e adultos jovens de ambos os sexos nas regiões norte e nordeste, com letalidade de 35% a 40% (NISHIKAWA et al., 2003, CORRÊA et al., 1999).

A percepção da importância da criptococose *gattii* é crescente, se antes era vista como problema restrito a grupos populacionais rurais ou nativos, atualmente identifica-se sua ocorrência em diversas regiões onde existem condições laboratoriais para o diagnóstico da criptococose e discriminação das espécies envolvidas de *Cryptococcus*. Isso ocorre porque os padrões geográficos de ocorrência da criptococose *gattii* estão sendo melhores diagnosticados. Por outro lado, é bastante provável que mudanças climáticas, entre outros distúrbios ambientais, estejam mudando o perfil epidemiológico desta micose, como mostra a recente epidemia por sorotipo B, deflagrada na Ilha de Vancouver, Canadá, onde o clima é temperado (KIDD et al., 2004).

O emprego de técnicas de biologia molecular tem auxiliado no melhor entendimento da patogenicidade, a epidemiologia, modo de transmissão e

tratamento das infecções fúngicas e seus agentes, pois fornecem informações sobre a distribuição e o grau de relacionamento dos isolados dentro de uma população, permitindo diferenciar entre recidiva e reinfecção, bem como detectar surtos. A detecção de variação genética entre os isolados de um determinado patógeno é importante porque esta pode traduzir-se em variações fenotípicas, tais como diferenças na composição antigênica, na virulência, na sensibilidade aos agentes terapêuticos, entre outros (PFALLER, 1995, POLACHECK et al., 1992). O conhecimento da extensão da variabilidade genotípica entre isolados de um micro-organismo é essencial para a definição de sua estrutura populacional.

Nas últimas três décadas, modelos de análise molecular em eucariotos desenvolveram-se no estudo de certos fungos, tais como: *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizoccharomyces pombe*, *Neurospora crassa* e *Aspergillus nidulans*. A experiência obtida com estes fungos proporcionou um avanço considerável na biologia molecular de *C. neoformans*, atualmente utilizado como um modelo para o estudo molecular dos fungos patogênicos (KWON-CHUNG et al., 1994),

Extensa variabilidade genética é observada nas espécies *C. neoformans* e *C. gattii*, análise das sequências de nucleotídeos dos espaços intergênicos (*Intergenic Spacer*, IGS) e intragênicos (*Intragenic Spacer*, ITS) dos genes ribossomais de isolados clínicos e ambientais de diferentes regiões geográficas mostraram divergência entre isolados da mesma variedade e espécie (DIAZ et al., 2004). Análise dos perfis obtidos pelos *fingerprintings* da reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* (PCR) - *fingerprinting*) utilizando como iniciadores oligonucleotídeos obtidos da sequência central do fago M13 e análise de fragmentos de ácidos nucléicos gerados por enzimas de restrição (*Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism*, PCR-RFLP) PCR-URA5 RFLP, produziram tipos moleculares específicos para *C. neoformans* denominados VNI e VNII (sorotipo A), VNIII (sorotipo AD), VNIV (sorotipo D) e para *C. gattii* os tipos moleculares denominados VGI, VGII, VGIII e VGIV, sorotipos B e C, não sendo observada correlação entre os sorotipos e os tipos moleculares em *C. gattii*. (MEYER et al., 2003).

Boekhout e colaboradores (2001) utilizaram *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) para genotipagem e análise da variabilidade genética entre os agentes da criptococose oriundos de diferentes regiões geográficas, sorotipos e origem ecológica, para tais foram obtidos vários genótipos de AFLP: genótipo AFLP

1 e 1A (sorotipo A), AFLP 2 (sorotipo D) e AFLP 3, genótipo híbrido, que agrupou cepas de sorotipos A, D e AD. As cepas de sorotipo B apresentaram uma considerável heterogeneidade genética e agruparam-se em três padrões genotípicos: AFLP4, AFLP5 e o AFLP6. As poucas cepas de sorotipo C se agruparam no genótipo AFLP5.

Perfis obtidos por AFLP de *C. gattii* e *C. neoformans* isolados no Brasil mostraram uma diversidade genotípica principalmente dentro do genótipo AFLP 1 onde o genótipo 1B foi identificado (TRILLES et al., 2003, BARRETO DE OLIVEIRA et al., 2004).

No final da década de 1990, foi identificado um surto de criptococose na Ilha de Vancouver, no Canadá, ocorrendo 38 casos humanos no período de 1999 a 2001, sendo a maioria de indivíduos imunocompetentes, com letalidade em torno de 10%. A infecção também foi diagnosticada em 35 animais, incluindo 18 gatos, 17 cães, seis golfinhos (*Phocoenidae dalli*), dois furões e duas lhamas. A diversidade genética destes isolados foi analisada utilizando as técnicas de AFLP e PCR-*fingerprinting* com o *primer* M13. Quando comparados, estes dois métodos mostraram correspondência entre si, os sorotipos de *C. neoformans* (VNI/AFLP1, sorotipo A; VNII/AFLP 1A, sorotipo A; VNIII/AFLP3, sorotipo AD; VNIV/AFLP2, sorotipo D) e de *C. gattii* (VG1/AFLP4, sorotipo B; VGII/AFLP6, sorotipo B; VGIII/AFLP5, sorotipo B). A grande maioria dos isolados clínicos e todos os isolados ambientais eram do tipo molecular VGII/AFLP6 (KIDD et al., 2004).

Diversos métodos têm sido utilizados para a genotipagem de *C. gattii* e *C. neoformans* e sugerem estrutura populacional predominantemente clonal, mas existem também evidências de recombinação ou hibridação entre as variedades de *C. neoformans* e também entre as espécies *C. neoformans* e *C. gattii*. A ocorrência de hibridação tem consequência na reprodução biológica das espécies, como um genótipo “novo” com a virulência alterada, sobrevivência devido à mudança ambiental, ou a sensibilidade a drogas antifúngicas e a substâncias xenobióticas (BOEKHOUT et al., 2001, BOVERS et al., 2008, AMINNEJAD et al., 2012).

1.4.2 Criptococose no Brasil

Embora a taxa de mortalidade fosse reduzida de 9,7 casos a cada 100.000 habitantes em 1995 para 6,3 em 2003, a aids continua a ser a principal responsável pelo aumento de infecções oportunistas. A partir de 1998, a criptococose associada à aids teve uma redução da taxa de incidência. Em 2003 verificou-se uma taxa média de 5,5 casos a cada 100.000 habitantes, sendo de 2,3, 7,5 e 8,5 para as regiões Nordeste, Sudeste e Sul, respectivamente (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO AIDS, 2003). Em estudo prospectivo realizado no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, entre março de 1998 e novembro de 2003, de 96 pacientes com diagnóstico clínico e laboratorial de criptococose, 81,3% eram portadores de HIV. Neste estudo foram isolados *C. neoformans* de 89 pacientes e *C. gattii* de sete pacientes, demonstrando que a criptococose tem sido diagnosticada com frequência, como uma das doenças oportunistas de maior morbimortalidade nos pacientes com aids. Ainda neste estudo, *C. neoformans* foi mais frequente na faixa etária de 21 a 40 anos, enquanto que *C. gattii* ocorreu em pacientes acima de 51 anos, com exceção de um paciente portador do HIV (faixa etária de 31 a 40 anos), ocorreu também, predominância da micose no sexo masculino em todas as faixas etárias (MOREIRA et al., 2006). A criptococose é descrita geralmente em pacientes de todas as idades, mas é mais frequente em adultos jovens e pessoas de meia idade do sexo masculino (ROZENBAUM et al., 1994).

Apesar de ser mencionada a raridade de ocorrência de criptococose em crianças pré-púberes (KWON-CHUNG; BENNET, 1992), estudos realizados no Brasil mostram a prevalência em adultos jovens, tanto do sexo feminino quanto do masculino, e crianças das regiões norte e nordeste, com considerável letalidade (CAVALCANTI, 1995, SANTOS, 2000, MARTINS, 2003).

Corrêa e colaboradores (1999) observaram casos de criptococose na infância, no período de janeiro de 1992 a abril de 1998, dentre 78 pacientes com criptococose que foram internados no Hospital Universitário João de Barros Barreto, em Belém, Pará, dezenove eram crianças menores de 13 anos de idade, sendo que todos os pacientes apresentavam sinais e sintomas de envolvimento do sistema

nervoso central. A espécie do agente etiológico foi pesquisada em nove pacientes, sendo identificado *C. gattii* em todas as amostras analisadas.

Em 2003, Nishikawa e colaboradores descreveram 387 casos de criptococose em duas regiões geográficas do Brasil no período de 1987 a 1998. Este estudo demonstrou que a criptococose causada por *C. neoformans* sorotipo A associada à aids foi representada na região sudeste por 98,3% (172 de 175 pacientes) e na região nordeste por 87,5% (28 de 31 pacientes), no entanto sem associação com aids, *C. neoformans* ocorreu em 53% (8 de 15 pacientes) na região sudeste e 9,75% (três de 31 pacientes) na região nordeste. A criptococose por sorotipo B foi claramente predominante na região nordeste com 87,5% (28 de 31 pacientes sem aids) e 47% (7 de 15 pacientes sem aids) na região sudeste.

Acredita-se que a implantação de condições laboratoriais para o diagnóstico em diversas regiões e a diferenciação das espécies de *Cryptococcus* tenha favorecido o aumento da detecção da criptococose por *C. gattii*. Isso leva a concluir que os padrões geográficos da criptococose por *C. gattii* estão sendo reconhecidos (KIDD et al., 2004). Pelo descrito acima, é importante ressaltar a necessidade de estudos multicêntricos em criptococose nas regiões Norte e Nordeste, do Brasil, áreas de alta endemicidade de infecções por *C. gattii*.

1.4.3 Tratamento da Criptococose

A criptococose apresenta-se como micose de elevada carga fúngica, lesões em locais de difícil acesso ao antifúngico (SNC, nódulos pulmonares), o que acarreta frequentes recidivas e emergência de variantes resistentes aos antifúngicos utilizados.

Na década de 1970, a flucitosina (5FC) mostrou atividade contra *C. neoformans*, mas o surgimento de resistência a esta droga estimulou a utilização da forma combinada com anfotericina B (AMB), que demonstrou melhor eficácia tanto em relação ao tempo de tratamento quanto ao prognóstico. Na década de 1980, surgiram os derivados azólicos, fluconazol (FCZ) e itraconazol (ICZ), os quais demonstraram atividade antifúngica no tecido cerebral. No entanto tem sido

observado que o FCZ atravessa melhor a barreira hematoencefálica do que o ICZ (LARSEN et al., 1994, LAZERA et al., 2005).

O esquema terapêutico de escolha para a criptococose inclui a AMB associada ou não a 5FC, os azólicos FCZ e o ICZ, e mais recentemente o voriconazol (VCZ) e posaconazol (PCZ), que são azólicos de última geração.

As atuais diretrizes para o tratamento da criptococose estão baseadas em resultados de ensaio randomizado, publicado há uma década. A terapia inicial com 0,7 mg/kg por dia, associada ou não a 5FC (100 mg/dia), durante duas semanas, seguida por uma fase de consolidação de 8 semanas com FCZ (400 mg/dia) ou ICZ (400 mg/dia) (JARVIS; HARRISON, 2007).

Para o tratamento de pacientes com primeiro episódio de HIV-associado à meningite criptocócica, foi comparada a atividade de três agentes antifúngicos com doses diárias de: AMB (0,7 mg/kg/dia); AMB mais 5FC (100 mg/kg/dia); AMB mais FCZ (400mg/dia) e tripla terapia (AMB+5FC+FCZ). Este estudo permitiu concluir que nas doses diárias mencionadas a atividade fungicida mais rápida ocorreu no tratamento de AMB e 5FC combinadas, sendo que a adição de 5FC permitiu observar uma menor proporção de pacientes com recaída e líquido céfalo raquidiano (LCR) estéril em menos de duas semanas (BROUWER et al., 2004). Outros estudos demonstraram que o aumento da dose de AMB para 1mg/kg por dia, associado à dosagem de 5FC 100 mg/kg/dia, apresentou uma atividade fungicida consideravelmente maior e sem provocar efeitos colaterais significativos (BICANIC et al., 2008).

Uma estratégia encontrada para reduzir a toxicidade do tratamento convencional com AMB é o uso das formulações lipídicas desta droga. Em um teste realizado usando AMB lipossomal (AmBisome) 4 mg/kg/dia e desoxicolato de AMB 0,7 mg/kg/dia por 3 semanas, cada um seguido de FCZ 400 mg/dia por 7 semanas, foi demonstrado que apesar da eficácia ser a mesma para os dois grupos testados, a AMB lipossomal mostrou-se menos nefrotóxica (LEENDERS et al., 1997). Outros autores realizaram estudos de combinações entre o azólico FCZ e 5FC com sucesso clínico em 10 semanas no tratamento da meningite criptocócica humana (LARSEN et al., 1994) e em modelo murino (NGUYEN et al., 1997).

A literatura relata a emergência de resistência aos antifúngicos utilizados durante o tratamento. A maioria dos relatos descreve a resistência ao FCZ, que é o azólico mais utilizado, principalmente em isolados de *C. neoformans* de pacientes

com aids, após tratamento prolongado ou na profilaxia com FCZ, o que indica a necessidade de maior vigilância ao aumento da resistência ao FCZ (BALKIS et al., 2002).

A escolha do esquema terapêutico deve considerar a disponibilidade dos antifúngicos, o sítio anatômico da infecção e o estado imunológico do hospedeiro. Em casos de colonização da mucosa do trato respiratório superior, onde o fungo é isolado em cultivo a partir de escarro, porém, sem lesão pulmonar e extrapulmonar, estes devem ter acompanhamento cuidadoso. Nos pacientes imunocomprometidos a identificação de *C. neoformans* ou *C. gattii* no escarro pressupõe doença, mesmo que assintomática, sendo necessário o tratamento antifúngico, devido à possibilidade de invasão e disseminação do fungo. Observação cuidadosa deve ser assegurada em pacientes imunocompetentes com doença pulmonar isolada (LAZERA et al., 2005).

1.5 DIFERENTES GRUPOS DE AGENTES ANTIFÚNGICOS

Os agentes antifúngicos disponíveis no mercado para tratamento podem ser classificados em quatro grupos, com base em seus mecanismos moleculares de ação: alteração da função de barreira da membrana mediante interação com o ergosterol, observado em polienos como a AMB; inibição da síntese de DNA ou RNA pelos análogos de nucleosídeos, como a flucitosina; inibição da biossíntese do ergosterol, pelos inibidores da enzima 14 α -demetilase, observado nos azóis, como FCZ, VCZ, ICZ, PCZ; inibidores da esqualeno epoxidase, as alilaminas como a terbinafina; alteração de um processo vital, bloqueio da polimerização da tubulina, ao deslizamento dos microtúbulos necessário à separação dos cromossomas durante a mitose, o que resulta em bloqueio da mesma, igualmente como atua a griseofulvina (VANDEN BOSSCHE, 1997, VANDEN BOSSCHE et al., 1998).

1.5.1 Mecanismo de Ação de Azóis

Os azóis, incluindo os imidazóis: cetoconazol (KCZ) e miconazol (MCZ), e os triazóis: FCZ, VCZ, ICZ, PCZ e ravuconazol (RCZ) atuam pela inibição da lanosterol 14 α -demetilase citocromo P450-dependente, uma enzima chave na via biossintética do ergosterol, que participa na conversão em cascata do lanosterol a ergosterol. O ergosterol age como bio-regulador da fluidez e assimetria de membrana, atuando na integridade da membrana nas células fúngicas (GHANNOUM; RICE, 1999). A integridade da membrana celular requer que os esteróis nela inserida não contenham grupos C-14 metilados. Várias evidências sugerem que o alvo primário dos azóis seja a proteína heme que cocatalisa a 14 α -demetilação do ergosterol dependente da enzima citocromo P-450 (HITCHCOCK et al., 1990). A inibição da 14 α -demetilase conduz à depleção de ergosterol, o que leva à formação de membranas com estrutura e função alteradas, e acúmulo de precursores do esterol, especialmente 14 α -metil fecosterol e 14 α -metil ergosta-8,24(28)-dieno-3 β ,6 α -diol. Acúmulo do último diol foi associado à parada do crescimento em *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans* (BALKIS et al., 2002). Em *C. neoformans*, FCZ e ICZ além de inibirem a 14 α -demetilase, também afetam a redução de obtusifoliona a obtusifoliol, o que resulta no acúmulo de precursores metilados do esterol (GHANNOUM et al., 1994, VANDEN BOSSCHE et al., 1993).

A biossíntese do colesterol de mamíferos também é afetada pelos azóis no estágio da 14 α -demetilação, entretanto, a dose requerida para produzir o mesmo grau de inibição é muito maior do que aquela requerida pelos fungos (HITCHCOCK et al., 1990, VANDEN BOSSCHE et al., 1993). A biossíntese do esterol humano é mais claramente afetada pelo KCZ. Buttke e Chapman, em 1983, mostraram que o KCZ inibia a incorporação do ¹⁴C acetato no colesterol, com o acúmulo resultante de ¹⁴C lanosterol. A ressaltar, a inibição foi afetada pelas concentrações de droga obtidas terapeuticamente. Outro estudo relatou que KCZ inibia especificamente o transporte intracelular do colesterol-LDL. Some-se a este, um efeito geral sobre o movimento do colesterol. A acentuada capacidade de inibição exercida pelo KCZ sobre o colesterol de mamífero poderia explicar, em parte, a elevada toxicidade deste azol, o que limita sua utilização na clínica (BALKIS et al., 2002).

1.6.2 Mecanismo de ação de Polienos

Anfotericina B e outros poliênicos, incluindo nistatina, funcionam essencialmente pela ligação ao ergosterol (BALKIS et al., 2002). Foi observada uma associação entre sensibilidade a poliênicos e a presença de esteróis na membrana plasmática das células. Todos os organismos sensíveis aos poliênicos, por exemplo, leveduras, algas e protozoários, contêm esteróis na sua membrana externa, enquanto aqueles resistentes não o possuem (GHANNOU; RICE, 1999).

Para grandes poliênicos como a AMB foi proposto que a interação do antifúngico com os esteróis de membrana resulta na produção de poros aquosos, os quais são constituídos por um anel de oito moléculas de AMB hidrofobicamente ligadas aos esteróis de membrana, desordenando sua estrutura e polaridade (KRUIJFF; DEMEL, 1974, HOLZ, 1974). Tal desorganização aumenta a permeabilidade da membrana a prótons e cátions divalentes, conseqüentemente ocasiona morte celular (JULIANO et al., 1987). Embora a AMB mantenha maior afinidade pelo ergosterol quando comparada aos outros esteróis, a toxicidade do hospedeiro relativa a esse medicamento é primariamente o resultado de sua ligação ao colesterol (BALKIS et al., 2002).

1.5.3 Mecanismo de ação de análogos de nucleosídeos

A flucitosina (5FC) atua por interferência com o metabolismo de pirimidinas, bem como de RNA, DNA e com a síntese proteica na célula fúngica (GHANNOU; RICE, 1999, PERFECT; COX, 1999). Esta pirimidina fluorada apresenta atividade inibitória frente a várias leveduras, como *Candida* e *C. neoformans*. A 5FC penetra a célula fúngica por meio de uma citosina permease, se transformando em 5-fluorouracil (5FU) pela enzima citosina desaminase. A seguir, a 5FU é convertida em 5-fluoro-uridina-monofosfato (FUMP) pela uracil fosforribosil transferase (UPRTase). Citosina desaminase e UPRTase constituem a via de salvação das pirimidinas e não são essenciais para o crescimento sob condições normais, nas quais as pirimidinas são sintetizadas de novo (GHANNOU; RICE, 1999). A FUMP

é posteriormente fosforilada a 5-flúor-uridina-trifosfato (FUTP) e incorporado no RNA, o que provoca interrupção da síntese proteica (POLAK; SCHOLER, 1975). Ocorre que o 5FU pode ser também convertido a 5-fluoro-desoxiuridina-monofosfato, poderoso inibidor da enzima timidilato sintase, envolvida na síntese do DNA e na divisão nuclear (DIASIO et al., 1978).

1.5.4 Mecanismo de ação de Alilaminas

Além dos antifúngicos azóis, polienos e análogos de nucleosídeos, outros antifúngicos têm sido estudados, dentre eles o grupo das alilaminas, que atua na via biossintética do ergosterol, e o grupo dos inibidores da síntese de parede celular fúngica, como as equinocandinas.

No grupo das alilaminas destacam-se para uso clínico a naftifina e a terbinafina. A terbinafina bloqueia a biossíntese do ergosterol pela inibição da esqualeno epoxidase, uma enzima que catalisa uma etapa precoce na via biossintética do ergosterol: a conversão do esqualeno a epóxido de esqualeno (BALKIS et al., 2002). A ressaltar, o acúmulo resultante de esqualeno, mais do que a deficiência em ergosterol, é considerado a causa primária de morte da célula fúngica (LANYI et al., 1974, RYDER; FAVRE, 1997).

1.5.5 Mecanismo de ação de inibidores da síntese da parede celular fúngica

A parede celular dos fungos contém quatro classes de macromoléculas: proteínas da parede celular, quitina, 1,3- β -D-glucanas e 1,6- β -D-glucanas. Estes componentes não são encontrados nas células de mamíferos, suas vias de biossíntese constituem-se em alvos naturais para o desenvolvimento de drogas (BALKIS et al., 2002).

Dentre os inibidores da síntese de glucanas: aculeacinas, equinocandinas e papulacandinas, que são inibidores específicos da 1,3- β -D-glucano sintase fúngica, destacando-se o grupo das equinocandinas. As equinocandinas são lipopeptídeos

anfílicos que consistem de um núcleo peptídico cíclico, no qual duas ou mais cadeias lipídicas estão ligadas. A inibição da 1,3- β -D-glucano sintase impede a síntese de 1,3- β -D-glucana, o principal polímero estrutural da parede celular. Depleção de 1,3- β -D-glucana resulta em células osmoticamente instáveis, que sofrem eventualmente lise (BALKIS et al., 2002).

Análogos da equinocandina, a caspofungina, por exemplo, tem potente atividade anti *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* e *Pneumocystis carinii*. Em contraste, essa classe tem atividade limitada anti *C. neoformans*. Foi proposto que a inexistência de atividade seria devida à ausência de 1,3- β -D-glucana na parede celular criptocócica. Feldmesser e colaboradores, em 2000, mostraram que 1,3- β -D-glucana está presente na parede celular criptocócica, embora em menor extensão que em espécies de *Candida*. Mecanismos adicionais foram propostos pelo grupo para explicar esse fato, a eficácia relativamente baixa da caspofungina anti *C. neoformans* pode resultar da baixa atividade anti-glucano sintase nesse fungo ou provir de outros mecanismos de ação não identificados e que atuam em outros patógenos fúngicos, a exceção de *C. neoformans*.

1.6 RESISTÊNCIA A AGENTES ANTIFÚNGICOS

Em *C. neoformans*, tal como ocorre com outros agentes de infecções fúngicas, a ausência de resposta ao tratamento pode ser atribuída à resistência microbiológica aos antifúngicos, oriunda do desenvolvimento de mecanismos intrínsecos, primários e secundários de resistência ao medicamento antifúngico prescrito. A resistência intrínseca existe quando todos os membros de uma espécie são resistentes a uma determinada droga ou classe de agentes antifúngicos. Denomina-se resistência primária quando, dentro de uma espécie normalmente sensível a determinado antifúngico, encontra-se um isolado com resistência natural contra o mesmo, sem necessidade de prévio contato com a droga. Resistência secundária ou adquirida ocorre quando um isolado sensível desenvolve resistência à droga após exposição a ela (PERFECT; COX, 1999, PFALLER et al., 2005a).

A resistência intrínseca foi registrada em *C. neoformans* para os análogos da equinocandina B ou da pneumocandina. A resistência secundária em *C. neoformans*

é registrada, com especial ênfase, nos triazóis FCZ e ICZ (DAVEY et al., 1998). Relatos clínicos da década de 70 apontam o surgimento de resistência secundária em decorrência de monoterapia pela 5FC na meningite criptocócica (BLOCK, 1973).

Os mecanismos de resistência a drogas antifúngicas foram focalizados em várias áreas: entrada da droga, efluxo da droga, atividade do alvo, inativação da droga no interior das células, e efeito em outras enzimas na via do alvo que permitem contornar a necessidade do alvo (PERFECT; COX, 1999).

Em *C. neoformans*, alguns dos mecanismos de resistência foram estudados em detalhe e outros não foram nem mesmo abordados ou compreendidos. Por exemplo, poucos dados foram coletados neste patógeno para caracterizar as várias bombas de efluxo tais como as proteínas da Superfamília dos Transportadores ABC (*ATP-Binding Cassette*) e da Superfamília dos Facilitadores Principais (*Major Facilitator Superfamily*, MFS).

Thornwell e colaboradores, em 1997, identificaram um gene que parece estar relacionado a genes de bombas de proteínas de multirresistência a drogas. Algumas das cepas de *C. neoformans* resistentes a azóis poderiam ter sua resistência explicada pelo desenvolvimento de transportadores de efluxo ativo de drogas (JOSEPH-HORNE et al., 1995, VENKATESWARLU et al., 1997). Por outro lado, parece que a resistência intrínseca de *C. neoformans* aos análogos da equinocandina, apesar do fato de o gene *FKS1* codificar uma β -1,3-glucano sintase relatada como sendo o alvo primário dessa classe de agentes, é necessária à sobrevivência de *C. neoformans* (THOMPSON et al., 1999). A maior parte dos trabalhos envolvendo resistência a drogas em *C. neoformans* foram desenvolvidos no metabolismo de pirimidinas para a flucitosina ou na síntese de ergosterol, que é o alvo tanto dos poliênicos como dos azóis (PERFECT; COX, 1999).

1.6.1 Resistência aos Azóis

Micro-organismos resistentes aos azólicos podem exibir modificação na qualidade ou na quantidade da enzima alvo, acesso reduzido ao alvo ou alguma combinação destes mecanismos, não havendo relato de modificação na molécula do azólico (GHANNOUM; RICE, 1999).

Em *C. neoformans* pouco se sabe sobre os mecanismos de resistência aos azóis (PERFECT; COX, 1999, POSTERARO et al., 2003, RODERO et al., 2003, SANGUINETTI et al., 2006). Muitas linhas de evidência implicam em modificação na quantidade ou qualidade da 14 α -demetilase na expressão da resistência a agentes antifúngicos azólicos (GHANNOUM; RICE, 1999).

A superexpressão ou ligação diminuída ao sítio alvo com geração de uma enzima P450-14 α -demetilase mutada ou de expressão aumentada constitui-se em outro mecanismo de resistência ao FCZ relatado em *C. neoformans* (BERG et al., 1998). Rodero e colaboradores, em 2003, relataram a ocorrência de mutação pontual (G1855T) no gene *ERG11* em isolado clínico de *C. neoformans* resistente ao fluconazol. Esta mutação é responsável pela substituição do aminoácido glicina (G) na posição 484 pelo aminoácido serina (S), ou seja, G484S, na sequência deduzida da proteína ERG11 de *C. neoformans*. É sabido que a glicina 484 é uma molécula que faz parte do domínio de ligação heme conservado, estando em todos os citocromos P450 ERG11/Cyp51 de leveduras e fungos filamentosos. Interessante, a substituição de aminoácidos detectada nesse isolado, G484S, é equivalente àquela da proteína ERG11 de *C. albicans*, G464S, e que confere à última uma mudança na orientação do domínio de ligação heme do citocromo P450, levando a um decréscimo de ligação de azol e a um decréscimo da atividade catalítica da enzima.

O acúmulo de esteróis alternativos acompanhado de uma possível alteração fenotípica de mutação por perda de função da Δ -5,6 dessaturase, conseqüente a possíveis alterações nos genes *ERG3* e *ERG5* foi relatado como mecanismo de resistência ao FCZ em *C. neoformans* (KONTOYIANNIS et al., 2002).

A utilização de técnicas de hibridação de alta stringência para o cromossoma IV de isolados clínicos de *C. neoformans* (cepa M1-106) levou Thornewell e colaboradores, em 1997, à detecção do gene *CneMDR1*. A proteína codificada pelo gene continha 12 supostas sequências transmembranares e duas sequências consenso para sítios de ligação de ATP, motivos que definem membros da família de transportadores ABC. Um segundo gene análogo de MDR, *CneMDR2*, foi descoberto pelo citado grupo durante realização de técnica de PCR com transcriptase reversa (RT-PCR) com o emprego de cDNA. Os autores especulam a possibilidade de as proteínas CNEMDR1 e CNEMDR2 estarem envolvidas no transporte do fator *MATa* e desempenharem função na virulência de *C. neoformans*.

Ainda sobre o gene *CneMDR1*, foi relatada resistência ao FCZ por efluxo aumentado da droga em função de alteração genotípica resultante da transcrição aumentada (KONTOYANNIS; LEWIS, 2002)

Evidência considerável tem-se acumulado no sentido de sugerir que o efluxo ativo é um mecanismo importante de resistência aos antifúngicos azólicos. Estudos indicam que os fungos possuem no mínimo dois sistemas de efluxo ativo, importantes na resistência aos antifúngicos azólicos: proteínas pertencentes à MFS; que inclui grande número de permeases bacterianas e fúngicas movidas pela força motriz do gradiente eletroquímico transmembranar de prótons; e superfamília dos transportadores ABC ligados de ATP que acoplam a hidrólise de ATP ao transporte do substrato (JENKINSON, 1996, KOLACZKOWSKI; GOFFEAU, 1997, GHANNOUN; RICE, 1999).

A resistência de algumas das cepas de *C. neoformans* aos azóis pode ser explicada pelo desenvolvimento de transportadores de efluxo ativo de droga (VENKATESWARLU et al.,1997, JOSEPH-HORNE et al.,1995). De fato, Joseph-Horne e colaboradores, em 1995, identificaram cepas de *C. neoformans* que são realmente dotadas da capacidade de desenvolver resistência cruzada tanto a polienos como a azóis. Estes investigadores descobriram posteriormente que um conteúdo celular reduzido de azóis era o fator desencadeante da resistência a essa droga. Além do mais, os isolados mantiveram níveis normais de ergosterol não obstante a resistência cruzada. Estes achados dão sustentação para o desenvolvimento de eficiente(s) mecanismo(s) de transporte de efluxo de multidroga (PERFECT; COX, 1999).

Em 2003, Posteraro e colaboradores, demonstraram que a superexpressão do gene *AFR1* (*antifungal resistance1*), que codifica um transportador ABC, é causador de efluxo ativo de droga diretamente relacionado à resistência aos azóis. Sanguinetti e colaboradores (2006) investigaram em modelos de criptococose murina a possível influência da expressão de *AFR1* na resposta *in vivo* de *C. neoformans* à terapia pelo FCZ e na sua virulência *in vivo*. Grupos de camundongos foram infectados com cepa selvagem de *C. neoformans* sensível a FCZ, com a cepa mutante *afr1*, hipersensível a FCZ *in vitro* ou com cepa portadora do gene superexpresso, resistente ao FCZ *in vitro*. Após o tratamento com FCZ foi concluído que a superexpressão do gene *AFR1* em *C. neoformans* não é apenas um determinante importante na resistência *in vitro* e *in vivo* ao FCZ, a presença desse

gene aumenta também a virulência desta levedura e, especificamente, sua capacidade de sobreviver no interior de macrófagos.

1.6.2 Resistência aos análogos de nucleosídeos

A resistência a 5FC em *C. neoformans* é atribuída, na grande maioria das vezes, à perda de uma das enzimas da via de salvação das pirimidinas, resultante de mutação (WHELAN, 1987, GHANNOUM; RICE, 1999). Em 1973, Block e colaboradores, verificaram que cepas de *C. neoformans* com valores de CIM categorizados como intermediários para 5FC tinham adquirido resistência massiva a 5FC. Esta observação forneceu forte evidência da ocorrência de defeito ou mutação em proteínas ou genes da via de salvação das pirimidinas (BALKIS et al., 2002). Com efeito, foi demonstrado que mutações em qualquer um dos genes *FCY1* ou *FCY2* poderia conferir resistência a 5FC. Estes genes comportam-se como determinantes mendelianos simples e recombina-se livremente (WHELAN, 1987).

Em bases bioquímicas, a resistência a 5FC é causada por um defeito em uma das duas enzimas envolvidas na via de salvação das pirimidinas, UPRTase e citosina desaminase. A resistência nesses mutantes é o resultado da sua incapacidade de converter a 5FC em seus intermediários fluorados tóxicos, tal como 5-fluoro-uridina-trifosfato (FUTP) ou 5-fluoro-2-desoxiuridina-monofosfato (FdUMP) (BALKIS et al., 2002).

1.6.3 Resistência à Anfotericina B

Isolado de *C. neoformans* obtido de amostra clínica, pós-tratamento de meningite criptocócica, apresentou resistência à AMB durante recaída. Estudo com este isolado resistente à AMB *in vitro*, embora sensível a azóis, demonstrou que possuía um defeito na enzima 8 \rightarrow 7isomerase (KELLY et al., 1994).

Em 1995, Joseph-Horne e colaboradores, isolaram uma série de mutantes *in vitro* resistentes a AMB e que conservavam ainda a capacidade de acumular

ergosterol. Predisseram assim, a existência de três categorias de cepas resistentes à AMB: mutantes de esterol, mutantes com reação cruzada à AMB e aos azóis, e mutantes resistentes à AMB sem resistência cruzada com os azóis. Mutações na via de biossíntese dos esteróis, tais como aquelas ocorridas nas 5→6 dessaturase, têm o potencial de causar resistência cruzada a ambos, poliênicos e azóis.

O mecanismo consiste numa intercalação diminuída da droga AMB à membrana, o que resulta em alterações fenotípicas como ergosterol defectivo na membrana, além de uma enzima Δ -8→7 isomerase também defectiva. *C. neoformans* pode tornar-se secundariamente resistente à AMB tanto *in vitro* como *in vivo*. Não há relato de resistência à AMB em isolado primário de *C. neoformans* não previamente exposto a esse poliênico (PERFECT; COX, 1999).

1.6.4 Resistência à Equinocandina

C. neoformans apresenta resistência intrínseca a análogos da equinocandina, droga que atua na parede celular fúngica. FKS1, gene que codifica uma 1,3- β -D-glucano sintase da parede celular fúngica é essencial à sobrevivência de *C. neoformans*. A enzima é relatada como sendo o alvo primário dos primeiros agentes desta classe (THOMPSON et al., 1999).

Essa classe de antifúngicos tem atividade limitada no *C. neoformans*. Feldmesser e colaboradores (2000) mostraram que a 1,3- β -D-glucana está presente na parede celular criptocócica, embora em menor quantidade do que nas espécies de *Candida*. No entanto foi proposto que a falta de atividade seria devida à escassez de 1,3- β -D-glucana na parede celular criptocócica (BALKIS et al., 2002). Portanto, há pequena quantidade de 1,3- β -D-glucana, a qual por si só não responde pela ausência relativa à eficácia de equinocandinas e sugere mecanismos adicionais. Propuseram assim que a eficácia relativamente baixa da caspofungina, um análogo da equinocandina, pode resultar de atividade reduzida antiglucano sintase de *C. neoformans* ou de algum mecanismo de ação desconhecido que ocorra em outros fúngicos patógenos, à excessão de *C. neoformans*.

1.7 HETERORRESISTÊNCIA EM *Cryptococcus*

O fenômeno denominado heterorresistência consiste no rápido desenvolvimento de resistência fúngica *in vivo*, resultado da exposição prolongada à droga, esse pode selecionar clones resistentes ou conjuntos de células resistentes comuns em uma população heterogênea, a presença da droga pode influenciar a transcrição de genes de resistência dentro de uma população clonal de células. A heterorresistência foi relatada para *C. neoformans* por MONDON e colaboradores em 1999, e para *C. gattii* foi descrita em 2010 por VARMA e KWON-CHUNG. No estudo realizado por Yamazumi e colaboradores, em 2003, do total de 107 cepas clínicas de *C. neoformans* oriundas dos Estados Unidos e África com concentração inibitória mínima (CIM) de 0,25 a 32 µg/mL de FCZ, quatro cepas cresceram em meio contendo concentrações deste antifúngico de quatro a oito vezes mais que a CIM inicial. Uma quinta cepa, para a qual a CIM de FCZ foi de 32 µg/mL, cresceu em ágar contendo 64 µg/mL, por outro lado subclones de três cepas demonstraram população homogênea de células resistentes a 64 µg/mL. Foi observado também que o grau e a frequência de resistência variavam entre as cepas. No entanto a resistência apresentada pelo micro-organismo foi sensível à temperatura de incubação já que a heterorresistência foi demonstrável apenas até 30°C.

As cepas heterorresistentes demonstram ser reversíveis em passagens sucessivas em meio livre de FCZ durante um período de oito dias. Estes resultados sugerem que o fenótipo heterorresistência para o FCZ de *C. neoformans* existe em uma proporção significativa de cepas clínicas e que a resistência para FCZ pode ser desenvolvida pela seleção de clones heterorresistentes e indução pela exposição ao FCZ (MONDON et al., 1999).

Na reversão de isolados heterorresistentes de *C. neoformans* em passagens sucessivas em meio livre de FCZ, em relação a número de transferências requeridas, foi verificada presença de quatro grupos com comportamentos diferentes. Cepas heterorresistentes ≥ 32 µg/mL demonstraram ser significativamente mais resistentes a outros xenobióticos e mais virulentas em camundongos do que cepas com $CIM \leq 8,0$ µg/mL, durante o tratamento de camundongos infectados com cepas apresentando baixos níveis de heterorresistência foi verificado, após certo período de tempo, que surgiam subpopulações com níveis mais elevados de

heterorresistência e que o *AFR1*-ABC transportador, conhecido como bomba de efluxo de azólicos, não está relacionado com o mecanismo de heterorresistência (SIONOV et al., 2009).

Em estudo comparativo de hibridação genômica e PCR em tempo real, demonstrou que os *C. neoformans* sorotipo A e D adaptam-se a altas concentrações de FCZ por duplicação de cromossomos, em resposta ao estresse frente ao FCZ, também constatou que cepas que toleravam altas concentrações de FCZ apresentavam duplicação do cromossomo1, em relação a sua CIM inicial, e o aumento progressivo da concentração da droga estimulava a duplicação de vários outros cromossomos específicos. Após a remoção de FCZ, por passagens sucessivas em meio livre de FCZ, as cepas heterorresistentes voltavam ao nível de sensibilidade inicial com perda da cópia extra do cromossomo1, seguida da perda das cópias adicionais dos demais cromossomos dissômicos. A duplicação do cromossomo1 foi associada com dois genes: *ERG11*, o alvo de FCZ e *AFR1*, o transportador principal de azóis em *C. neoformans*; sugere-se assim que a heterorresistência contribui para a recaída da criptococose durante a terapia de manutenção com FCZ (SIONOV et al., 2010)

Em relação a *C. gattii* relatou-se que todas as cepas desta espécie manifestam heterorresistência para FCZ. Dentre 71 cepas, de origem clínica e ambiental, estudadas antes e após o advento dos antifúngicos azólicos, foi encontrada alta proporção de heterorresistência para *C. gattii* (86%), com heterorresistência variando entre 4 a 32 µg/mL e para *C. neoformans* (46%), cuja heterorresistência era ≥ 16 µg/mL, porém, não foi encontrada correlação significativa dentro dos tipos moleculares ou sorotipos, uma vez que isolados que apresentavam maior heterorresistência também apresentaram maior resistência a xenobióticos do que cepas com menor heterorresistência. Da mesma forma foi observado que, cepas com alta heterorresistência são mais virulentas do que aquelas com baixa heterorresistência. Todas as cepas de *C. gattii* e *C. neoformans*, sem previa exposição à FCZ, assim como as de origem ambiental também podem apresentar heterorresistência para FCZ, este mecanismo é reconhecido como intrínseco e está associado com a virulência da cepa (VARMA; KWON-CHUNG, 2010).

1.8 TESTES DE SENSIBILIDADE *IN VITRO* A ANTIFÚNGICOS

A necessidade de estudos de sensibilidade aos antifúngicos surge da emergência de infecções fúngicas sistêmicas, em hospedeiros imunocompetentes ou imunocomprometidos, hospitalizados ou não, devido à alta letalidade destas infecções e falha na resposta aos esquemas terapêuticos disponíveis, indicando resistência clínica ao tratamento e ou o aparecimento de resistência microbiana verificada pela correlação do teste de sensibilidade *in vitro* (PERFECT et al., 1998; BALKIS et al., 2002). Portanto, a disponibilidade de novas drogas, as ocorrências de falhas na terapia das infecções fúngicas e o aparecimento de cepas resistentes levaram ao desenvolvimento de métodos padronizados para a investigação da sensibilidade *in vitro* a antifúngicos.

A maioria dos testes de sensibilidade aos antifúngicos (TSA) utiliza técnicas de diluição em caldo, e são baseados no cálculo da concentração inibitória mínima (CIM), estimada pela determinação do percentual de inibição em relação a um controle de crescimento. Como existem múltiplos fatores interferentes, a padronização laboratorial desses testes de sensibilidade é condição básica para assegurar a compatibilidade das informações (SANGLARD; ODDS, 2002, CUENCA-ESTRELLA; RODRÍGUEZ-TUDELA, 2002).

Dentre os métodos de referência, se destacam aqueles recomendados pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* – CLSI (anteriormente *National Committee for Clinical Laboratory Standards* - NCCLS) dos Estados Unidos da América. Em 1992, esse comitê propôs um método de referência [M27-P] para a avaliação da sensibilidade de leveduras contra antifúngicos de uso clínico (NCCLS, 1992). O método aprovado [M27-A] foi publicado em 1997 e uma versão atualizada (M27-A2) publicada em 2002 (NCCLS, 1997, NCCLS, 2002) e, em 2008, foi publicada a última versão, M27-A3, que contempla outros antifúngicos que são atualmente utilizados no tratamento das micoses. Esse método descreve técnicas de macro e microdiluição para a determinação da CIM cujas principais características são a preparação do inóculo por espectrofotometria, uso do meio de cultura RPMI com 2% de glicose e tamponado com ácido 3-[N-morfolino] propanofulfônico (MOPS) a pH 7.0, utilização de antifúngicos na forma de pó, leitura visual dos tubos ou placas, valores por percentual de inibição e recomendações para o controle de qualidade

dos resultados. O NCCLS publicou também um protocolo M44-A que propõe a padronização da técnica de difusão em disco para leveduras frente ao FCZ. A utilização de discos de papel contendo a droga, com meio de cultivo Müller-Hinton e leitura por halo de inibição fazem parte do escopo desse documento (NCCLS, 2003).

1.8.1 Sistemas comerciais para teste de sensibilidade a antifúngico

Existem vários métodos disponíveis comercialmente que demonstram desempenho variável quando comparados com os métodos de referência. Foi aprovado pelo *Food and Drugs Administration* (FDA) dois métodos de análise, disponível comercialmente, para TSA com vários agentes antifúngicos: Etest (bioMérieux AS, Marcy l'Etoile, França) e *Sensititre YeastOne System* (Trek Diagnostic Systems Ltd, East Grinstead, England). Recentemente, a bioMérieux expandiu-se nesta área com o teste de sensibilidade para leveduras, que determina o crescimento microbiano espectrofotometricamente usando o sistema Vitek 2, processo totalmente automatizado testando a sensibilidade para 5FC, AMB, FCZ e VCZ, porém, não inclui o PCZ e equinocandinas (PFALLER et al., 2007, POSTERARO et al., 2009, BOURGEOIS et al., 2010).

O Etest é baseado numa combinação dos testes de diluição e difusão em ágar, quantifica diretamente a sensibilidade antifúngica em valores de CIM, pois consiste de um gradiente contínuo pré-definido de concentração. O Etest não é afetado pelo peso molecular, solubilidade aquosa limitada e características de difusão de diversos agentes antifúngicos.

Alguns trabalhos relatam que o Etest é uma alternativa viável ao método de referência para o TSA de leveduras, pois demonstrou uma correlação satisfatória. Os procedimentos para a realização do TSA usando as fitas de Etest são diretos, representando um método prático e de fácil execução para o laboratório clínico (CHRSSANTHOU et al., 1997, WARNOCK, 1998).

O Sistema Vitek 2 é um método comercial, totalmente automatizado, permite a identificação de leveduras e a determinação da CIM pelo TSA utilizando cartões

próprios para cada procedimento, sendo o cartão AST-YSO1 recomendado para o TSA e o crescimento microbiano é determinado espectrofotometricamente.

O Sistema Vitek 2 utiliza técnica confiável para determinar a sensibilidade de leveduras a antifúngicos, e também permite identificar resistência *in vitro* para azólicos (FCZ e VCZ) e AMB. Tem a vantagem de fornecer resultados mais rápidos e uma alternativa mais fácil para uso em laboratórios de rotina clínica do que os procedimentos envolvidos nos métodos de referência CLSI M27-A2 (PFALLER et al., 2007).

Várias publicações apresentam o Sistema Vitek 2 sendo utilizado para TSA com leveduras do gênero *Candida*, onde a confiabilidade é alta para os resultados obtidos quando comparados com o método de referência padronizado pelo CLSI M27-A3 (PFALLER et al., 2007, POSTERARO, 2009). Entretanto, para *C. neoformans* são poucas as publicações e com pequenas casuísticas, e nenhuma para *C. gattii* (CUENCA-ESTRELLA et al., 2010, CEJUDO et al., 2010, BORGHI et al., 2010).

1.8.2 Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo tem sido usada para verificar a contagem e a viabilidade celular, detecção da sensibilidade de leveduras frente a agentes antifúngicos, análise de parâmetros celulares intrínsecos (constituintes celulares que possuem auto-fluorescência) como tamanho relativo da célula, enzimas e pigmentos fotossintéticos. Para os parâmetros celulares extrínsecos como DNA, RNA, proteínas, cálcio, pH intracelular, potencial de membrana plasmática e mitocondrial, estado redox da célula e fluidez da membrana é necessário o uso de fluorocromo para fixação e marcação de tais parâmetros (RUDENSKY et al., 2005). Os fluorocromos marcam componentes celulares estruturais e funcionais, ligando-se especificamente e distribuindo-se em compartimentos celulares como núcleo, mitocôndria e vacúolo. Dentre os fluorocromos usados no teste de sensibilidade antifúngica, destaca-se iodeto de propídeo (IP), que marca a molécula de DNA e emite fluorescência. *Acridine Orange* (AO) também é utilizado em testes de

sensibilidade, o qual interage com DNA por intercalação e no RNA por atração eletrostática (DARZYNKIEWICZ, 1990, RUDENSKY et al., 2005).

Para a análise dos resultados dos parâmetros e da sensibilidade antifúngica é usado um software específico que permite a observação de curvas de distribuição, histogramas mono-paramétricos e bi-paramétricos, além de dados com representação tri-dimensional onde o eixo XX representa a intensidade do parâmetro e o eixo YY o número de partículas analisadas.

Estudos recentes destacaram que a citometria de fluxo, combinada com o método M27-A2 e uso de fluorocromos, é uma alternativa importante na análise da CIM e a determinação da sensibilidade de leveduras frente a agentes antifúngicos, provando ser uma técnica com a qual se obtém bons resultados em menor tempo, em comparação com a metodologia convencional (DORNELAS, 2006, VALE-SILVA; BUCHTA, 2006).

1.9 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA E A REDE NACIONAL DE MONITORAMENTO DA RESISTÊNCIA MICROBIANA EM SERVIÇOS DE SAÚDE

A Lei nº 9.782, de 27 de janeiro de 1999 (BRASIL, 1999), definiu o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária e criou a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), constituindo-a com responsabilidade social de promover e proteger a saúde da população, intervir nos riscos decorrentes da produção e da comercialização de produtos e serviços sujeitos à vigilância sanitária, inclusive dos ambientes, dos processos, dos insumos e das tecnologias a eles relacionados, em ação coordenada com os estados, os municípios e o Distrito Federal, de acordo com os princípios do Sistema Único de Saúde (SUS), visando à proteção e a promoção da saúde da população, conforme preceitua o artigo 196 da Constituição Federal: “A saúde é um direito de todos e dever do Estado, garantido mediante políticas sociais e econômicas que visem à redução do risco de doenças e outros agravos e ao acesso universal e igualitário às ações e serviços para sua promoção, proteção e recuperação” (BRASIL, 1988).

Além disso, a ANVISA exerce o controle de portos, aeroportos e fronteiras e a interlocução junto ao Ministério das Relações Exteriores e instituições estrangeiras para tratar de assuntos internacionais na área de vigilância sanitária.

No ano de 2002, a ANVISA reuniu um grupo de especialistas com o propósito de estabelecer diretrizes para a prevenção e o controle da resistência microbiana e o uso racional de antimicrobianos, o que levou a formação do Grupo de Trabalho sobre Uso Racional de Antimicrobianos (GT/URA). Estas diretrizes focaram especificamente pacientes e comunidade em geral, profissionais de saúde, estabelecimentos assistências, serviços de saúde, laboratórios de microbiologia, utilização de antimicrobianos em veterinária, uso de antimicrobianos na agricultura e órgãos reguladores. O resultado deste trabalho norteou várias ações desenvolvidas pela Gerência de Investigação e Prevenção das Infecções e dos Eventos Adversos (GIPEA) da ANVISA, o que foi fundamental para apontar a necessidade de implantação de uma rede de monitoramento da resistência microbiana (ANVISA, 2007).

Em 2004 a ANVISA firmou um termo de cooperação com a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), em parceria com a Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública (CGLAB/SVS/MS), a fim de desenvolver o Projeto “Monitoramento e Prevenção da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde”. Esse teve como objetivo geral aumentar a efetividade da assistência à Saúde Pública, por meio do uso racional de antimicrobianos e da detecção precoce, prevenção, controle da emergência e disseminação da resistência microbiana em serviços de saúde no Brasil. Dentre os objetivos específicos, destaca-se a formação da Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde (Rede RM) (ANVISA; OPAS, 2005).

Para o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, o Monitoramento e Prevenção da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde, seria um instrumento fundamental na definição de políticas prioritárias para a redução da resistência microbiana, pois proporcionaria: a capacitação de profissionais de laboratórios de microbiologia, treinamento de prescritores em uso racional de antimicrobianos, atualização da legislação sobre controle de infecção em serviços de saúde, definição de critérios para registro de novos medicamentos antimicrobianos, proibição da comercialização de produtos com associações de dois ou mais antimicrobianos com outras classes de medicamentos, quando não existe

comprovação científica de benefício, e controle rigoroso sobre a publicidade e promoção de medicamentos contendo antimicrobianos (ANVISA; OPAS, 2005).

Apesar da importância destes fatos, dados nacionais sobre resistência microbiana, assim como sobre o uso de antimicrobianos, ainda são escassos, com acurácia comprometida, principalmente devido à deficiência de padronização de métodos laboratoriais. Pacientes com infecções causadas por micro-organismos resistentes apresentam aumento expressivo na morbidade e na mortalidade, com maior custo no tratamento e necessidade de internação prolongada, causando impactos sociais diversos, como aqueles decorrentes do sofrimento de pacientes e familiares. Além disso, os estudos brasileiros são direcionados, na maioria das vezes, a um único patógeno. Em vista de tal complexidade, impõe-se a aplicação de medidas necessárias para limitar a emergência e a disseminação da resistência microbiana, por meio da padronização de método para sua identificação e seu monitoramento e do uso prudente de antimicrobianos (ANVISA, 2006, 2008).

Em 2005, a ANVISA em parceria com a OPAS e a CGLAB/SVS/MS implantou a Rede de Monitoramento e Controle da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde no Brasil, através do projeto desenvolvido no âmbito do Termo de Cooperação 37 (TC 37) com duração de dois anos (2006/2007) (ANVISA; OPAS, 2009).

Várias atividades de formação foram realizadas através de seminários, cursos de capacitação profissional durante o ano de 2006, para laboratório das instituições hospitalares participantes da RM e Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACENs), como por exemplo, o curso de Gerenciamento de Informação sobre Resistência Microbiana, curso básico de Uso Racional de Antimicrobianos e Medidas de Prevenção e Controle da Disseminação de Resistência Microbiana, além da Análise das Informações da resistência produzida pela rede de monitoramento (ANVISA; OPAS, 2009).

A ANVISA disponibilizou o manual do CLSI e suas atualizações, por cinco anos. Esse manual de padronização do instituto norte-americano é dividido em cinco módulos e verifica a sensibilidade de micro-organismos a diversos agentes antimicrobianos. O acesso gratuito ao manual diminui o custo laboratorial e possibilita resultados muito mais precisos, pois padroniza as técnicas de pesquisa e análise, permitindo estudos inter-laboratoriais de diferentes regiões geográficas do

Brasil e com outros países, além de correlacionar com os dados disponíveis na literatura internacional (ANVISA; OPAS, 2009).

O Ministério da Saúde instituiu pela Portaria nº 1.133/GM de 6 de julho de 2005 (BRASIL, 2005), o Comitê Técnico Assessor para Uso Racional de Antimicrobiano e Resistência Microbiana (CURAREM). Tratava-se de um comitê com caráter consultivo sobre aspectos técnicos e científicos necessários à definição de diretrizes nacionais para a vigilância, prevenção e controle da disseminação da resistência microbiana, comunitária e hospitalar, bem como para o acompanhamento e avaliação das ações desenvolvidas pelo Ministério da Saúde.

A transmissão de dados pelos hospitais participantes da Rede RM foi iniciada em agosto de 2006, apresentando à sociedade os primeiros dados sobre o perfil de sensibilidade dos principais patógenos causadores das infecções hospitalares. A Rede RM completou em julho de 2007 um ano de notificação dos dados de perfil de sensibilidade. Este período foi de extrema importância para a consolidação da Rede. Durante este ano inicial, os serviços de saúde incorporaram gradativamente a rotina de notificação mensal dos dados, venceram obstáculos existentes para transmissão dos relatórios e corrigiram pequenos desvios na utilização dos critérios da Rede. Neste contexto, as análises dos dados ainda eram globais, e não refletiam as características regionais da resistência microbiana, sendo os resultados produto de uma Rede em construção e constante aprimoramento (ANVISA; OPAS, 2009).

As notificações de ocorrência de infecções primárias da corrente sanguínea (IPCS) em pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) deviam ser realizadas sistematicamente por via eletrônica. Durante o período de julho de 2006 a junho de 2008, 97 hospitais notificaram a ocorrência de IPCS e o perfil de sensibilidade dos micro-organismos prioritários isolados. A Rede RM recebeu número pouco expressivo de notificações para *Candida albicans* e as não *albicans*, grupo de micro-organismos prioritário, quanto à sensibilidade frente ao fluconazol, o que impossibilitou a interpretação e apresentação dos resultados referente a este grupo de fungos (ANVISA; OPAS, 2009).

Em junho de 2009, foi instituída a Comissão de Assessoria Técnica em Resistência Microbiana em Serviços de Saúde (CATREM) pela Portaria nº. 629, de 8 de junho de 2009 (BRASIL, 2009) com o objetivo de assessorar a Diretoria Colegiada da ANVISA e o CURAREM na elaboração de normas e medidas para o

monitoramento, controle e prevenção da resistência microbiana em serviços de saúde no Brasil.

Ao se consultar o Boletim Informativo da Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde, deve-se estar atento aos resultados apresentados, pois é necessário considerar que estes dados de perfil de sensibilidade se referem a micro-organismos isolados de pacientes com infecção primária da corrente sanguínea, internados em UTI. Nestes ambientes, o risco de patógenos multirresistentes é maior, devido à gravidade dos pacientes e ao número elevado de procedimentos invasivos. Além disso, lembrar que a Rede RM incluiu, nesta primeira etapa de trabalho, informações procedentes de Hospitais da Rede Sentinela, que em sua maioria são hospitais de grande porte e complexidade (ANVISA, 2009).

Desta forma, estes dados refletem a realidade desta população, que possivelmente difere da realidade encontrada em hospitais de menor porte e em outras unidades de internação. O acompanhamento do perfil de sensibilidade dos micro-organismos mais relevantes em cada hospital continua sendo o melhor instrumento para o controle e a prevenção da resistência microbiana em cada serviço de saúde.

Numa iniciativa pioneira, a Rede RM foi capaz de reunir profissionais de múltiplas áreas de serviços de saúde: laboratórios de microbiologia e Comissões de Controle de Infecção Hospitalar, Laboratórios de Saúde Pública, Vigilâncias Sanitárias e diversos colaboradores, onde todos iriam trabalhar de forma integrada, com métodos padronizados, controle de qualidade, análise e divulgação dos dados (ANVISA; OPAS, 2009).

A Rede RM era um projeto piloto que visava permitir a construção de indicadores sobre o problema da resistência microbiana e futuramente serviria de base para a construção de uma política nacional para o controle da resistência microbiana, direcionando ações que pudessem ser pactuadas com estados e municípios. Além disso, através de um banco de dados nacional, seria capaz de gerar dados epidemiológicos relacionados às infecções por micro-organismos resistentes, sendo inovadora em termos de monitoramento, pois para combater e controlar essa resistência, é preciso mapear o perfil de sensibilidade dos micro-organismos que circulam no ambiente hospitalar e na população em geral, ou seja,

analisar o efeito do medicamento sobre esses micro-organismos circulantes em processos infecciosos (ANVISA; OPAS, 2005, ANVISA, 2007).

Está em processo de implantação a Rede Criptococose Brasil (RCB), com a criação de uma rede integrada de pesquisa multidisciplinar, que se faz necessária porque a Criptococose não é notificada, portanto, sua magnitude é desconhecida, não tem vigilância, seu diagnóstico é tardio, resultando em elevada letalidade e poucos casos reconhecidos em estágio inicial, pulmonar ou de outra localização fora do SNC.

A RCB tem como objetivo principal descrever o perfil clínico-epidemiológico e evolução da criptococose, abrangendo a criptococose primária e oportunística no Brasil e tem como um dos objetivos específicos monitorar o perfil de sensibilidade *in vitro* aos antifúngicos dos agentes etiológicos da criptococose.

Os principais órgãos envolvidos na constituição e operacionalização da RCB são: Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC/FIOCRUZ); Laboratório de Referência Nacional em Micoses Sistêmicas (LRNMS/IPEC); Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS/MS) e Centro de Informações Estratégicas em Vigilância em Saúde (CIEVS/FIOCRUZ), formando um conjunto com os participantes associados.

1.10 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA E O INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE

A Medida Provisória nº 2.190-34, de 23 de agosto de 2001 (BRASIL, 2001), alterou dispositivos da Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999 (BRASIL, 1999). Assim, consta no Art. 3º que o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) ficaria subordinado tecnicamente à ANVISA e administrativamente à Fundação Oswaldo Cruz.

Entre as diversas atividades desenvolvidas no INCQS, único laboratório federal de controle de qualidade do país, as atividades desenvolvidas nos setores responsáveis pela Coleção de Micro-organismos de Referência em Vigilância Sanitária (CMRVS) têm prioridade dentre as principais estratégias estabelecidas institucionalmente. Esta coleção está registrada no *World Federation for Culture*

Collections (WFCC) sob o número WDCM-575, e atua em estreita cooperação com a ANVISA, fornecendo micro-organismos que são cada vez mais exigidos nos ensaios preconizados pelos Compêndios Oficiais e literatura internacional para o controle da qualidade de produtos, nas áreas da saúde e da biotecnologia (INCQS, 1988). O INCQS, através de sua coleção, participa da Rede RM fornecendo os micro-organismos de referência utilizados como controle interno nos testes de sensibilidade aos antimicrobianos, possibilitando a obtenção de resultados mais confiáveis e com qualidade (ANVISA, 2008).

Coleções de Culturas são centros de preservação e de recursos genéticos e tem a função de manter organismos relevantes para estudos científicos e aplicações tecnológicas, onde as gerações futuras poderão buscar material para o desenvolvimento de novos conhecimentos. Além das cepas de referência, o INCQS mantém uma Coleção de Micro-organismos de Interesse em Saúde Pública e Biotecnologia (Coleção de Pesquisa) constituída por isolados de amostras clínicas e ambientais, destinados ao desenvolvimento de projetos de pesquisa, visando estudos taxonômicos, epidemiológicos e ambientais, advindos da própria pesquisa e colaboração entre o INCQS e outras instituições que depositam tais micro-organismos nesta coleção. O acervo é constituído de aproximadamente 1.000 cepas, entre elas, *C. neoformans* e *C. gattii*, tanto de origem clínica como ambiental, provenientes de todas as regiões geográficas do Brasil. Desde 1987, o Setor de Fungos de Referência do INCQS vem trabalhando em colaboração com o Laboratório de Micologia do IPEC.

1.11 PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS DE AGENTES DA CRIPTOCOCOSE NO BRASIL

A literatura tem relatado a emergência de resistência aos antifúngicos utilizados durante o tratamento da criptococose, descrevendo a resistência ao FCZ, que é o azólico mais utilizado no tratamento prolongado e na profilaxia desta micose, o que ressalta a escolha de seus agentes, *C. gattii* e *C. neoformans*, em estudos envolvendo testes de sensibilidade aos antifúngicos prescritos na clínica médica (PFALLER et al., 2011).

No Brasil, os estudos de sensibilidade a antifúngicos de *C. neoformans* foram realizados, na maioria, com cepas de origem clínica, em área geográfica limitada, e os estudos com cepas de origem ambiental foram com pequena amostragem (FRANZOT; HAMDAN, 1996, ALVES et al., 2001, CALVO et al., 2001, FERNANDES et al., 2003, MORAES et al., 2003, DELGADO et al., 2005, SOARES et al., 2005, SOUZA et al., 2005, DIAS et al., 2006).

A resistência a FCZ foi relatada por Fernandes e colaboradores (2003), em estudo realizado no Hospital de Doenças Tropicais de Goiânia em Goiás (GO) com 60 cepas clínicas, obtidas de pacientes HIV positivos, sendo relatada uma cepa de *C. neoformans* (1/56 - 1,78%) com CIM de 256 µg/mL e três cepas de *C. gattii* (3/4 - 75%) com CIM de 24 a 256 µg/mL. Em outro estudo, uma cepa ambiental de *C. neoformans*, obtida de excreta de pombo em área urbana na cidade de Santos (SP), foi relatada com resistência à FCZ (SOARES et al., 2005).

Estudos relativos à *C. gattii* são incipientes, sendo a maior casuística mundial conhecida com 57 cepas do Brasil, onde é relatada a resistência à FCZ e à AMB em *C. gattii* (TRILLES et al., 2004), considerando o período de 1996 a 2006.

De 2007 a abril de 2012, houve um aumento de publicações envolvendo cepas clínicas de *C. neoformans* e *C. gattii* das regiões Sul e Sudeste (SP, MG e RJ), e Nordeste (BA e PI) do Brasil e a realização de TSA, principalmente de cepas de *C. gattii*, sendo descrita resistência à FCZ em cepas de origem clínica e ambiental (GOMEZ-LOPEZ et al., 2008, MENDES et al., 2010, TRILLES et al., 2012, SILVA et al., 2012, MATOS et al., 2012).

Em 2006, com a implantação da Rede RM, os LACENs estavam em treinamento, com foco nos procedimentos estabelecidos pelo CLSI para TSA *in vitro*. A capacitação dos laboratórios, formação de recursos humanos e atualizações do CLSI disponíveis no site da ANVISA, devem ter contribuído para o aumento de publicações sobre o tema. Porém, quando comparada com a literatura internacional, a amostragem nacional ainda é pequena (PFALLER et al., 2011).

Estudo envolvendo cepas clínicas de *C. neoformans* e *C. gattii*, da região Amazônica, realizado na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, em Manaus foi publicado em 2012, para TSA utilizou-se o método de disco difusão em ágar, usando o procedimento padronizado pelo CLSI M44-A (DA SILVA et al., 2012), contribuindo para o conhecimento da sensibilidade a antifúngicos dos agentes da criptococose em uma área estratégica para o Brasil.

1.12 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

Estudos utilizando TSA são importantes, pois fornecem dados relativos ao perfil de sensibilidade de fungos envolvidos em processos infecciosos, identificando resistência entre os diferentes agentes infecciosos e a sua incidência. No Brasil não existem dados efetivos da ocorrência da criptococose, por ser uma doença de notificação não compulsória e sendo a frequência de resistência aos antifúngicos subestimada, assim como em outras infecções fúngicas.

A Coleção de Culturas do INCQS e a Coleção de Fungos Patogênicos do Laboratório de Micologia do IPEC, que constituem Coleções de Culturas da Fiocruz, tem preservado em seus acervos um número significativo de cepas dos agentes da criptococose oriundas da região norte do Brasil (AM, PA, RR). Até o momento é desconhecido o perfil de sensibilidade a antifúngicos de cepas clínicas e ambientais de *C. neoformans* e *C. gattii* oriundos dessa região, justificando a realização deste trabalho.

A vigilância contínua e minuciosa na detecção do aparecimento de resistência aos antifúngicos utilizados na terapia da criptococose se faz premente. A importância global resultante do caráter oportunista de *C. neoformans* e devido o aumento do uso de antifúngicos nos pacientes imunocomprometidos, a falha terapêutica pode ser decorrente da resistência microbiana.

São fundamentais os estudos e pesquisas que contemplam a detecção de resistência microbiana, o uso racional de antimicrobianos, estratégia de prevenção e de controle específico. Visto que, contribuirão para ampliar a relação de micro-organismos que compõem o grupo prioritário, atualmente contemplado, na Rede RM.

Os fatores de virulência são fundamentais para que os micro-organismos, *C. neoformans* e *C. gattii*, sejam capazes de causar doenças no homem e animais. Isso ocorre devido a sua particular capacidade de sobreviver e multiplicar-se em tais hospedeiros, podendo assim interferir na resposta terapêutica. Por isso é importante correlacionar os fatores de virulência com o perfil de sensibilidade a antifúngicos.

A utilização de métodos moleculares são importantes para o estudo da diversidade genética em cepas de *C. neoformans* e *C. gattii*. O AFLP é um método de tipagem multilocus, de aplicabilidade universal, com alto poder discriminatório que

produz um grande número de caracteres genéticos espécie-específicos. Esse método também gera marcadores co-dominantes, permitindo segregar cepas geneticamente relacionadas, que poderão ser utilizados como marcadores moleculares vinculados a virulência (VOS et al., 1995, MUELLER; WOLFENBARGER, 1999). Perfis moleculares obtidos por AFLP permitirão conhecer os genótipos de *C. neoformans* e *C. gattii*, definindo sua distribuição no Brasil em infecções humanas e animais e no ambiente.

A compilação dos resultados obtidos neste estudo poderá proporcionar o desenvolvimento de políticas relativas à vigilância na prevenção e monitoramento do aparecimento de resistência aos antifúngicos, e poderão orientar a seleção do antifúngico a ser usado na profilaxia em pacientes imunocomprometidos, resultando em programas de controles baseados em dados documentados em publicações científicas.

A sensibilidade aos antifúngicos, fatores de virulência e os perfis moleculares servirão como base descritiva, gerando indicadores para o estabelecimento de políticas relativas a vigilância sanitária e epidemiológica da criptococose e seus agentes nas diferentes regiões geográficas do Brasil. Contribuirá para a expansão na vigilância internacional relacionada à sensibilidade a antifúngicos utilizados na criptococose, visto que os dados publicados são relativos a estudos com casuística pequena, isolados de regiões geográficas limitadas e em curto período de tempo.

2. OBJETIVOS

Estudar o perfil de sensibilidade aos antifúngicos, expressão fenotípica de fatores de virulência e diversidade genética por AFLP dos agentes da criptococose, através de um estudo retrospectivo de cepas de *C. neoformans* e *C. gattii*, de origem clínica e ambiental preservadas na Coleção de Culturas do INCQS e na Coleção de Fungos Patogênicos do Laboratório de Micologia do IPEC.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Verificar o perfil de sensibilidade aos antifúngicos anfotericina B, flucitocina, itraconazol, fluconazol e voriconazol;
2. Analisar a concordância entre as metodologias: CLSI, procedimento padronizado para microdiluição em caldo, com os métodos disponíveis comercialmente Etest e Vitek 2 nos testes de sensibilidade aos antifúngicos;
3. Verificar a expressão fenotípica dos fatores de virulência: termotolerância, produção de cápsula, síntese de melanina e fosfolipase nas cepas utilizadas no TSA;
4. Analisar a diversidade genética inter e intra-específica, utilizando os perfis obtidos por AFLP;
5. Analisar e correlacionar o perfil genotípico de *C. neoformans* e *C. gattii* quanto à origem clínica ou ambiental, fontes de isolamento, regiões geográficas, gênero do paciente e infecção por HIV.

3 METODOLOGIA

3.1 MICRO-ORGANISMOS

Foram estudadas 161 cepas de *C. neoformans*, sendo 143 de origem clínica e 18 de origem ambiental, e 98 cepas de *C. gattii*, sendo 88 de origem clínica e 10 de origem ambiental, num total de 259 cepas. Essas fazem parte do acervo da Coleção de Culturas do INCQS e da Coleção de Fungos Patogênicos do Laboratório de Micologia do IPEC da Fundação Oswaldo Cruz (INCQS-IPEC/FIOCRUZ). As cepas clínicas foram oriundas de líquido, sangue, secreções do trato respiratório, urina, entre outros fluidos orgânicos e as de origem ambiental de excrementos de aves, poeira de ambiente domiciliar e de madeira em decomposição no interior de oco de árvores vivas.

Todas as cepas utilizadas neste estudo foram anteriormente identificadas pelas observações das características morfológicas coloniais, celulares, fisiológicas e bioquímicas quando foram depositadas nas coleções de culturas (KWON-CHUNG, 1998). As cepas foram preservadas por liófilização ou crio-preservadas a -20°C em *skim milk* (Difco Laboratories) a 20% e ou -70°C em glicerol (Merck, Alemanha) a 15%.

Outros fungos foram utilizados como referência, oriundos da *American Type Culture Collection* (ATCC): *C. neoformans* INCQS 40123 (ATCC 28957), INCQS 40124 (ATCC 34868), INCQS 40044 (ATCC 32045), INCQS 40142 (ATCC 28958), INCQS 40150 (ATCC 48184), INCQS 40282 (ATCC 90112), INCQS 40283 (ATCC 90113); *C. gattii* INCQS 40122 (ATCC 24065), INCQS 40141 (ATCC 56990), INCQS 40113 (ATCC 32269), INCQS 40143 (ATCC 24066); *Candida parapsilosis* INCQS 40038 (ATCC 22019); *Candida krusei* INCQS 40147 (ATCC 6258); *Cryptococcus laurentii* INCQS 40043 (ATCC 18803); *Cryptococcus albidus* INCQS 40077 (ATCC 10666); *Cryptococcus humicola* INCQS 40173 (ATCC 9949) e *Cryptococcus podzolicus* INCQS 40232 (CBS 7717), além de 18 cepas da *Centraalbureau voor Schimmelcultures* (CBS) que foram usadas como padrão no AFLP.

A recuperação das cepas liofilizadas foi realizada pela hidratação do líófilo com água purificada estéril, por trinta minutos em repouso, à temperatura de aproximadamente 25°C, e para as cepas crio-preservados a -20°C ou -70°C, os criotubos foram colocados na estufa a 37°C por 30 minutos. Após o tempo de hidratação ou descongelamento, cada micro-organismo foi inoculado em placas de Petri contendo os meios de extrato de levedura, extrato de malte e ágar (YMA, Difco Laboratories) e de ágar semente de Níger (*Guizotia abyssinica*) (ASN).

3.2 EXPRESSÃO FENOTÍPICA DOS FATORES DE VIRULÊNCIA

3.2.1 Termotolerância

Para a verificação de termotolerância foram selecionadas 238 cepas, sendo 146 de *C. neoformans* e 92 de *C. gattii* provenientes dos estados do Amazonas (AM), Pará (PA), Roraima (RR), Piauí (PI), Ceará (CE), Rio de Janeiro (RJ), Paraná (PR) e Rio Grande do Sul (RS).

A partir de um cultivo em extrato de levedura, peptona, dextrose e ágar (YPDA, Difco Laboratories) de 48h a 25°C foi preparada uma suspensão com turvação ajustada ao padrão dois da escala de McFarland (6×10^8 UFC/mL). A termotolerância foi observada pela inoculação de 10 µL da suspensão em meio líquido de extrato de levedura, peptona, dextrose (YPDB, Difco Laboratories), distribuído em tubos de ensaio com tampa de rosca de 200 x 130 mm com 5 mL de meio e incubados à temperatura de 25°C, 36°C e 40°C por 72h. Para cada micro-organismo foram usados três tubos contendo YPDB. Uma placa de Petri com YPDA também foi inoculada com 5 µL da suspensão e incubada a 40°C por 72h (KWON-CHUNG, 1998).

O crescimento nas diferentes temperaturas foi observado pela formação de sedimento no fundo do tubo de cultura e também pela observação de turvação do meio pelo crescimento do micro-organismo. Foi realizada a classificação dessa turvação, após agitação vigorosa do cultivo, utilizando-se o cartão de Wickerham, que é um cartão branco de 7,5 cm de altura por 12,5 cm de comprimento, contendo

linhas de 0,5 mm de espessura feitas com tinta nanquim e 0,5 cm de distância uma da outra. O critério de turvação foi estabelecido em 1(+), 2(+), 3(+) para o crescimento do micro-organismo ou (-) ausência de crescimento. Após agitação dos tubos, se o crescimento no tubo obliterou totalmente as linhas, foi considerado 3(+); se as linhas apareceram como bandas difusas, o crescimento foi considerado 2(+); mas se as linhas foram distinguíveis como tal e suas bordas não foram diferenciadas, o crescimento foi considerado 1(+) (KWON-CHUNG, 1998).

As placas de Petri com YPDA foram observadas quanto à presença ou ausência de crescimento. Todos os tubos e placas com ausência de crescimento foram reincubados a 25°C por 24 à 48h para observação da presença de crescimento. Após o período de reincubação, o crescimento foi observado pela turvação do meio. Dentre todos os tubos que apresentaram crescimento foi retirada uma alicota, com auxílio de alça de inoculação, e estriada em ASN para a comprovação da pureza.

3.2.2 Síntese de melanina

Para a produção de melanina foram selecionadas 238 cepas, sendo 92 de *C. gattii* e 146 de *C. neoformans*, provenientes dos estados AM, PA, RR, PI, CE, RJ, PR e RS.

Cada cepa foi inoculada em estrias na superfície do meio ASN e as placas foram incubadas a 25°C por cinco dias. A produção de melanina foi observada pela presença de colônias marrom escuro fenol-oxidase positiva (KWON-CHUNG, 1998).

As espécies *Cryptococcus laurentii* INCQS 40043, *Cryptococcus albidus* INCQS 40077, *Cryptococcus humicola* INCQS 40173 e *Cryptococcus podzolicus* INCQS 40232, não produtoras deste pigmento foram usadas como controle do meio ASN.

3.2.3 Produção de fosfolipase extracelular

Para a produção de fosfolipase extracelular foram selecionadas 176 cepas, sendo 109 de *C. neoformans* e 67 de *C. gattii* provenientes dos estados do AM, PA e RR e uma cepa de *C. neoformans* controle INCQS 40283.

A produção de fosfolipase extracelular foi verificada como descrito por Price e colaboradores (1982), utilizando-se o meio ágar Sabouraud com glicose 2% (SDA 2%) (Merck, Alemanha) acrescido de cloreto de sódio 1M, cloreto de cálcio 0,005M e gema de ovo a 8% (v/v). A gema foi adicionada ao meio já esterilizado (920 mL de meio para 80 mL de gema), a uma temperatura de aproximadamente 60°C, sendo o meio homogeneizado delicadamente e distribuído em placas de Petri estéreis.

Para observação da produção de fosfolipase extracelular, a partir de um cultivo em SDA 2% de 48h a 25°C foi preparada uma suspensão com turvação densa. Com auxílio de alça de inoculação, 10 µL dessa suspensão foram inoculados sobre a superfície do meio contendo gema de ovo. Em cada placa foram inoculados três pontos equidistantes da mesma cepa. As placas foram incubadas a 35°C por seis dias.

A produção de fosfolipase extracelular foi verificada pela presença de halo esbranquiçado ao redor da colônia, resultante da degradação dos fosfolipídios presentes na gema de ovo pela enzima, levando à formação do complexo entre fosfolipídios e o cálcio presente no meio. Ausência da formação do halo corresponde a resultado negativo. Nos positivos, o diâmetro do halo foi medido com régua milimetrada para cálculo de Pz segundo a fórmula: $Pz = dc/dcp$, onde dc = o diâmetro da colônia (mm) e dcp = o diâmetro da colônia mais a zona de precipitação (mm). Quanto menor o Pz, maior a atividade enzimática do isolado. Os resultados foram representados por cruces, quando o valor Pz for igual a 1,0, ausência de atividade enzimática representado por zero "0"; Pz menor que 1,0 e maior que 0,7 significa atividade enzimática

baixa (+); o valor de Pz entre 0,69 e 0,4 significa atividade enzimática moderada (++) e Pz menor que 0,399 significa atividade enzimática alta (+++). Utilizou-se como controle positivo uma cepa de *C. neoformans* que teve um Pz menor que 0,399, observado entre as cepas estudadas.

3.2.4 Indução de cápsula

A indução de cápsula foi realizada em 100 cepas oriundas do PA, sendo 58 cepas clínicas de *C. neoformans* e 42 cepas clínicas de *C. gattii*. A partir de um cultivo em SDA 2% de 48h a 25°C foi preparada uma suspensão com turvação ajustada ao padrão 0,5 da escala de McFarland (6×10^6 UFC/mL). A produção de cápsula foi induzida pela inoculação de 0,1 mL da suspensão em caldo Sabouraud com glicose a 2% (SDB 2%) (Merck, Alemanha), pH 7,0, diluído 1:10 com tampão ácido morfolino propanosulfônico 50mM (MOPS, Sigma Co., EUA), pH 7,3. Foram utilizados tubos de ensaio com tampa de rosca de 200 x 130 mm com 5 mL do meio de indução e tubos com meio controle contendo caldo SDB 2%. Os tubos foram incubados a 36°C por 48h, sem agitação, como descrito por Zaragoza e colaboradores (2004).

Após o período de incubação os tubos foram agitados e 10 µL da cultura foram colocados sobre uma lâmina microscópica com uma gota de nigrosina a 1% em glicerol, cobriu-se com lamínula de vidro transparente para observação ao microscópio óptico Olympus, modelo BH2, de campo claro e aumento de 400X. A cápsula foi evidenciada pela formação de um halo transparente ao redor da célula em contraste ao fundo escuro da preparação. A espessura da cápsula foi medida como: a distância entre o limite da célula (parede celular) e da borda transparente produzida pela nigrosina, com auxílio de uma ocular micrométrica.

3.3 TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS

Para o estudo do perfil de sensibilidade aos antifúngicos foram selecionadas 176 cepas, sendo 109 de *C. neoformans* e 67 de *C. gattii* provenientes dos estados do AM, PA e RR.

3.3.1 Método de microdiluição em caldo

O TSA para leveduras foi realizado pelo Método de Referência para Microdiluição em Caldo preconizado pelo CLSI - M27-A3 (2008).

3.3.1.1 *Drogas Antifúngicas*

Para a avaliação da sensibilidade foram utilizadas drogas antifúngicas, adquiridas comercialmente, com alto grau de pureza, sob a forma de pó, consideradas referências, com potência fornecida pelo fabricante, sendo três derivados azólicos: itraconazol (ICZ), fluconazol (FCZ) e voriconazol (VCZ) (Sigma Co., EUA), um derivado poliênico, a anfotericina B (AMB) (Sigma Co., EUA) e uma pirimidina fluorinada, a flucitosina (5FC) (Sigma Co., EUA).

As soluções estoque de AMB, ICZ e VCZ foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Co., EUA) na concentração de 1.600 µg/mL, as de FCZ e 5FC foram dissolvidos em água destilada estéril na concentração de 5.120 µg/mL. Um volume de 1,2 mL das soluções estoque foi distribuído em criotubos estéreis, e congelado a -70°C para uso posterior.

3.3.1.2 *Meio de Cultivo*

O meio usado nos ensaios foi o RPMI-1640 com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio, com indicador de pH vermelho de fenol (Invitrogen Co., USA), suplementado com glicose com concentração final de 2% e tamponado com MOPS 165Mm, pH 7,0. O meio foi esterilizado por filtração com membrana de 0,22 µm, incubado a 36°C por 48h para verificação da esterilidade e armazenado a 4°C por no máximo três semanas.

3.3.1.3 Preparo das diluições

Para os antifúngicos não solúveis em água, ICZ, VCZ e AMB, foi utilizado DMSO. As soluções estoque dessas drogas, na concentração de 1.600 µg/mL, foram descongeladas a temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$, sendo preparada a primeira série de diluição, isto é, 10 diluições seriadas em DMSO na concentração 100 vezes maior do que a concentração final a ser utilizada nos testes de sensibilidade (1.600 a 3,13 µg/mL); na sequência foi preparada a segunda série de diluição em RPMI-1640 a 1:100 resultando uma concentração duas vezes maior que a concentração final dos antifúngicos a ser usada nos testes de sensibilidade (16 a 0,0313 µg/mL).

Para os antifúngicos solúveis em água, FCZ e 5FC, o diluente usado foi o meio RPMI-1640. A partir das soluções estoque (5.120 µg/mL), preparou-se uma série de 10 diluições na concentração 10 vezes maior que a concentração final a ser testada (1.280 a 250 µg/mL), em seguida uma nova diluição foi realizada na proporção de 1:10 ficando a concentração final duas vezes maior que a concentração final dos antifúngicos a ser testada (128 a 0,25 µg/mL).

3.3.1.4 Preparo das placas de microdiluição

Placas plásticas de microdiluição com 96 poços, com tampa, estéreis, de fundo plano contendo oito linhas identificadas de A a H e 12 colunas numeradas de 1 a 12, com capacidade para 300 µL foram utilizadas no teste de sensibilidade. As microplacas foram preenchidas com 100 µL das 10 diluições de antifúngicos com concentração duas vezes maior do que a concentração final do teste. Essas diluições foram dispensadas nos poços entre as colunas 2 e 11, com auxílio de uma micropipeta multicanal, com 8 canais, e ponteiros descartáveis estéreis, começando pela coluna 11 que recebeu a menor concentração até a 2 com a maior concentração do antifúngico. Após o preparo as microplacas foram cobertas com película plástica aderente estéril e tampadas, e as placas com AMB foram envolvidas em papel alumínio. As microplacas foram crio-preservadas a -70°C até o momento de uso, com validade de seis meses.

3.3.1.5 Inóculo

A partir do cultivo em placa de Petri com SDA 2%, a 35°C por 48h, cinco colônias isoladas com diâmetro de aproximadamente 1 mm foram suspensas em 5 mL de solução salina 0,85% estéril, a densidade celular ajustada ao padrão 0,5 da escala de McFarland em comprimento de onda de 530nm utilizando o DensiChek™Vitek® (bioMérieux), que corresponde a uma suspensão com concentração celular de aproximadamente $1-5 \times 10^6$ UFC/mL. Essa suspensão foi diluída 1:50 e depois 1:20 em RPMI-1640, para se obter o inóculo 2x concentrado usado no teste, com uma concentração celular de aproximadamente $1,0$ a $5,0 \times 10^3$ UFC/mL.

3.3.1.6 Realização do Teste

Para a realização do TSA foi utilizada a microplaca previamente preparada e descongelada à temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$ por aproximadamente 30 minutos. Em seguida, alíquotas de 100µl do inóculo foram colocadas nos poços entre as colunas 2 e 12, com auxílio de uma micropipeta multicanal, com 12 canais, e ponteiros descartáveis estéreis, sendo um micro-organismo testado por linha. A concentração dos antifúngicos foi diluída para a concentração final do teste, de 8 a 0,015 µg/mL para AMB, ICZ e VCZ, e de 64 a 0,125 µg/mL para FCZ e 5FC. O inóculo foi diluído 1:1 chegando-se a concentração desejada de $0,5$ a $2,5 \times 10^3$ UFC/mL.

Os poços da coluna 1 foram preenchidos com 200 µL de RPMI-1640, sendo o RPMI-1640 do mesmo lote usado para o preparo do inóculo, para controle de esterilidade do meio (CEM) e os poços da coluna 12 foram preenchidos com 100 µL de RPMI-1640 para o controle do crescimento (CCr).

Os poços das linhas G e H foram preenchidos com alíquotas de 100 µl de inóculo das cepas controle: *Candida parapsilosis* INCQS 40038 e *Candida krusei* INCQS 40147, o inóculo foi preparado como para as cepas a serem testadas. Após a inoculação, a microplaca foi incubada a 35°C por 72 horas sem agitação.

3.3.1.7 Leitura dos Resultados

As concentrações inibitórias mínimas (CIM) foram determinadas por comparação visual do crescimento do poço controle (coluna 12) com o crescimento dos demais poços com as diferentes concentrações testadas (colunas 2 a 11). Para a leitura as microplacas foram colocadas em suporte contendo um espelho para observar o seu reverso. A leitura também foi realizada por espectrofotometria em aparelho com leitor para microplacas *Microwell System* (Organo Teknika – Holanda) em comprimento de onda de 492 nm, a coluna 1 foi utilizada como “branco” do espectrofotômetro na leitura automatizada. Os resultados foram impressos para análise e determinação da CIM.

A CIM do antifúngico foi a menor concentração capaz de inibir o crescimento do micro-organismo testado em relação ao crescimento controle observado na coluna 12 que permitiu uma avaliação quantitativa do crescimento de cada isolado durante o teste.

Para os azólicos e 5FC, a CIM corresponde ao primeiro poço que apresentou uma redução de 50% ou mais do crescimento quando comparado com o crescimento do controle; para a AMB, a CIM corresponde ao primeiro poço onde ocorreu inibição de pelo menos 95% do crescimento, quando comparado ao crescimento controle.

As cepas de referência (controle de qualidade interno) *Candida parapsilosis* INCQS 40038 e *Candida krusei* INCQS 40147 foram utilizadas em todos os testes e em todas as placas, por possuírem a sensibilidade conhecida, por exemplo, para FCZ os valores de CIM menores que 8 µg/mL e acima de 16 µg/mL, respectivamente.

3.3.2 Etest

O Etest foi realizado seguindo as orientações do fabricante descritas no Etest *Technical Guide 4. Antifungal susceptibility testing of yeasts* (2007). AB Biodisk.

Etest é uma técnica de difusão em ágar para TSA, que compreende um gradiente pré-determinado do agente antifúngico para obtenção da CIM em $\mu\text{g/mL}$ de cada droga. Consiste de uma fita plástica fina, de plástico não poroso e inerte, de 5 mm de largura com 60 mm de comprimento. Um dos lados da fita consta a concentração da droga em $\mu\text{g/mL}$. Um código com letras identifica a droga. Um gradiente pré-determinado e exponencial do agente antifúngico seco e estabilizado é impregnado sobre a outra superfície, com um máximo de concentração, combinando o do teste de diluição e difusão em ágar.

3.3.2.1 Drogas Antifúngicas

As fitas de Etest para AMB, 5FC e os azólicos ICZ, FCZ e VCZ, foram utilizadas para determinar a CIM nas cepas estudadas. A abreviação dos antifúngicos pelo fabricante das fitas Etest é diferente das abreviações estabelecidas neste trabalho para os antifúngicos.

3.3.2.2 Meio de Cultivo

O meio usado nos ensaios foi o RPMI-1640 com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio (Sigma Co., EUA) suplementado com glicose com concentração final de 2% e tamponado com MOPS 165mM com pH 7,0, esterilizado por filtração com membrana de 0,22 μm , incubado a 36°C por 48h, para certificar a esterilidade do mesmo. O ágar foi preparado na concentração de 15 g em 500 mL, esterilizado por 15 minutos a 121°C, resfriado aproximadamente a 50°C e misturado delicadamente com o caldo RPMI-1640, preparado 2x concentrado, também a temperatura de aproximadamente 50°C. Com o auxílio de pipeta automática, o volume de 25 mL foi distribuído em placas de Petri de 90 mm de diâmetro, descartáveis, estéreis. A quantidade do meio pode variar dependendo do tipo de placa, sendo fundamental uma espessura de $4,5 \pm 0,5$ mm. As placas foram

colocadas a 36°C por 48h para verificação da esterilidade e armazenadas a 4°C por uma semana.

3.3.2.3 Inóculo

A partir do cultivo em SDA 2% a 35°C por 48h várias colônias isoladas foram colhidas com auxílio de uma alça, preparando-se uma suspensão em 5 mL de solução salina 0,85% estéril com turvação ajustada ao padrão 1 da escala de McFarland utilizando-se o *DensiChek*TM*Vitek*[®] (bioMérieux), em comprimento de onda de 530nm. Um *swab* estéril e não tóxico foi umedecido na suspensão, o excesso foi retirado passando o *swab* contra a parede do tubo. A superfície do ágar foi totalmente inoculada pela passagem do *swab* em três direções. A aplicação das fitas de Etest foi realizada somente com a superfície do meio completamente seco.

3.3.2.4 Realização do Teste

As fitas de Etest embaladas foram removidas do freezer -20°C e mantidas por aproximadamente 30 minutos sobre a bancada do laboratório para que atingissem a temperatura de aproximadamente 25°C. A embalagem foi cortada na linha pontilhada. A fita foi retirada da embalagem com auxílio de uma pinça estéril, sendo colocada em uma placa de Petri estéril e seca até o momento da aplicação na superfície do meio. Foram tomados todos os cuidados para não tocar na parte da fita contendo o gradiente de droga, somente na parte marcada com a letra E.

As fitas foram colocadas na superfície do ágar, completamente seco, com a escala da CIM voltada para cima e com a concentração máxima próxima da periferia da placa; pressionou-se levemente a fita no ágar para evitar formação de bolhas. Uma vez colocada no ágar, a posição da fita não pode ser modificada. Cada fita de antifúngico testado foi colocada em uma placa e incubada a 35°C por 48h.

Avaliações periódicas, para controle do Etest, foram realizadas com *C. neoformans* INCQS 40282 e INCQS 40283, *Candida parapsilosis* INCQS 40038 e

Candida krusei INCQS 40147, cujo perfil de sensibilidade aos antifúngicos foi previamente determinado (Etest *Technical Guide 4. Antifungal susceptibility testing of yeasts* - 2007).

3.3.2.5 Leitura dos Resultados

Quando a fita de Etest é aplicada sobre uma placa de ágar inoculada, ocorre liberação imediata da droga antifúngica da fita para o ágar formando um gradiente estável e contínuo de concentrações do antifúngico diretamente sob a superfície do ágar.

Após incubação, à medida que o crescimento do fungo se torna visível, uma elipse de inibição simétrica é observada ao longo da fita.

Nos testes realizados, o valor da CIM ($\mu\text{g/mL}$) foi lido no ponto de intersecção entre o halo e a fita de Etest. Para AMB, a CIM foi lida no ponto de inibição completa do crescimento (100%) e para 5FC quase completa (95% de inibição). Como os azólicos FCZ, ICZ e VCZ podem dar pontos de intersecção difusos, a CIM foi lida no primeiro ponto de inibição significativa (80%) de crescimento observado.

3.3.3 Vitek 2 Compact – bioMérieux

Método comercial para o TSA *in vitro* totalmente automatizado. O cartão AST-YSO1 é o indicado, pelo fabricante, para a determinação da CIM e contém os antifúngicos AMB, 5FC, FCZ e VCZ.

O teste de sensibilidade, a leitura e interpretação dos resultados foram realizados em conformidade com as instruções do fabricante descritas no Manual do utilizador do aparelho Vitek 2 (INFORMAÇÃO, 2008).

3.3.3.1 Inóculo

A partir do cultivo em SDA 2% a 35°C por 48h colheu-se com auxílio de uma alça várias colônias isoladas e preparou-se uma suspensão em 3,0 mL de solução salina 0,45 a 0,5%, pH 4,5, própria para uso no sistema Vitek 2, em tubo de ensaio de plástico (poliestireno) transparente estéril com turvação ajustada ao padrão 1,80 a 2,20 da escala de McFarland, usando o *DensiChek*TM Vitek[®] 2. Preparou-se uma nova diluição, transferindo 280 µL da primeira suspensão para um tubo de ensaio de plástico (poliestireno) com 3,0 mL de solução salina 0,45%, que foi usada para inocular o cartão AST-YSO1.

3.3.3.2 Realização do Teste

Colocou-se o tubo contendo a suspensão diluída e o cartão AST-YSO1 no cassete e seguindo-se as orientações do fabricante, introduziu-se o conjunto na câmara de distribuição do inóculo e depois esse foi transferido para a câmara de leitura do código de barras e selagem do cartão, e na sequência os cartões foram transferidos para o compartimento de incubação, com temperatura de 37°C. A taxa de crescimento foi lida automaticamente por espectrofotometria, permitindo a determinação do ponto de corte de acordo com as instruções pré-estabelecidas pelo fabricante. Os resultados foram expressos como valores da CIM em µg/mL. Todos os dados foram transferidos para um computador com software próprio do Vitek 2, onde também foram feitos os registros de cada cepa testada.

3.3.4 Interpretação dos Resultados

Os antifúngicos para os quais existe ponto de corte, definido por consenso, foram descritos no protocolo CLSI M27-A3. Estes pontos de corte basearam-se em valores de níveis séricos, em estudos realizados em pacientes com candidíases,

portanto, foram estabelecidos para leveduras do gênero *Candida*. Os mesmos pontos de corte passaram a ser utilizados para os testes com cepas de *Cryptococcus* spp. Portanto, os pontos de corte usados para interpretar os valores da CIM obtidos para os azólicos FCZ, ICZ e VCZ frente às diferentes cepas de *C. neoformans* e *C. gattii* foram os definidos no protocolo M27-A3 (CLSI, 2008). Os valores definidos para cepas sensíveis e resistentes a ICZ foram de CIM $\leq 0,125$ $\mu\text{g/mL}$ e ≥ 1 $\mu\text{g/mL}$; para FCZ ≤ 8 $\mu\text{g/mL}$ e ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$; para VCZ ≤ 1 $\mu\text{g/mL}$ e ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$ e para 5FC ≤ 4 $\mu\text{g/mL}$ e ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$. Foi considerada sensibilidade dose dependente (S-DD) para ICZ as cepas com CIM de 0,25 - 0,5 $\mu\text{g/mL}$, para FCZ as cepas com CIM de 16 - 32 $\mu\text{g/mL}$. Foram considerados com sensibilidade intermediária para 5FC cepas com CIM de 8 -16 $\mu\text{g/mL}$ (CLSI, 2008).

Em estudo recente, publicado por Espinel-Ingroff e colaboradores (2012), foi proposto ponto de corte epidemiológico (epidemiologic cutoff values - ECVs) para AMB e 5FC. Por definição ECV é a concentração crítica do antifúngico que identifica cepas com sensibilidade reduzida ou é um alerta antecipado de mudanças emergentes nos padrões de sensibilidade dos organismos para o antifúngico em análise, isto é, monitora o aparecimento de cepas com sensibilidade reduzida para o agente antifúngico avaliado. Os valores de CIM para a AMB e 5FC foram determinados em estudos realizados em vários laboratórios da Espanha, Holanda, França, Estados Unidos, Austrália, Brasil, Canadá, Índia e África do Sul para *C. neoformans* e *C. gattii*. A análise desses valores de CIM estabeleceu o ponto de corte para AMB de CIM ≤ 1 $\mu\text{g/mL}$ e para 5FC CIM ≤ 16 $\mu\text{g/mL}$ para cepas sensíveis no referido estudo.

O protocolo CLSI M27-A3 define ponto de corte para 5FC em espécies de *Candida* e não apresenta ponto de corte para AMB. Neste estudo os valores de CIM ≤ 1 $\mu\text{g/mL}$ para AMB e CIM ≤ 16 $\mu\text{g/mL}$ para 5FC serão categorizados como sensíveis nas cepas analisadas.

Os valores de CIM obtidos para o FCZ neste estudo foram analisados com valor de corte proposto em um estudo de correlação clínica, onde CIM ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$ foi considerado resistente (ALLER et al., 2000).

Os resultados dos valores de CIM obtidos pelos testes de sensibilidade aos antifúngicos testados, pelas três metodologias, serão interpretados segundo o protocolo CLSI M27-A3 para 5FC, ICZ, FCZ e VCZ, pelo ponto de corte epidemiológico para AMB e 5FC e pelo proposto por Aller para FCZ (Apêndice 4).

3.3.5 Análise dos Resultados

Os resultados de CIM obtidos pelo método de referência do CLSI e pelos métodos comerciais Etest e Vitek 2 foram analisados pelas características de distribuição: variação dos valores, representando os limites inferior e superior de CIM de cada antifúngico referente as cepas testadas; CIM₅₀ definida como a concentração inibitória mínima da droga capaz de inibir o crescimento de 50% nas cepas testadas pela frequência acumulada; CIM₉₀ definida como a concentração inibitória mínima da droga capaz de inibir o crescimento de 90% nas cepas testadas pela frequência acumulada; e a media geométrica (MG) da CIM de cada antifúngico referente as cepas testadas.

Ambos os resultados, dentro e fora da escala de diluição do antifúngico, foram incluídos na análise, porque as fitas de Etest contêm um gradiente contínuo de cada droga testada, em vez do esquema de diluição de droga log₂ do método de microdiluição em caldo. Assim, os valores de CIMs obtidos no Etest foram pareados à concentração mais próxima da droga obtida no esquema de microdiluição, para possibilitar a comparação dos resultados.

A reprodutibilidade dos resultados obtidos pelo método de referência do CLSI e pelos sistemas comerciais foi calculada para determinar as porcentagens da concordância essencial (EA) entre os valores de CIM. O percentual de concordância entre as metodologias CLSI, Etest e Vitek 2 foi definido como a proporção dos resultados que ficaram dentro de ± 2 diluições dos resultados de CIM. Os valores foram considerados concordantes quando as discrepâncias entre os métodos não eram mais do que ± 2 diluições.

Para os agentes antifúngicos cujos pontos de corte foram estabelecidos pelo CLSI M27-A3, a concordância categórica (CC) foi definida como a percentagem de cepas classificadas na mesma categoria pelo método de referência e os sistemas comerciais. A discrepância entre os métodos foi considerada como erro gravíssimo (EMG) se uma cepa classificada como resistente pelo método de referência foi categorizada como sensível pelo método comercial. A discrepância foi considerada como erro grave (EM), se uma cepa classificada como sensível pelo método de referência foi classificada como resistente pela técnica comercial. Os erros leves ou menores (EMi) foram considerados quando uma cepa sensível foi classificada como

intermediária ou sensível-dose dependente (S-DD), quando uma cepa resistente foi agrupada como intermédia ou S-DD, quando cepas intermediárias ou S-DD foram consideradas as cepas sensíveis, ou quando intermédias ou S-DD foram classificadas como resistentes.

Os testes de sensibilidade aos antifúngicos testados foram repetidos, em todas as cepas, pelo menos duas vezes para as metodologias CLSI e Etest, em períodos diferentes, para verificar a estabilidade das cepas e a reprodutibilidade dos valores de CIM obtidos em momentos diferentes. Devido ao alto custo do cartão AST-YSO1, poucos testes foram repetidos pelo Vitek 2, somente alguns que apresentaram dúvidas nos resultados da CIM.

3.3.6 Análise Estatística

O tratamento dos dados foi realizado utilizando-se planilha eletrônica Excel 2003. As comparações para cada par de métodos CLSI - M27-A3 e Etest, e CLSI - M27-A3 e Vitek 2, foram realizadas aplicando o teste de Wilcoxon para dados pareados a um nível de significância 0,05. Esse método considera o pareamento dos resultados para cada uma das cepas de *C. neoformans* e *C. gattii*. Resultados com p -valores $< 0,05$ no teste estatístico indicam diferenças significantes.

3.4 DIVERSIDADE GENÉTICA

Para análise da diversidade genética os perfis obtidos por AFLP foram estudados em 52 cepas de *C. neoformans* e 31 cepas de *C. gattii*, obtidas a partir de diversas amostras clínicas e ambientais, provenientes de vários estados do Brasil, RS, PR, CE, AM e predominantemente do RJ e do PI; dentre essas uma cepa oriunda da Austrália e uma dos Estados Unidos. O DNA genômico foi obtido pelo método de CTAB, como descrito por Boekhout e colaboradores (2001).

A metodologia de AFLP utilizada seguiu o protocolo “*Amplified Fragment Length Polymorphism – AFLP- Microbiol Fingerprinting*” da Applied Biosystems (AB).

Foram usadas as enzimas de restrição *EcoRI* e *MseI* e as sequências iniciadoras *EcoRI-A* e *MseI-C* na reação em cadeia da polimerase (PCR) pré-seletiva e *EcoRI-AC* FAM e *MseI-G* na amplificação seletiva.

A clivagem do DNA genômico foi realizada com duas enzimas de restrição, a *EcoRI* de corte raro e a *MseI* de corte frequente, seguida da ligação de adaptadores pela T4 ligase, os adaptadores possuem uma sequência de 10 nucleotídeos conhecidos e os sítios específicos das enzimas *EcoRI* e *MseI*. A primeira reação de PCR, denominada pré-seletiva, foi realizada com uma sequência iniciadora espelho da sequência dos adaptadores e do sítio da enzima acrescido de uma base nucleotídica (*EcoRI-A* e *MseI-C*), uma nova reação de PCR, denominada seletiva, foi realizada para amplificação com sequências nucleotídicas complementares aos adaptadores e do sítio da enzima acrescido de uma ou duas bases nucleotídicas (*EcoRI-AC* e *MseI-G*), sendo a sequência *EcoRI-AC* marcada com um fluoróforo. Os fragmentos amplificados foram submetidos à eletroforese capilar em sequenciador automático ABI 310 *Genetic Analyzer*, equipado com o *software GeneScan*. Os dados obtidos por AFLP foram analisados com o *software Bionumerics*, aplicando a correlação de *Pearson* baseada na similaridade das curvas densitométricas e pelo método não ponderado de agrupamento aos pares por média aritmética (UPGMA).

4 RESULTADOS

4.1 MICRO-ORGANISMOS

Foram estudadas 176 cepas de *C. neoformans* e *C. gattii* da região norte do Brasil. Essas estão distribuídas de tal maneira: do estado do PA foram 78 cepas de *C. neoformans* e 52 de *C. gattii* de origem clínica num total de 130 cepas, obtidas a partir de liquor e ou sangue de 59 pacientes [de 14 pacientes foi analisada uma cepa (n=14), de 32 pacientes foram analisadas duas cepas do mesmo cultivo (n=64), de dois pacientes foram analisadas duas cepas obtidas em dias diferentes (n=4), de dois pacientes foram analisadas três cepas obtidas do mesmo cultivo (n=6), de seis pacientes foram analisadas quatro cepas obtidas em datas diferentes de isolamento (n=24) e de três pacientes foram analisadas seis cepas obtidas em momentos diferentes (n=18)]; do estado do AM foram estudadas 17 cepas de origem clínica obtidas de 15 pacientes, sendo 10 de *C. neoformans* e sete de *C. gattii*, além de três cepas de origem ambiental oriundas de madeira em decomposição no interior de oco, sendo duas de *C. neoformans* isoladas de *Myroxylon peruiferum* e uma de *C. gattii* isolada de *Theobroma cacao*; do estado de RR foram estudadas 13 cepas de origem clínica, obtidas de 10 pacientes, sendo 11 de *C. neoformans* e dois de *C. gattii*, e de origem ambiental foram 13 cepas, sendo oito de *C. neoformans* e cinco de *C. gattii*, oriundas de poeira domiciliar e madeira em decomposição no interior de oco em diversas espécies de árvores vivas, *Adenantha pavonina*, *Syzygium jambolanum*, *Erithrina velutina*, *Guettarda acreana*. Estas cepas foram submetidas ao TSA (Apêndice 1).

A diversidade genética foi estudada em outras 83 cepas, sendo 52 de *C. neoformans* e 31 de *C. gattii*, assim distribuídas: quatro do estado do AM, três de origem clínica e uma ambiental; do PI foram 49 cepas, sendo 47 cepas de origem clínica e duas ambientais; do CE foi uma cepa de origem clínica; do RJ foram 23 cepas, sendo 16 de origem clínica e sete ambientais; do PR foram três cepas de origem clínica; do RS foi uma de origem ambiental; uma de origem clínica oriunda dos USA; e uma de origem ambiental oriunda da Austrália (AU) (Apêndice 2).

4.2 FATORES DE VIRULÊNCIA

4.2.1 Termotolerância

A termotolerância foi estudada num conjunto de 238 de cepas. Essas cepas foram analisadas em diferentes temperaturas de acordo com a espécie de *Cryptococcus* (Tabela 1 e Figura 1). Todas apresentaram crescimento na temperatura de 25°C em 72h de incubação, tendo apresentado crescimento de 3(+) em 80,25% (191/238) e de 2(+) em 19,25% (47/238) das cepas, através da leitura utilizando-se o Cartão de Wickerham.

Na temperatura de 36°C em 72h de incubação, a turvação observada pelo crescimento foi de 3(+) em 29,83% (71/238), de 2(+) em 66,39% (158/238) e de 1(+) em 3,78% (9/238) das cepas estudadas. As que apresentaram 1(+) de crescimento foram colocados a 25°C por 48h, sendo obtido crescimento de 2(+). A partir desse crescimento foi inoculada uma alçada em ASN, sendo observadas colônias marrons, aspecto mucóide e brilhante, características próprias de *C. neoformans* e *C. gattii*.

Na temperatura de 40°C em 72h de incubação, 98,32% (234/238) das cepas não apresentaram crescimento visível, sendo negativas frente ao Cartão de Wickerham, e apenas 1,68% (4/238) das cepas apresentaram turvação de 1(+). No cultivo em YPDA não foi observado crescimento em 92% (219/238) das cepas, sendo observado crescimento no local do inóculo em apenas 6,3% (15/238) das cepas e um crescimento muito discreto na superfície do ágar em 1,68% (4/238) das cepas, essas correspondentes a três cepas que também apresentaram crescimento de 1(+) no meio líquido. Os tubos e as placas que não apresentaram crescimento foram reincubados em estufa a 25°C por 48h. Após esse tempo de incubação todos apresentaram bom crescimento, tanto no cultivo em ágar como no caldo. Foi apresentado crescimento em caldo de 3(+) em 18,5% (44/238), de 2(+) em 68,9% (164/238) e de 1(+) em 12,6 (30/238) das cepas estudadas, uma alçada desses cultivos foi estriada em ASN para observação da pureza dos mesmos. Os cultivos foram observados a cada dois dias e todos se apresentaram como colônias

marrons, com aspecto mucóide e brilhante, características próprias de *C. neoformans* e *C. gattii*.

Tabela 1

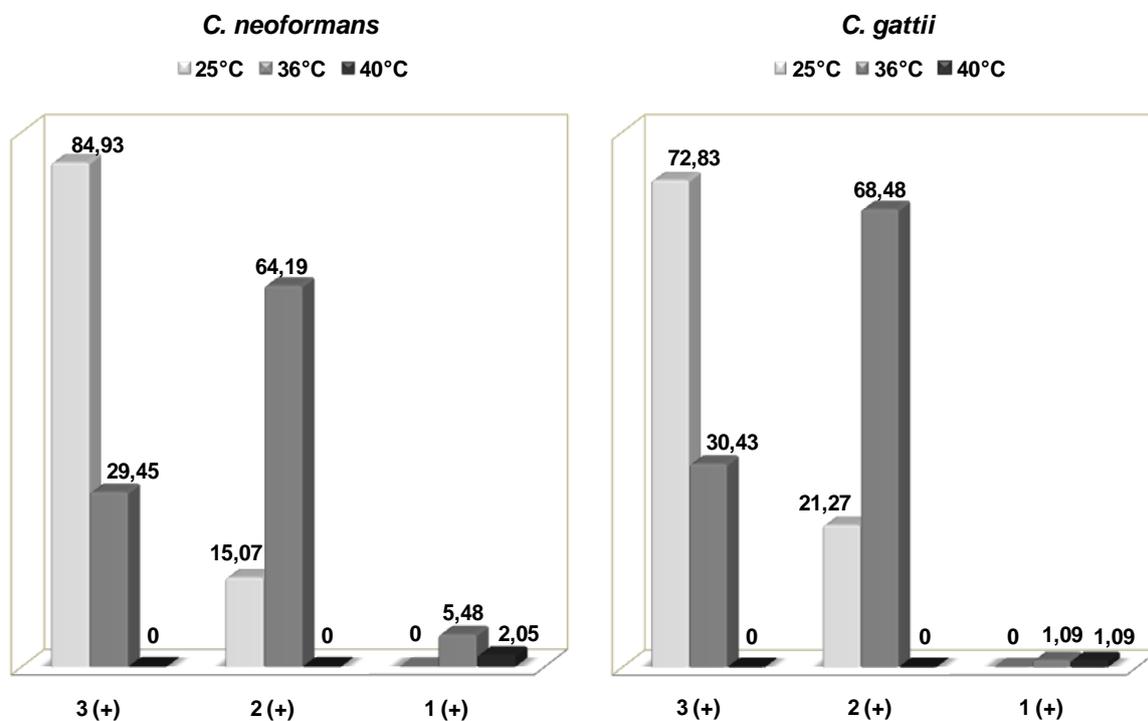
Crescimento de *C. neoformans* e *C. gattii* em diferentes temperaturas.

Micro-organismos	Crescimento	Temperatura/Percentual		
		25°C/% caldo	36°C/% caldo	40°C/% caldo
<i>C. neoformans</i> n=146	3 (+)	84,93 (124/146)	29,45 (43/146)	–
	2 (+)	15,07 (22/146)	64,19 (95/146)	–
	1 (+)	–	5,48 (8/146)	2,05 (3/146)
<i>C. gattii</i> n=92	3 (+)	72,83 (67/92)	30,43 (28/92)	–
	2 (+)	27,17 (25/92)	68,48 (63/92)	–
	1 (+)	–	1,09 (1/92)	1,09 (1/92)

n= número de cepas estudadas

Figura 1

Representação gráfica da Tabela 1 - Crescimento de *C. neoformans* e *C. gattii* em diferentes temperaturas.



4.2.2 Síntese de melanina

A síntese de melanina foi observada em todas as cepas estudadas (n=238). As colônias de *C. neoformans* e *C. gattii* apresentaram-se nas tonalidades marron, variando de intensidade, desde a cor marrom bem forte até um café com leite mais claro, sendo todas fenoloxidase positivo. A expressão fenotípica do gene *LAC1* codifica a enzima catalisadora da biossíntese da melanina.

4.2.3 Produção de fosfolipase extracelular

A atividade enzimática de fosfolipase extracelular foi pesquisada em 176 cepas oriundas do AM, PA e RR. O valor Pz igual a 1,0, que corresponde à ausência de atividade enzimática, não foi observado nas cepas de *C. neoformans* e de *C. gattii*.

Nas cepas *C. neoformans* de origem clínica (n=99) foi observada atividade enzimática baixa (+) em 6,06% (6/99), atividade enzimática moderada (++) em 83,84% (83/99) e atividade enzimática alta (+++) 10,1% (10/99). Nas cepas de *C. neoformans* de origem ambiental (n=10) foi observada atividade enzimática moderada (++) em quatro cepas e atividade enzimática alta (+++) em seis cepas, (Tabela 2 e Figura 2).

Em 61 cepas de *C. gattii* de origem clínica foi observada atividade enzimática baixa (+) em 1,64% (1/61), atividade enzimática moderada (++) em 88,52% (54/61) e atividade enzimática alta (+++) em 9,84% (6/61) nas cepas estudadas. Foi observado em todas as cepas ambientais de *C. gattii* (n=6) atividade enzimática moderada (++) (Tabela 2 e Figura 2).

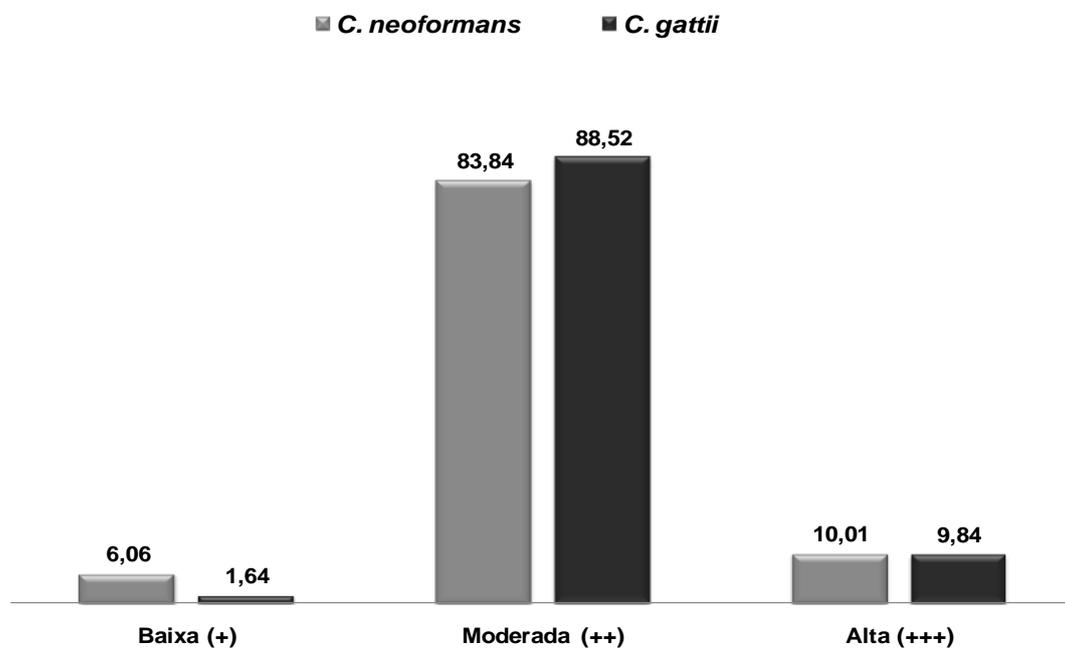
O valor médio, desvio padrão e intervalo de Pz apresentado pelas cepas de *C. gattii* e *C. neoformans* estão na Tabela 2.

Tabela 2
Análise da Atividade Enzimática de Fosfolipase Extracelular.

Micro-organismos	Origem	Atividade Enzimática	Pz	Media e Desvio padrão ($\bar{X} \pm S$)	Percentual (%)
<i>C. neoformans</i> n=109	Clínica n=99	baixa (+)	0,70- 0,80	0,73 \pm 0,04	6,06 (6/99)
		moderada (++)	0,40 -0,69	0,53 \pm 0,07	83,84 (83/99)
		alta (+++)	0,34-0,38	0,36 \pm 0,02	10,1 (10/99)
	Ambiental n=10	moderada (++)	0,48-0,58	0,53 \pm 0,04	40 (4/10)
		alta (+++)	0,29-0,35	0,34 \pm 0,02	60 (6/10)
<i>C. gattii</i> n=67	Clínica n=61	baixa (+)	0,70		1,64 (1/61)
		moderada (++)	0,40-0,66	0,53 \pm 0,06	88,52 (54/61)
		alta (+++)	0,35-0,39	0,37 \pm 0,02	9,84 (6/61)
	Ambiental n=6	moderada (++)	0,44-0,54	0,48 \pm 0,02	100 (6/6)

n= número de cepas estudadas

Figura 2
Representação gráfica da Tabela 2 - Atividade enzimática de fosfolipase extracelular.



4.2.4 Indução de cápsula

A presença de cápsula foi observada em todas as cepas de *C. neoformans* e *C. gattii*, envolvidas neste estudo (n=238), quando cultivadas em YPDB e incubadas a 36°C por 72h, com aproximadamente 1,6 µm de espessura.

A indução de cápsula foi realizada em 58 cepas de *C. neoformans* e em 42 de *C. gattii*, de origem clínica, oriundas do PA. A presença de cápsula foi observada em todas as cepas submetidas à indução de sua produção, as quais apresentaram espessuras que variaram entre 1,6 a 6,4 µm. No entanto nem todas as cepas cultivadas no meio apropriado de indução de cápsula apresentaram indução efetiva, sendo essas observadas somente em 27,6% (16/58) em *C. neoformans*, e em 88,1% (37/42) em *C. gattii*.

4.3 TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS

O TSA foi realizado em 176 cepas de *C. neoformans* (n = 109) e *C. gattii* (n=67) da região norte do Brasil, sendo 160 cepas de origem clínica e 16 de origem ambiental. Todas estas cepas foram submetidas ao TSA e analisadas por três diferentes métodos (Apêndice 1).

4.3.1 Método de microdiluição em caldo (CLSI - protocolo M27-A3)

Os valores de CIM para *C. neoformans* de origem clínica variaram para AMB de 0,5 a 2 µg/mL, para 5FC de 1,0 a 8,0 µg/mL, para ICZ de 0,06 a 0,5 µg/mL, para FCZ de 1,0 a 8,0 µg/mL e para VCZ de 0,015 a 0,25 µg/mL. Com relação aos valores de CIM₅₀, CIM₉₀ e a média geométrica (MG) foram para AMB 1,0, 1,0 e 0,95 µg/mL, para 5FC 4,0, 4,0 e 2,89 µg/mL, para ICZ 0,125, 0,25 e 0,12 µg/mL, para FCZ 4,0, 4,0 e 3,36 µg/mL e para VCZ 0,064, 0,064 e 0,05 µg/mL, respectivamente. Estes dados estão apresentados na Tabela 3 e Figuras 3 e 5.

Para *C. gattii* de origem clínica os valores de CIM variaram para AMB de 0,5 a 2,0 µg/mL, para 5FC 0,5 a 16,0 µg/mL, para ICZ de 0,125 a 0,5 µg/mL, para FCZ 1,0 a 32,0 µg/mL e para VCZ de 0,03 a 1,0 µg/mL. Com relação aos valores de CIM₅₀, CIM₉₀ e a MG foram para AMB 1,0, 1,0 e 0,98 µg/mL, para 5FC 4,0, 8,0 e 3,25 µg/mL, para ICZ 0,25, 0,5 e 0,25 µg/mL, para FCZ 8,0, 16,0 e 6,27 µg/mL e para VCZ 0,25, 0,25 e 0,15 µg/mL, respectivamente. Estes dados estão apresentados na Tabela 3 e Figuras 4 e 5.

Tabela 3

Variação de CIM, valores de CIM₅₀, CIM₉₀ e MG dos antifúngicos testados para cepas clínicas de *C. neoformans* e *C. gattii* segundo o protocolo CLSI M27-A3 (2008).

Micro-organismos	Antifúngicos	CIM (µg/mL)			
		variação	50	90	MG
<i>C. neoformans</i> n=99	Anfotericina B	0,5 - 2,0	1,0	1,0	0,95
	Flucitosina	1,0 - 8,0	4,0	4,0	2,89
	Itraconazol	0,06 - 0,5	0,125	0,25	0,12
	Fluconazol	1,0 - 8,0	4,0	4,0	3,36
	Voriconazol	0,015 - 0,25	0,064	0,064	0,05
<i>C. gattii</i> n=61	Anfotericina B	0,5 - 2,0	1,0	1,0	0,98
	Flucitosina	0,5 - 16,0	4,0	8,0	3,25
	Itraconazol	0,125 - 0,5	0,25	0,5	0,25
	Fluconazol	1,0 - 32,0	8,0	16,0	6,27
	Voriconazol	0,03 - 1,0	0,25	0,25	0,15

MG- Média Geométrica, CIM – Concentração Inibitória Mínima

Figura 3

Representação gráfica da Tabela 3 - CLSI - M27-A3 – Variação de CIM em cepas clínicas de *C. neoformans*.

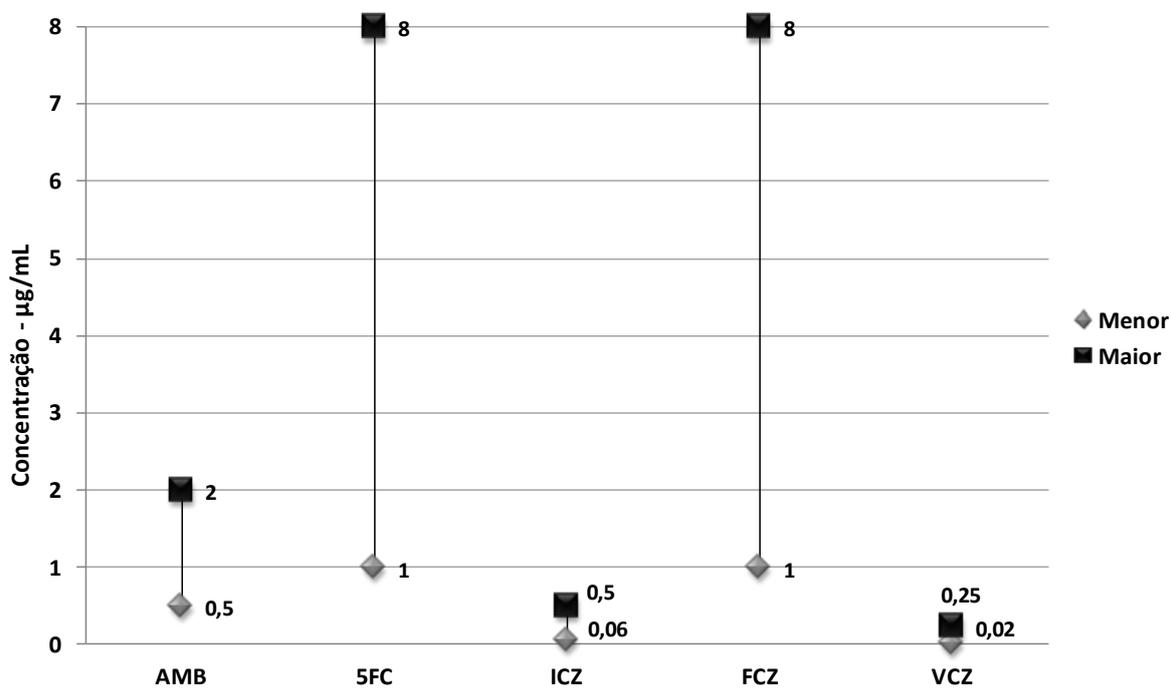


Figura 4

Representação gráfica da Tabela 3 - CLSI - M27-A3 – Variação de CIM em cepas clínicas de *C. gattii*.

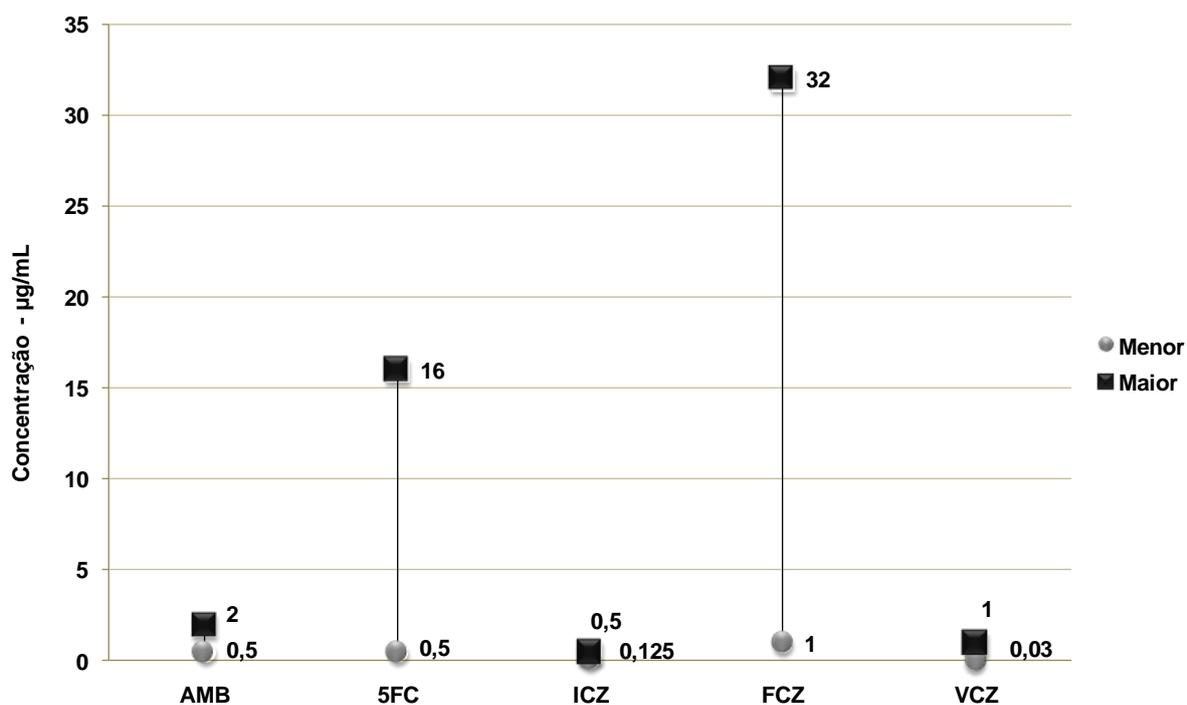
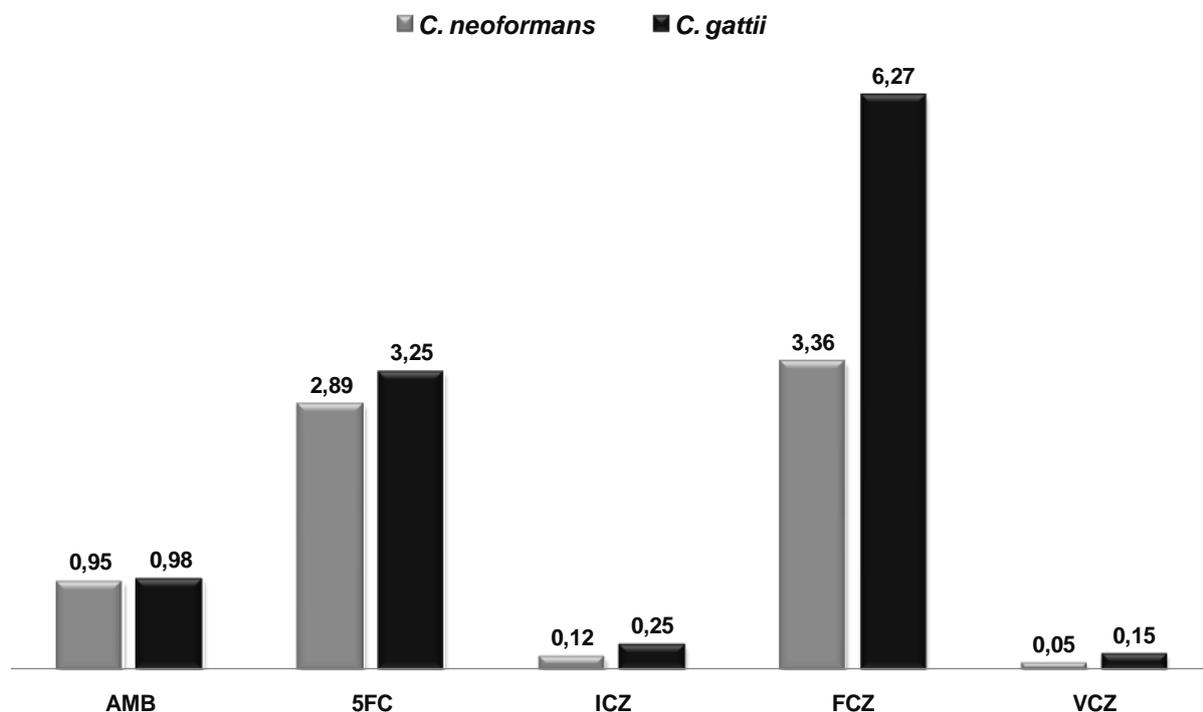


Figura 5
Representação gráfica da Tabela 3 - CLSI - M27-A3 – Média Geométrica em cepas clínicas de *C. neoformans* e *C. gattii*.



Com base no protocolo M27-A3 (CLSI, 2008), os valores definidos para cepas sensíveis e resistentes a ICZ são de CIM $\leq 0,125$ $\mu\text{g/mL}$ e ≥ 1 $\mu\text{g/mL}$; para FCZ de ≤ 8 $\mu\text{g/mL}$ e ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$; para VCZ de ≤ 1 $\mu\text{g/mL}$ e ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$ e para 5FC de ≤ 4 $\mu\text{g/mL}$ ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$. Para sensibilidade dose dependente (S-DD) para ICZ foi estabelecida CIM de 0,25 - 0,5 $\mu\text{g/mL}$, e com sensibilidade intermediária para 5FC, CIM de 8 - 16 $\mu\text{g/mL}$. Dentre as 99 cepas de *C. neoformans* estudadas foram classificadas como sensíveis à AMB 97,97% (97/99), a 5FC 96,97% (96/99), ao ICZ 87,88% (87/99), enquanto para FCZ e VCZ 100% das cepas se apresentaram sensíveis. Com os resultados obtidos para *C. gattii* foram classificadas como cepas sensíveis a AMB 93,44% (57/61), a 5FC 81,97% (50/61), ao ICZ 24,59% (15/61), ao FCZ 77,05% (47/61) e a VCZ 100% das cepas.

Em relação à S-DD ou intermediária (I) para *C. neoformans* foi de 3,03% (3/99) para 5FC e 12,12% (12/99) para ICZ. Enquanto que para *C. gattii* os valores encontrados foram 18,03% (11/61) para 5FC, 75,41% (46/61) para ICZ e 22,95% (14/61) para FCZ. A resistência *in vitro* foi observada em 6,56% (4/61) das cepas de

C. gattii e 2,02% (2/99) das cepas de *C. neoformans* para AMB. Analisando os mesmos resultados de CIM obtidos pelo CLSI e utilizando os parâmetros propostos por Aller e colaboradores (2000), para FCZ, 100% das cepas de *C. neoformans* foram sensíveis, 77,05% (47/61) das cepas de *C. gattii* mostraram-se sensíveis e 22,93% (14/61) resistentes.

Com base no ponto de corte epidemiológico (ECV) (Espinel-Ingroff et al., 2012) para AMB, tanto as cepas de *C. neoformans* quanto as cepas de *C. gattii*, apresentaram os mesmos resultados obtidos pelo CLSI (Tabela 4 e Figuras 6 e 7).

Tabela 4

Comparação dos percentuais de sensibilidade aos antifúngicos testados pelo Método de Microdiluição em Caldo, pelos parâmetros propostos no protocolo CLSI M27-A3, por Aller colaboradores (2000), e S e R com base no ECV proposto por Espinel-Ingroff e colaboradores (2012) para cepas de *C. neoformans* e *C. gattii* de origem clínica.

Micro-organismos	Antifúngicos	% por categoria - CLSI			Aller et al. (2000)		Espinel-Ingroff et al. (2012)	
		S	S-DD / I	R	S	R	S	R
<i>C. neoformans</i>	Anfotericina B	97,97(97/99)	0	2,02(2/99)	-	-	97,97(97/99)	2,02(2/99)
n=99	Flucitosina	96,97(96/99)	3,03(3/99)	0	-	-	100	-
	Itraconazol	87,88(87/99)	12,12(12/99)	0	-	-	-	-
	Fluconazol	100	0	0	100	-	-	-
	Voriconazol	100	0	0	-	-	-	-
<i>C. gattii</i>	Anfotericina B	93,44(57/61)	0	6,56(4/61)	-	-	93,44(57/61)	6,56(4/61)
n=61	Flucitosina	81,97(50/61)	18,03(11/61)	0	-	-	100	-
	Itraconazol	24,59(15/61)	75,41(46/61)	0	-	-	-	-
	Fluconazol	77,05(47/61)	22,95(14/61)	0	77,05(47/61)	22,95(14/61)	-	-
	Voriconazol	100	0	0	-	-	-	-

S – sensível, S-DD – sensível dose dependente, I – intermediário, R – resistente.

Figura 6

Representação gráfica da Tabela 4 - CLSI - M27-A3 - % por categoria para cepas clínicas de *C. neoformans*.

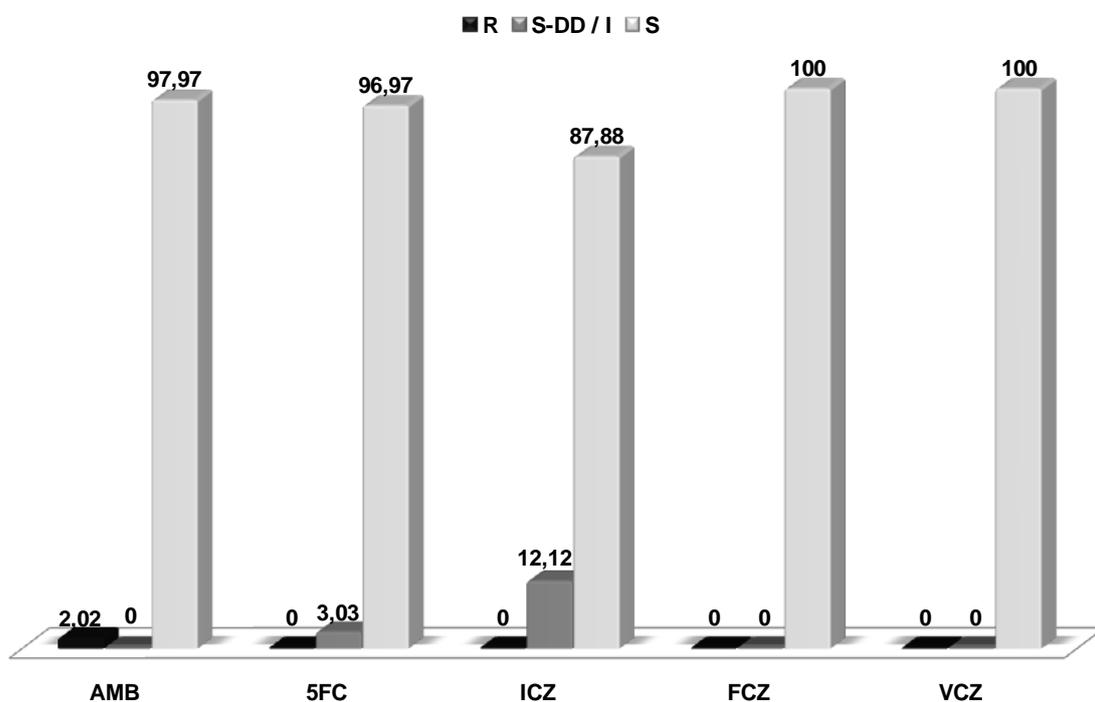
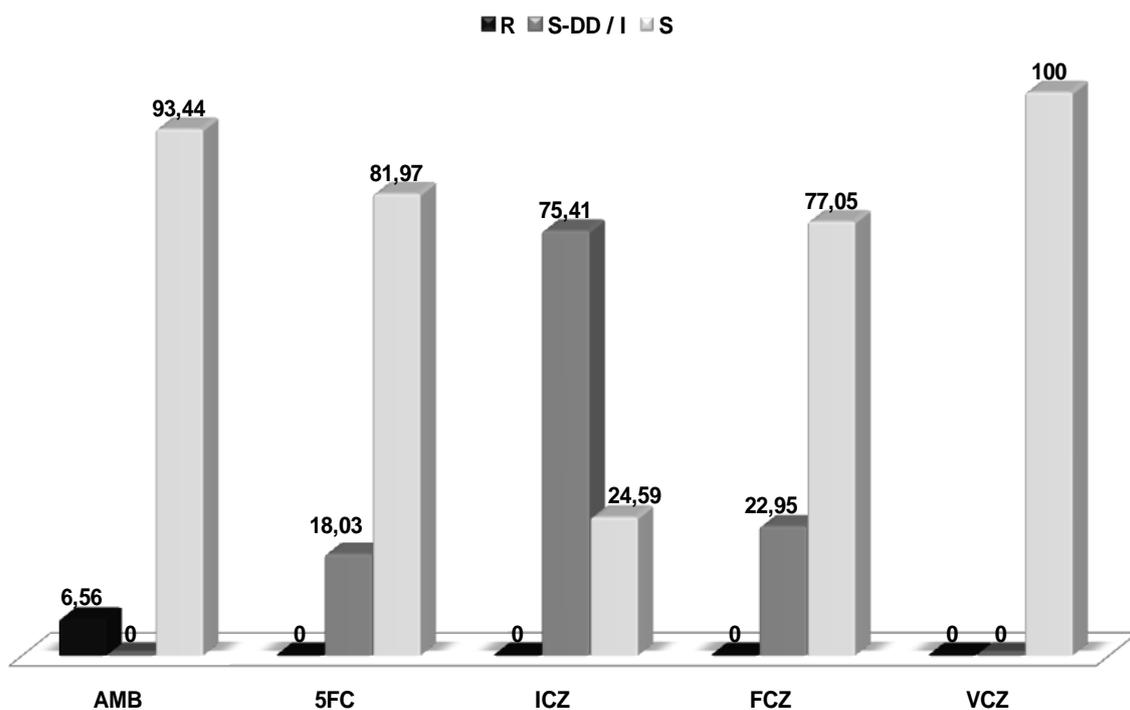


Figura 7

Representação gráfica da Tabela 4 - CLSI - M27-A3 - % por categoria para cepas clínicas de *C. gattii*.



Todas as cepas de *C. neoformans* de origem ambiental apresentaram os mesmos valores de CIM para a AMB de 1,0 µg/mL, para 5FC de 2,0 a 4,0 µg/mL, para ICZ de 0,015 a 0,25 µg/mL, para FCZ de 1,0 a 4,0 µg/mL e para VCZ de 0,03 a 0,125 µg/mL. Com relação aos valores de CIM₅₀, CIM₉₀ e a MG foram para AMB de 1,0, 1,0, 1,0 µg/mL, para 5FC de 2,0, 4,0 e 2,3 µg/mL, para ICZ de 0,06, 0,25 e 0,06 µg/mL, para FCZ de 4,0, 4,0 e 2,46 µg/mL e para VCZ de 0,06, 0,125 e 0,05 µg/mL, respectivamente (Tabela 5 e Figura 8 e 10).

Para *C. gattii* de origem ambiental os valores de CIM variaram para AMB de 0,5 a 2,0 µg/mL, para 5FC de 1,0 a 2,0 µg/mL, para ICZ de 0,125 a 0,25 µg/mL, para FCZ de 4,0 a 16,0 µg/mL e para VCZ de 0,125 a 0,5 µg/mL. Com relação aos valores de CIM₅₀, CIM₉₀ e a MG foram para AMB 1,0, 2,0 e 1,12 µg/mL, para 5FC 2,0, 2,0 e 1,59 µg/mL, para ICZ 0,25, 0,25 e 0,18 µg/mL, para FCZ 8,0, 16,0 e 7,13 µg/mL e para VCZ 0,5, 0,5 e 0,28 µg/mL, respectivamente. Estes dados estão apresentados na Tabela 5 e Figura 9 e 10.

Tabela 5

Variação de CIM, valores de CIM₅₀, CIM₉₀ e MG dos antifúngicos testados para cepas de origem ambiental *C. neoformans* e *C. gattii* obtidos segundo o protocolo CLSI M27-A3 (2008).

Micro-organismos	Antifúngicos	CIM (µg/mL)			
		variação	50	90	MG
<i>C. neoformans</i> n=10	Anfotericina B	1,0	1,0	1,0	1,0
	Flucitosina	2,0 - 4,0	2,0	4,0	2,3
	Itraconazol	0,015 - 0,25	0,06	0,25	0,06
	Fluconazol	1,0 - 4,0	4,0	4,0	2,46
	Voriconazol	0,03 - 0,125	0,06	0,125	0,05
<i>C. gattii</i> n=6	Anfotericina B	0,5 - 2,0	1,0	2,0	1,12
	Flucitosina	1,0 - 2,0	2,0	2,0	1,59
	Itraconazol	0,125 - 0,25	0,25	0,25	0,18
	Fluconazol	4,0 - 16,0	8,0	16,0	7,13
	Voriconazol	0,125 - 0,5	0,5	0,5	0,28

MG- Média Geométrica, CIM – Concentração Inibitória Mínima

Figura 8
Representação gráfica da Tabela 5 - CLSI - M27-A3 – Variação de CIM em cepas ambientais de *C. neoformans*.

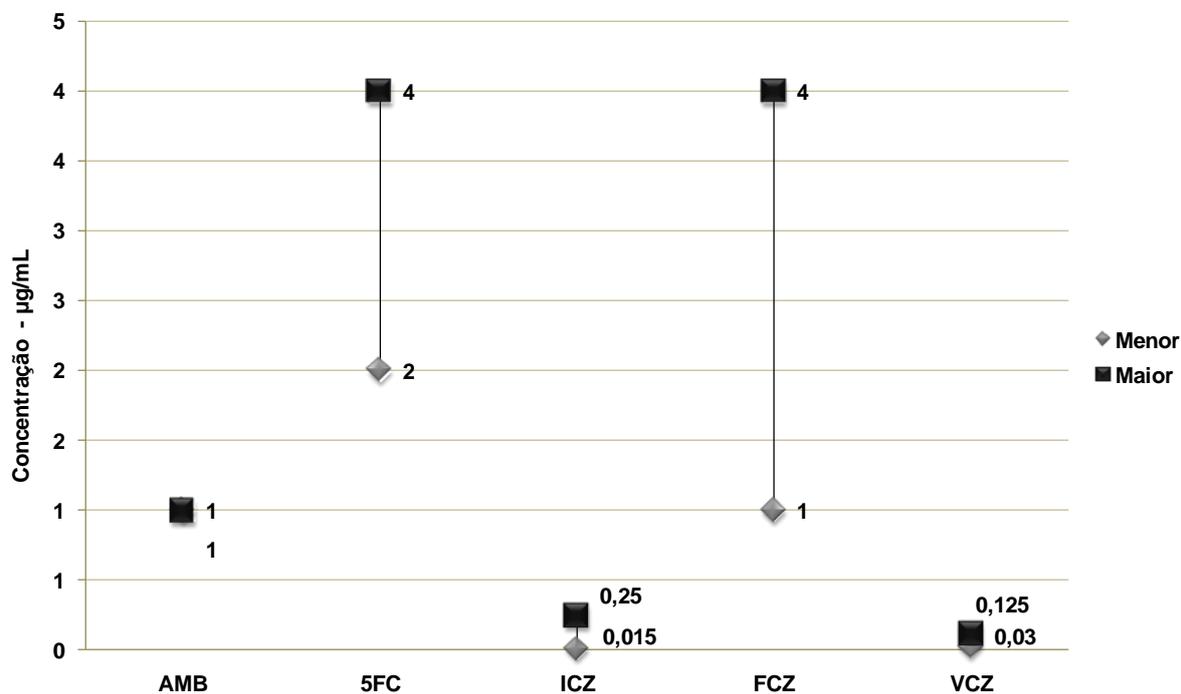


Figura 9
Representação gráfica da Tabela 5 - CLSI - M27-A3 – Variação de CIM em cepas ambientais de *C. gattii*.

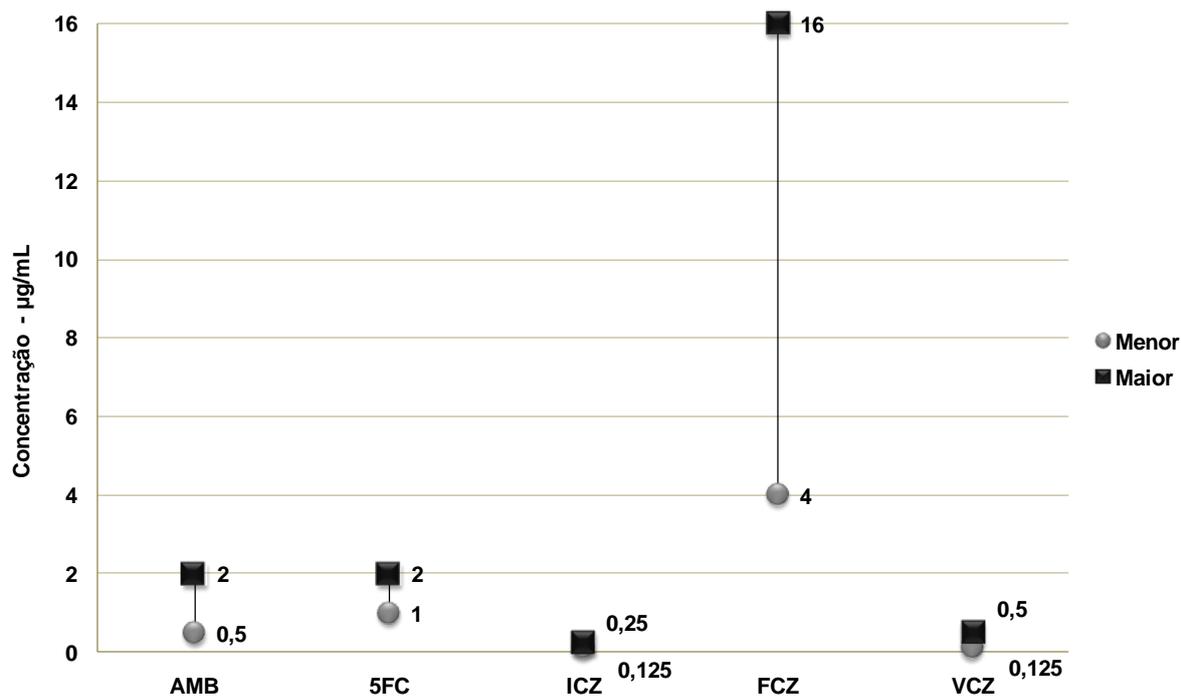
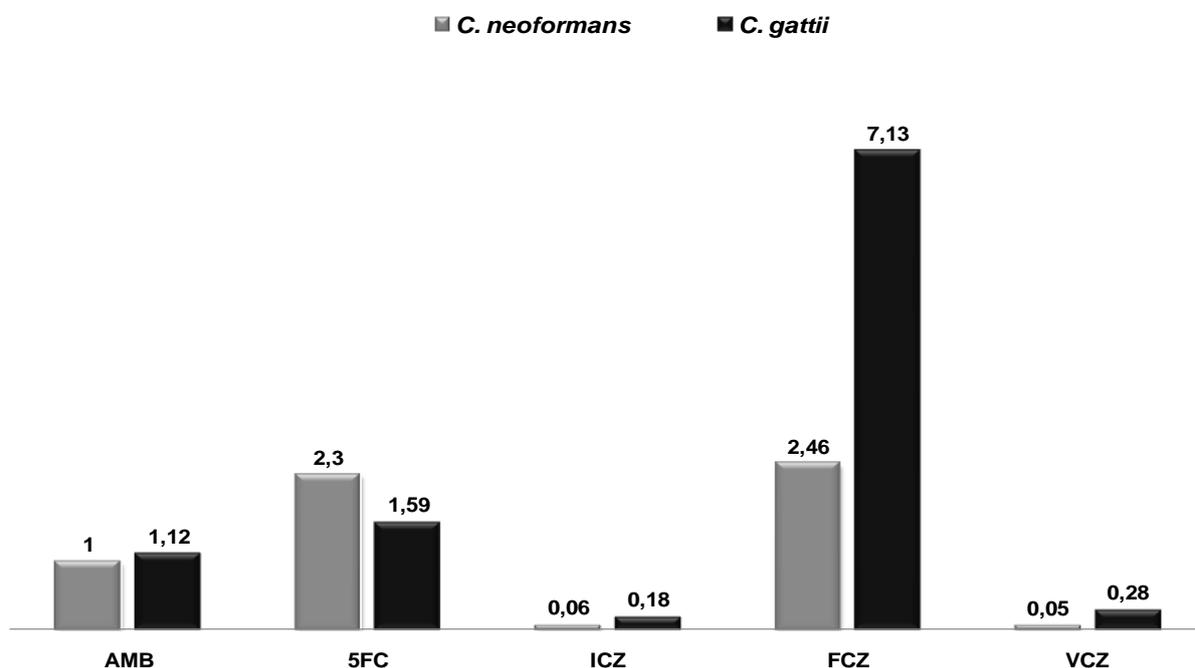


Figura 10

Representação gráfica da Tabela 5 - CLSI - M27-A3 – Média Geométrica em cepas ambientais de *C. neoformans* e *C. gattii*.



Com base no protocolo M27-A3 (CLSI, 2008) das dez cepas ambientais de *C. neoformans* estudadas, 100% foram classificadas como sensíveis à AMB, a 5FC, ao ICZ, ao FCZ e ao VCZ. Enquanto que para as seis cepas de *C. gattii*, 66,67% (4/6) foram classificadas como sensíveis à AMB, 50% (3/6) ao ICZ, 83,33% (5/6) ao FCZ e 100% sensíveis ao 5FC e ao VCZ. Em relação à S-DD foi de 50% (3/6) para ICZ e 16,67% (1/6) para FCZ e a resistência foi observada para AMB em 33,33% (2/6) das cepas analisadas (Figura 11 e 12).

Figura 11

Representação gráfica - CLSI - M27-A3 - % por categoria para cepas ambientais de *C. neoformans*.

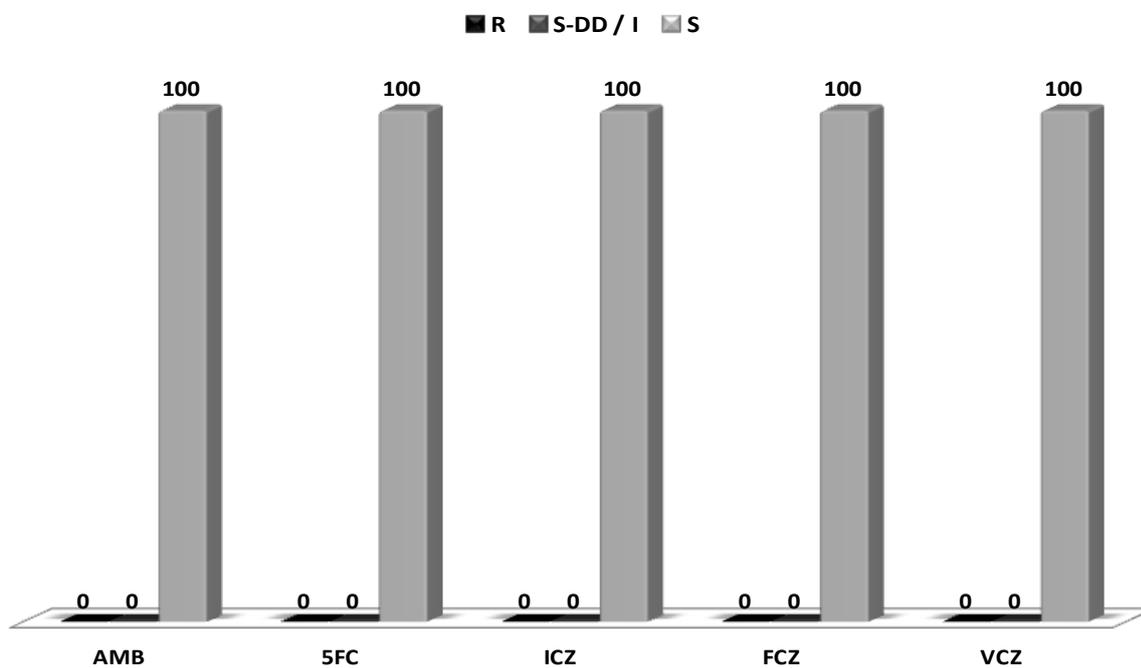
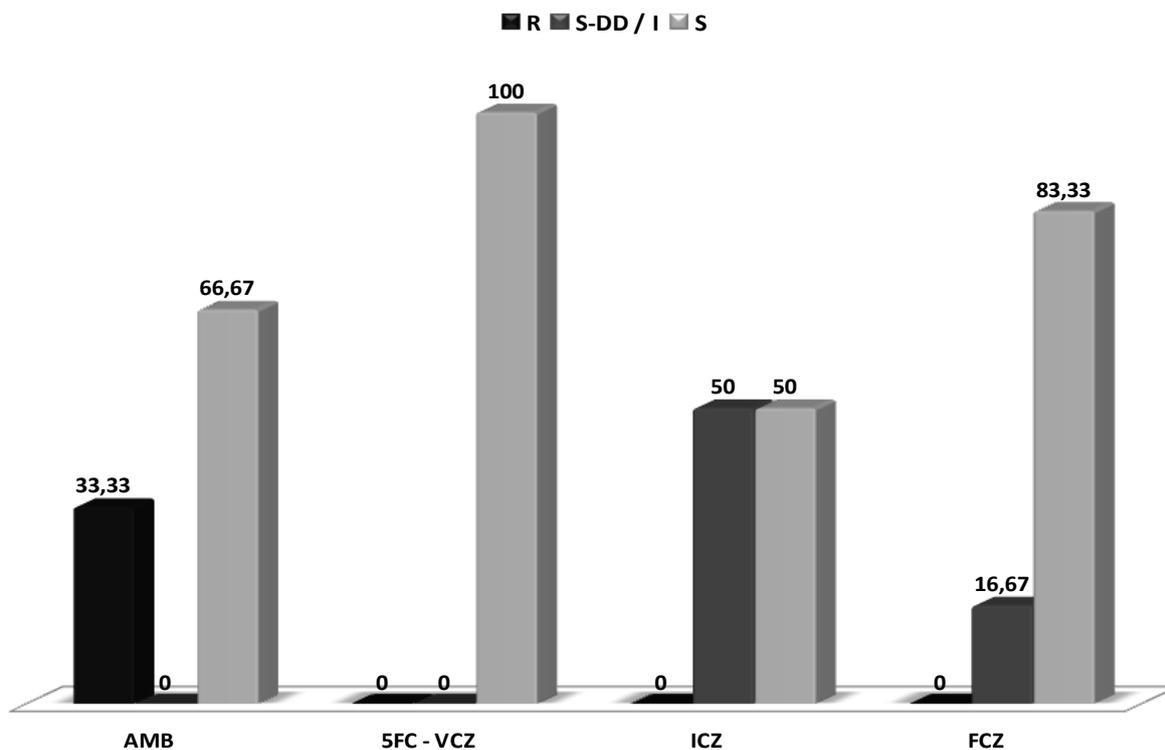


Figura 12

Representação gráfica - CLSI - M27-A3 - % por categoria para cepas ambientais de *C. gattii*.



Analisando os mesmos valores de CIM obtidos pelo CLSI e utilizando os parâmetros propostos por Aller e colaboradores (2000) para FCZ, as cepas de *C. neoformans* foram 100% sensíveis para FCZ, enquanto que uma cepa de *C. gattii* (1/6-16,67%) mostrou-se resistente ao FCZ. Essa cepa foi isolada de madeira em decomposição no interior de oco em árvore viva, *Theobroma cacao*, no AM.

Com base no ECV (Espinel-Ingroff et al., 2012) para AMB e 5FC as cepas de *C. neoformans* foram sensíveis, apresentaram os mesmos resultados obtidos pelo CLSI; entretanto foi observada resistência para AMB em 33,33% (2/6) em cepas de *C. gattii* isoladas de madeira em decomposição no interior de oco em árvore viva, *Guettarda acreana*, na Ilha de Maracá em RR.

4.3.2 Etest

Os valores de CIM para *C. neoformans* de origem clínica variaram para AMB de 0,04 a 0,5 µg/mL, para 5FC de 0,125 a 8,0 µg/mL, para ICZ de 0,023 a 1,0 µg/mL, para FCZ de 1,0 a 32,0 e para VCZ de 0,012 a 0,38 µg/mL. Com relação aos valores de CIM₅₀, CIM₉₀ e a MG foram para AMB 0,064, 0,125 e 0,08 µg/mL, para 5FC 4,0, 6,0 e 3,52 µg/mL, para ICZ 0,125, 0,75 e 0,14 µg/mL, para FCZ 6,0, 12,0 e 5,23 µg/mL e para VCZ 0,047, 0,064 e 0,04 µg/mL, respectivamente. Estes dados estão apresentados na Tabela 6 e Figuras 13 e 15.

Para *C. gattii* de origem clínica os valores de CIM variaram para AMB de 0,03 a 0,19 µg/mL, para 5FC de 0,125 a 6,0 µg/mL, para ICZ de 0,064 a 1,5 µg/mL, para FCZ de 2,0 a 48,0 µg/mL e para VCZ de 0,023 a 0,5 µg/mL. Com relação aos valores de CIM₅₀, CIM₉₀ e a MG foram para AMB 0,094, 0,125 e 0,08 µg/mL, para 5FC 1,0, 4,0 e 1,14 µg/mL, para ICZ 0,38, 1,0 e 0,31 µg/mL, para FCZ 8,0, 24,0 e 9,93 µg/mL e para VCZ 0,094, 0,38 e 0,10 µg/mL, respectivamente. Estes dados estão apresentados na Tabela 6 e Figuras 14 e 15

Tabela 6

Variação de CIM, valores de CIM₅₀, CIM₉₀ e MG dos antifúngicos testados para *C. neoformans* *C. gattii* e de origem clínica obtidos segundo o protocolo Etest.

Micro-organismos	Antifúngicos	CIM (µg/mL)			
		variação	50%	90%	MG
<i>C. neoformans</i> n=99	Anfotericina B	0,04 - 0,5	0,064	0,125	0,08
	Flucitosina	0,125 - 8,0	4,0	6,0	3,52
	Itraconazol	0,023 - 1,0	0,125	0,75	0,14
	Fluconazol	1,0 - 32,0	6,0	12,0	5,23
	Voriconazol	0,012 - 0,38	0,047	0,064	0,04
<i>C. gattii</i> n=61	Anfotericina B	0,03 - 0,19	0,094	0,125	0,08
	Flucitosina	0,125 - 6,0	1,0	4,0	1,14
	Itraconazol	0,064 - 1,5	0,038	1,0	0,31
	Fluconazol	2,0 - 48,0	8,0	24,0	9,93
	Voriconazol	0,023 - 0,5	0,094	0,38	0,10

MG – Media Geométrica, CIM – Concentração Inibitória Mínima

Figura 13

Representação gráfica da Tabela 6 - Etest - Variação de CIM em cepas clínicas de *C. neoformans*.

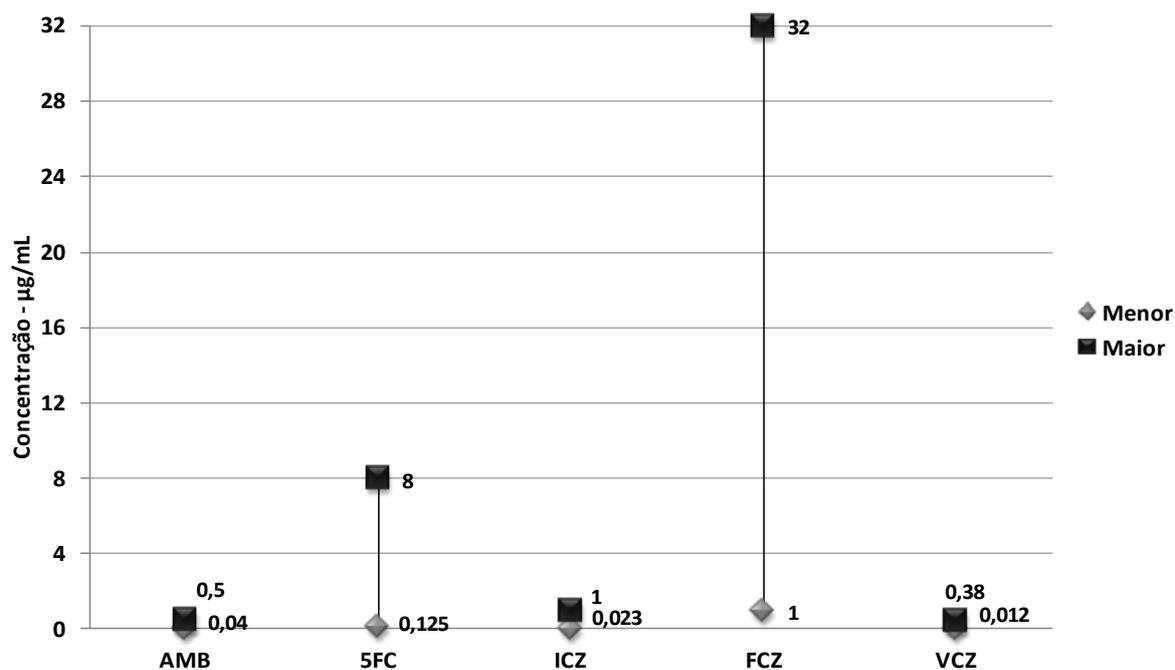


Figura 14

Representação gráfica da Tabela 6 - Etest - Variação de CIM em cepas clínicas de *C. gattii*.

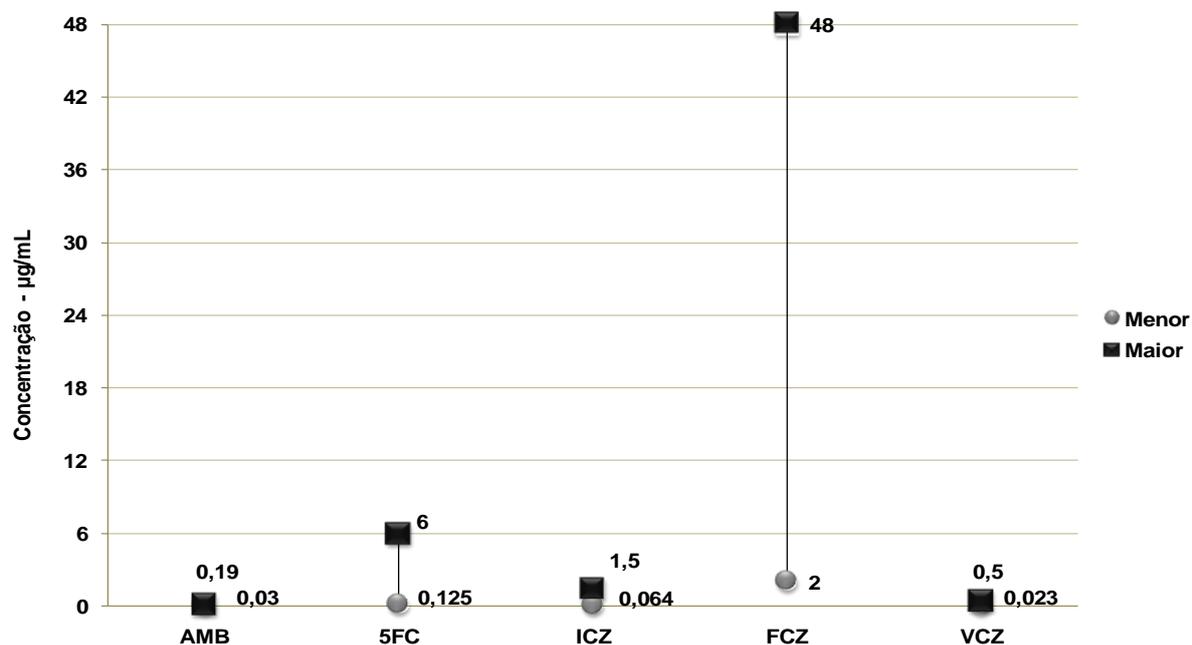
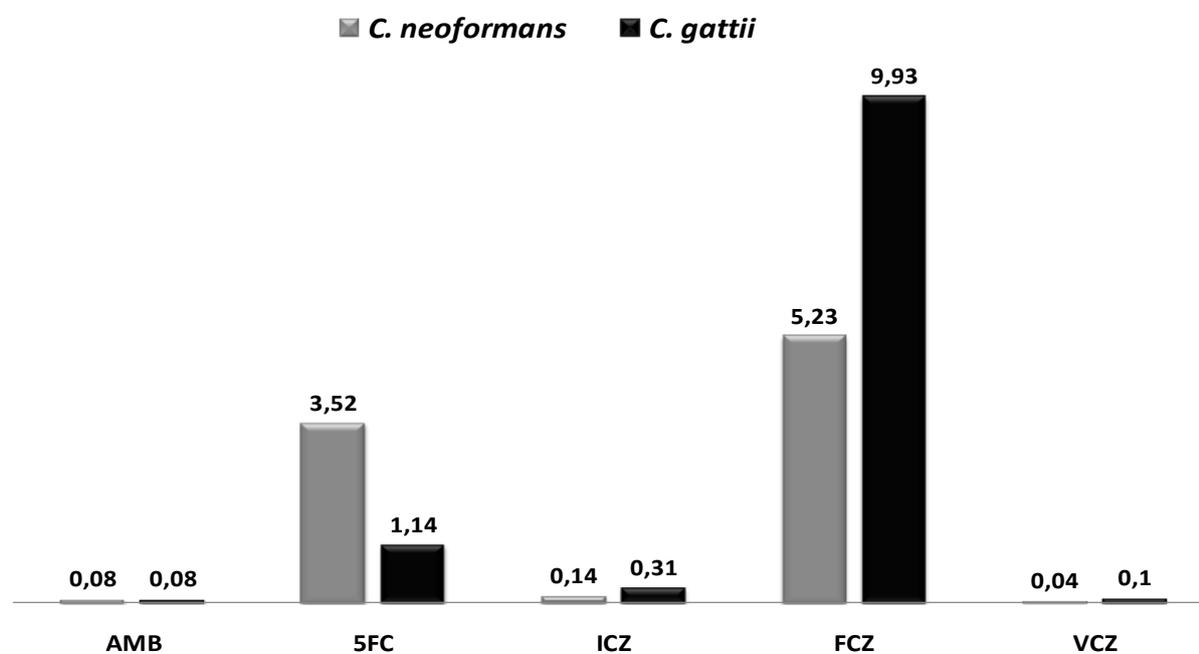


Figura 15

Representação gráfica da Tabela 6 - Etest - Média Geométrica em cepas clínicas de *C. neoformans* e *C. gattii*.



Com base no protocolo M27-A3 (CLSI, 2008) as cepas de *C. neoformans* foram classificadas 100% sensíveis para AMB e VCZ, para 5FC 86,9% (86/99), ao ICZ 62,63% (62/99) e ao FCZ 95% (94/99). Para *C. gattii* foram classificadas 100% sensíveis para AMB, 5FC e VCZ, para ICZ 32,78% (20/61) e para FCZ 60,7% (37/61). Em relação à S-DD, em cepas de *C. neoformans* foi para 5FC 12% (12/99), para ICZ 32,3% (32/99) e para FCZ 5,05% (5/99). Para *C. gattii* os valores encontrados foram para ICZ 49,2 (30/61) e para FCZ 36% (22/61). Para a resistência *in vitro*, em cepas de *C. neoformans*, foi observada para 5FC 1% (1/99) e para ICZ 5,05% (5/99). Para *C. gattii* foi observado para ICZ 18,03% (11/61) e para FCZ 3,3% (2/61). Estes dados estão apresentados na Tabela 7 e Figuras 16 e 17.

Analisando os mesmos resultados de CIM obtidos pelo Etest e utilizando os parâmetros propostos por Aller e colaboradores (2000) para FCZ, 95% (94/99) das cepas de *C. neoformans* foram sensíveis e 5% (5/99) resistentes, enquanto que 60,7% (37/61) das cepas de *C. gattii* mostraram-se sensíveis e 39,3% (24/61) resistentes (Tabela 7).

Com base no ECV (Espinel-Ingroff et al., 2012) para AMB, tanto as cepas de *C. neoformans* quanto as cepas de *C. gattii*, apresentaram os mesmos resultados obtido pelo CLSI. Para 5FC todas as a cepas *C. gattii* foram sensíveis, esses resultados também foram observados pelo CLSI. Cepas de *C. neoformans* mostraram-se sensíveis a 5FC enquanto que pelo CLSI parte destas foram S-DD (Tabela 7).

Tabela 7

Comparação dos percentuais de sensibilidade aos antifúngicos testados pelo Etest, pelos parâmetros propostos no protocolo CLSI M27-A3, por Aller e colaboradores (2000), e S e R com base no ECV proposto por Espinel-Ingroff e colaboradores (2012) para cepas de *C. neoformans* e *C. gattii* de origem clínica.

Micro-organismos	Antifúngicos	% por categoria - CLSI			Aller et al. (2000)		Espinel-Ingroff et al. (2012)	
		S	S-DD / I	R	S	R	S	R
<i>C. neoformans</i> n=99	Anfotericina B	100	0	0	-	-	100	-
	Flucitosina	86,9(86/99)	12(12/99)	1,01(1/99)	-	-	98,99(98/99)	1,01(1/99)
	Itraconazol	62,63(62/99)	32,3(32/99)	5,05(5/99)	-	-	-	-
	Fluconazol	95(94/99)	5(5/99)	0	95(94/99)	5(5/99)	-	-
	Voriconazol	100	0	0	-	-	-	-
<i>C. gattii</i> n=61	Anfotericina B	100	0	0	-	-	100	-
	Flucitosina	100	0	0	-	-	100	-
	Itraconazol	32,78(20/61)	49,2(30/61)	18(11/61)	-	-	-	-
	Fluconazol	60,7(37/61)	36(22/61)	3,3(2/61)	60,7(37/61)	39,3(24/61)	-	-
	Voriconazol	100	0	0	-	-	-	-

S – sensível, S-DD – sensível dose dependente, I – intermediário, R – resistente

Figura 16

Representação gráfica da Tabela 7 - Etest - % por categoria para cepas clínicas de *C. neoformans*.

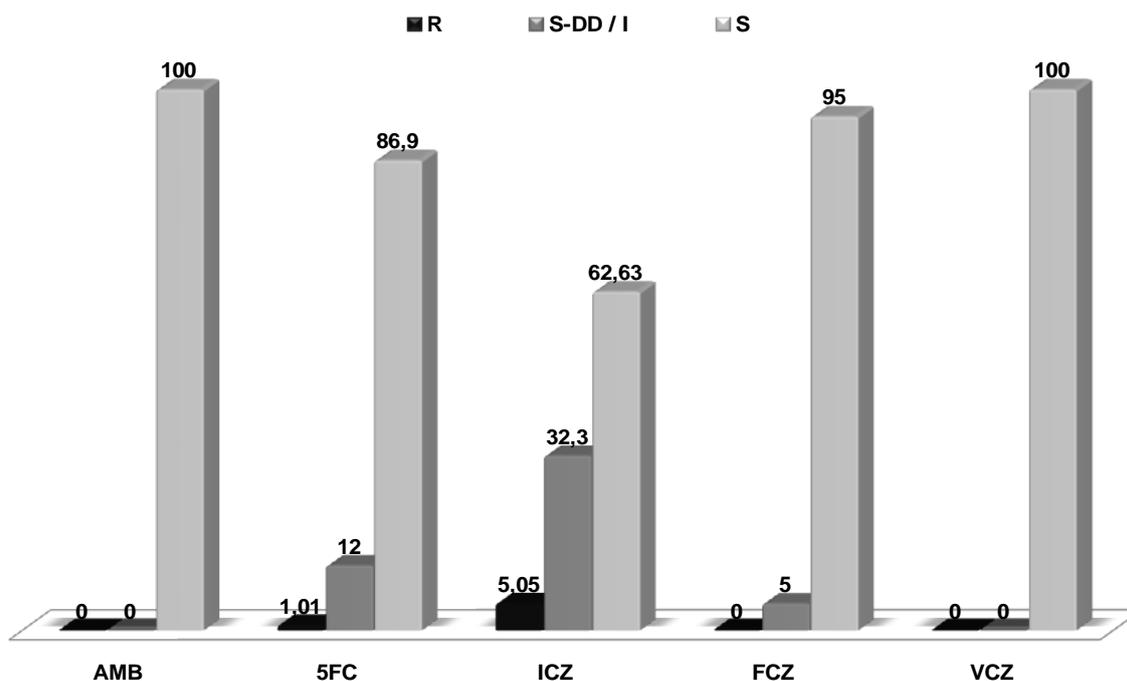
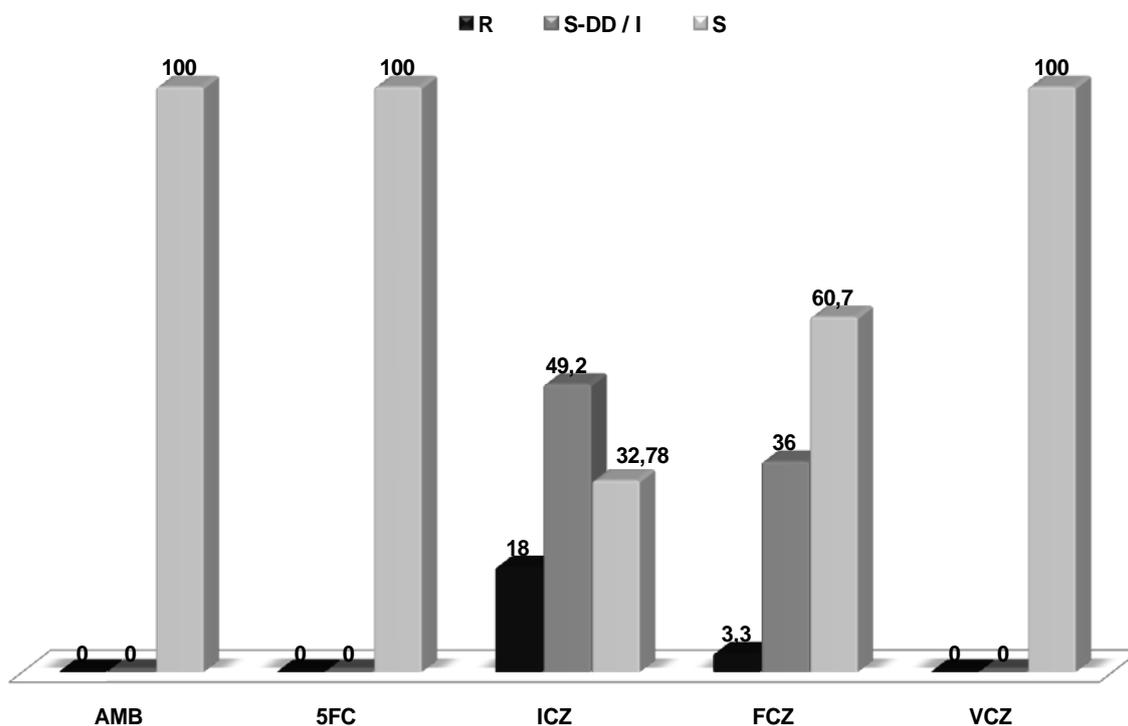


Figura 17

Representação gráfica da Tabela 7 - Etest - % por categoria para cepas clínicas de *C.gattii*.



Os valores de CIM para *C. neoformans* de origem ambiental variaram para AMB de 0,064 a 0,19 $\mu\text{g/mL}$, para 5FC de 0,094 a $\geq 32,0$ $\mu\text{g/mL}$, para ICZ de 0,032 a 1,0 $\mu\text{g/mL}$, para FCZ de 1,5 a 16,0 e para VCZ de 0,064 a 0,125 $\mu\text{g/mL}$. Com relação aos valores de CIM₅₀, CIM₉₀ e a MG foram para AMB 0,094, 0,125 e 0,1 $\mu\text{g/mL}$, para 5FC 4,0, 12,0 e 3,37 $\mu\text{g/mL}$, para ICZ 0,5, 1,0 e 0,22 $\mu\text{g/mL}$, para FCZ 8,0, 16,0 e 5,25 $\mu\text{g/mL}$ e para VCZ 0,064, 0,125 e 0,05 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Tabela 8 e Figuras 18 e 20).

Para *C. gattii* de origem ambiental os valores de CIM variaram para AMB de 0,094 a 0,19 $\mu\text{g/mL}$, para 5FC 0,5 a 3,0 $\mu\text{g/mL}$, para ICZ de 0,5 a 2,0 $\mu\text{g/mL}$, para FCZ 12,0 a 32,0 $\mu\text{g/mL}$ e para VCZ de 0,06 a 0,5 $\mu\text{g/mL}$. Com relação aos valores de CIM₅₀, CIM₉₀ e a MG foram para AMB 0,125, 0,19 e 0,12 $\mu\text{g/mL}$, para 5FC 0,75, 3,0 e 0,88 $\mu\text{g/mL}$, para ICZ 1,0, 2,0 e 0,91 $\mu\text{g/mL}$, para FCZ 24,0, 32,0 e 20,97 $\mu\text{g/mL}$ e para VCZ 0,25, 0,5 e 0,15 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Estes dados estão apresentados na Tabela 8 e Figuras 19 e 20.

Tabela 8

Variação de CIM, valores de CIM₅₀, CIM₉₀ e MG dos antifúngicos testados para *C. neoformans* e *C. gattii* de origem ambiental obtidos segundo o protocolo Etest.

Micro-organismos	Antifúngicos	CIM (µg/mL)			
		variação	50	90	MG
<i>C. neoformans</i> n=10	Anfotericina B	0,064 - 0,19	0,094	0,125	0,10
	Flucitosina	0,094 - ≥ 32,0	4,0	12,0	3,37
	Itraconazol	0,032 - 1,0	0,5	1,0	0,22
	Fluconazol	1,5 - 16,0	8,0	16,0	5,25
	Voriconazol	0,064 - 0,125	0,06	0,125	0,05
<i>C. gattii</i> n=6	Anfotericina B	0,094 - 0,19	0,125	0,19	0,12
	Flucitosina	0,5 - 3,0	0,75	3,0	0,88
	Itraconazol	0,5 - 2,0	1,0	2,0	0,91
	Fluconazol	12,0 - 32,0	24,0	32,0	20,97
	Voriconazol	0,06 - 0,5	0,25	0,50	0,15

MG- Média Geométrica, CIM – Concentração Inibitória Mínima

Figura 18

Representação gráfica da Tabela 8 - Etest - Variação de CIM em cepas ambientais de *C. neoformans*.

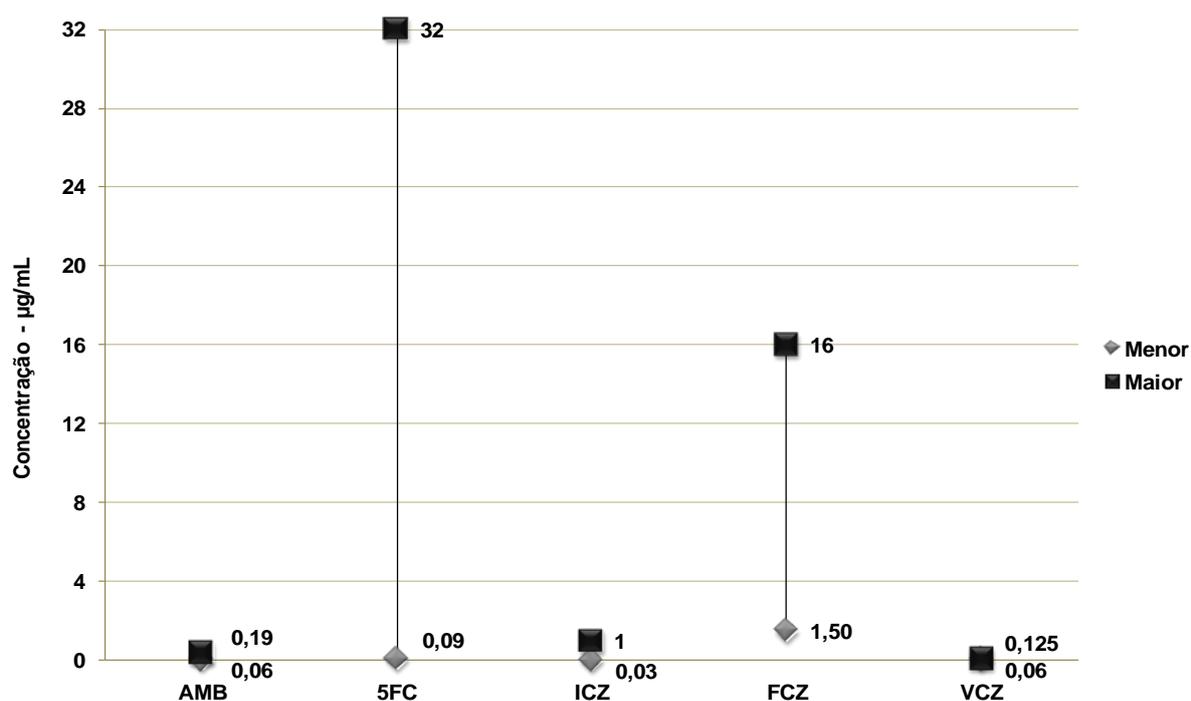


Figura 19

Representação gráfica da Tabela 8 - Etest - Variação de CIM em cepas ambientais de *C. gattii*.

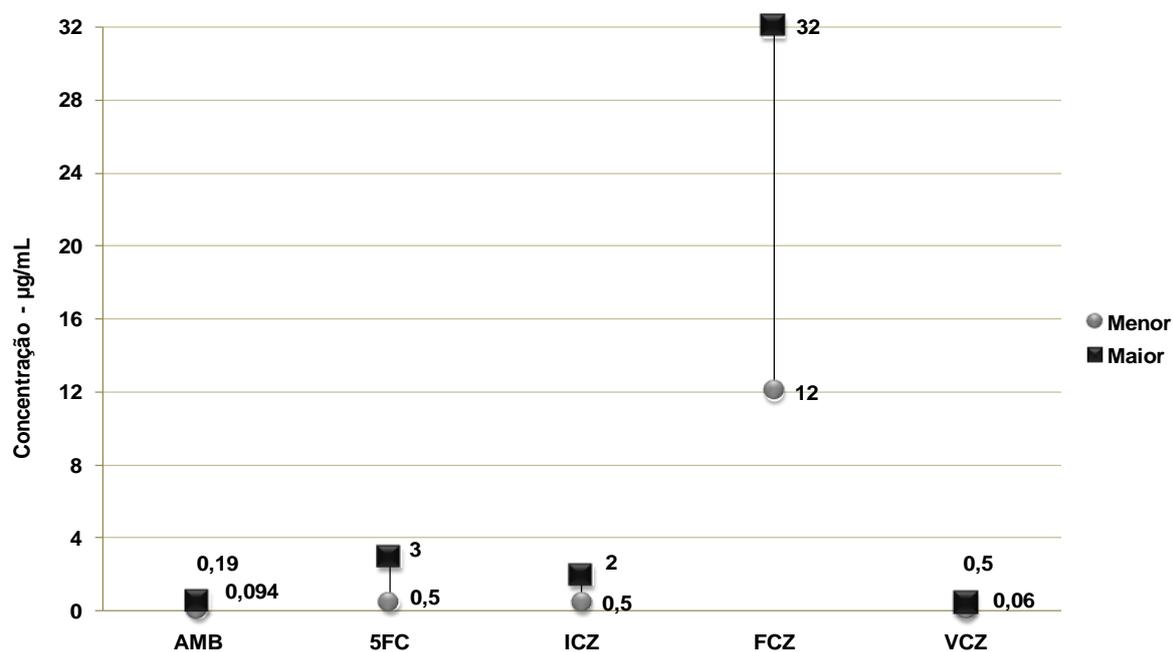
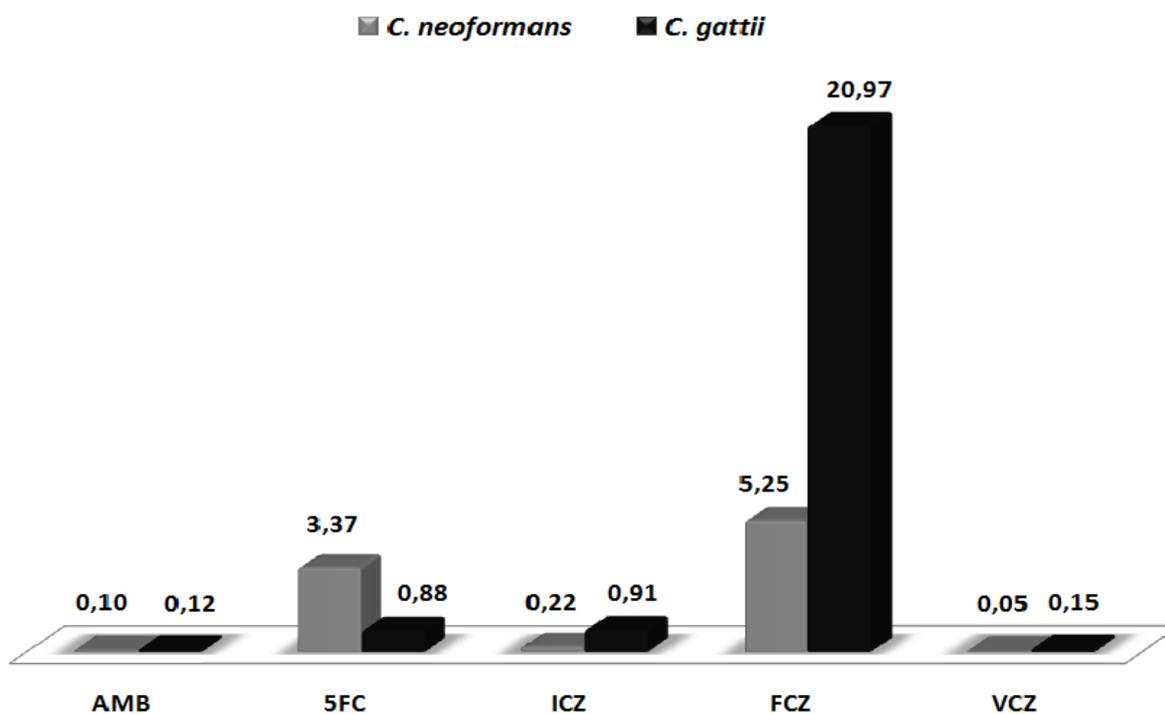


Figura 20

Representação gráfica da Tabela 8 - Etest – Média Geométrica em cepas ambientais de *C. neoformans* e *C. gattii*.



Analisando os mesmos resultados de CIM obtidos pelo Etest para as cepas de origem ambiental e utilizando os parâmetros propostos por Aller e colaboradores (2000) para FCZ, 90% (9/10) foram sensíveis e 10% (1/10) resistentes para cepas de *C. neoformans*, enquanto que 33,33% (2/6) das cepas de *C. gattii* mostraram-se sensíveis e 66,67% (4/6) resistentes (Figuras 21 e 22).

Com base no ECV (Espinel-Ingroff et al., 2012) para AMB tanto as cepas de *C. neoformans* quanto as cepas de *C. gattii*, apresentaram os mesmos resultados obtido pelo CLSI (Figuras 21 e 22).

Figura 21

Representação gráfica - Etest - % por categoria para cepas ambientais de *C. neoformans*.

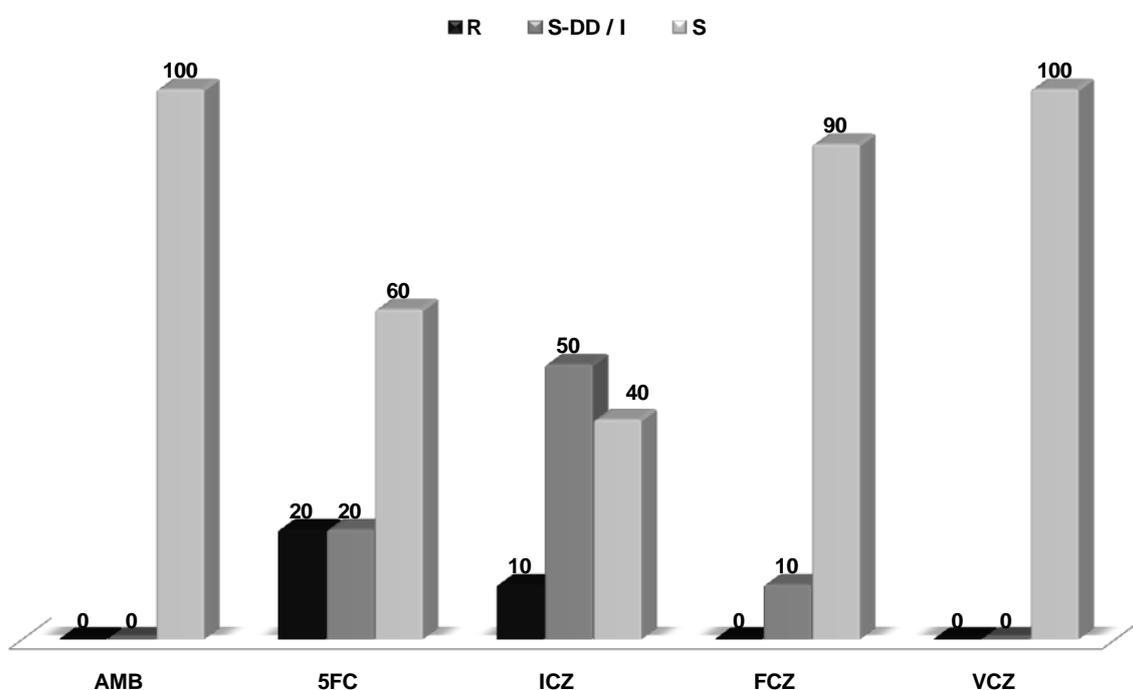
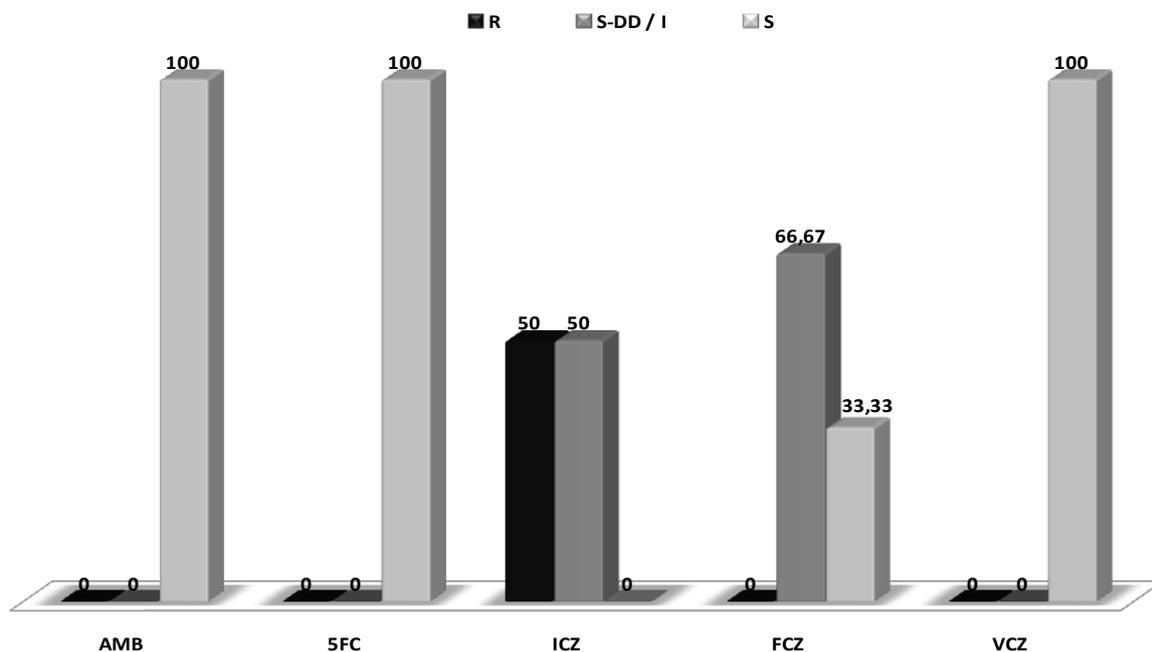


Figura 22

Representação gráfica - Etest - % por categoria para cepas ambientais de *C. gattii*



4.3.3 Vitek 2 Compact

A partir dos resultados emitidos pelo sistema automatizado Vitek 2, onde a CIM foi expressa como menor ou igual (\leq) a uma concentração do antifúngico, no presente trabalho estabeleceu-se este número como igual/real para base de cálculo dos valores de CIM₅₀, CIM₉₀ e a MG.

Os valores de CIM para *C. neoformans* de origem clínica variaram para AMB de 0,25 a 2,0 g/mL, para 5FC de $\leq 1,0$ a 2,0 $\mu\text{g/mL}$, para FCZ de $\leq 1,0$ a 2,0 e para VCZ de $\leq 0,125$ $\mu\text{g/mL}$. Os valores de CIM₅₀, CIM₉₀ e a MG foram para AMB 1,0, 1,0 e 0,85 $\mu\text{g/mL}$, para 5FC 1,0, 2,0 e 1,2 $\mu\text{g/mL}$, para FCZ 2,0, 2,0 e 1,53 $\mu\text{g/mL}$ e para VCZ 0,125, 0,125 e 0,125 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Tabela 9 e Figuras 23 e 25). O tempo de leitura do cartão AST-YSO1 pelo aparelho, para determinar o valor de CIM, variou de 15:25 a 27:50h para *C. neoformans*.

Para *C. gattii* de origem clínica os valores de CIM variaram para AMB de 0,5 a 4,0 $\mu\text{g/mL}$, para 5FC de $\leq 1,0$ a 4,0 $\mu\text{g/mL}$, para FCZ de $\leq 1,0$ a 32,0 $\mu\text{g/mL}$ e para VCZ de $\leq 0,125$ a 0,25 $\mu\text{g/mL}$. Os valores de CIM₅₀, CIM₉₀ e a MG foram para AMB

1,0, 1,0 e 0,97 µg/mL, para 5FC 1,0, 2,0 e 1,15 µg/mL, para FCZ 4,0, 8,0 e 3,56 µg/mL e para VCZ ≤ 0,125, 0,125 e 0,125 µg/mL, respectivamente. O tempo de leitura do cartão AST-YSO1 pelo aparelho, para determinar o valor de CIM para *C. gattii* variou de 15:00 a 25:25h. Os dados descritos acima estão apresentados na Tabela 9 e Figuras 24 e 25.

Tabela 9

Variação de CIM, valores de CIM₅₀, CIM₉₀ e MG aos antifúngicos testados para *C. neoformans* e *C. gattii* de origem clínica obtidos segundo o Sistema Vitek 2.

Micro-organismos	Antifúngicos	CIM (µg/mL)			
		variação	50%	90%	MG
<i>C. neoformans</i> n=99	Anfotericina B	≤ 0,25 - 2,0	1,0	1,0	0,85
	Flucitosina	≤ 1,0 - 2,0	1,0	2,0	1,2
	Fluconazol	≤ 1,0 - 2,0	2,0	2,0	1,53
	Voriconazol	≤ 0,125	0,125	0,125	0,125
<i>C. gattii</i> n=61	Anfotericina B	0,5 - 4,0	1,0	1,0	0,97
	Flucitosina	≤ 1,0 - 4,0	1,0	2,0	1,15
	Fluconazol	≤ 1 - 32,0	4,0	8,0	3,56
	Voriconazol	≤ 0,125 - 0,25	0,125	0,125	0,125

MG – Média Geométrica, CIM – Concentração Inibitória Mínima

Figura 23

Representação gráfica da Tabela 9 – Vitek 2 - Variação de CIM em cepas clínicas de *C. neoformans*.

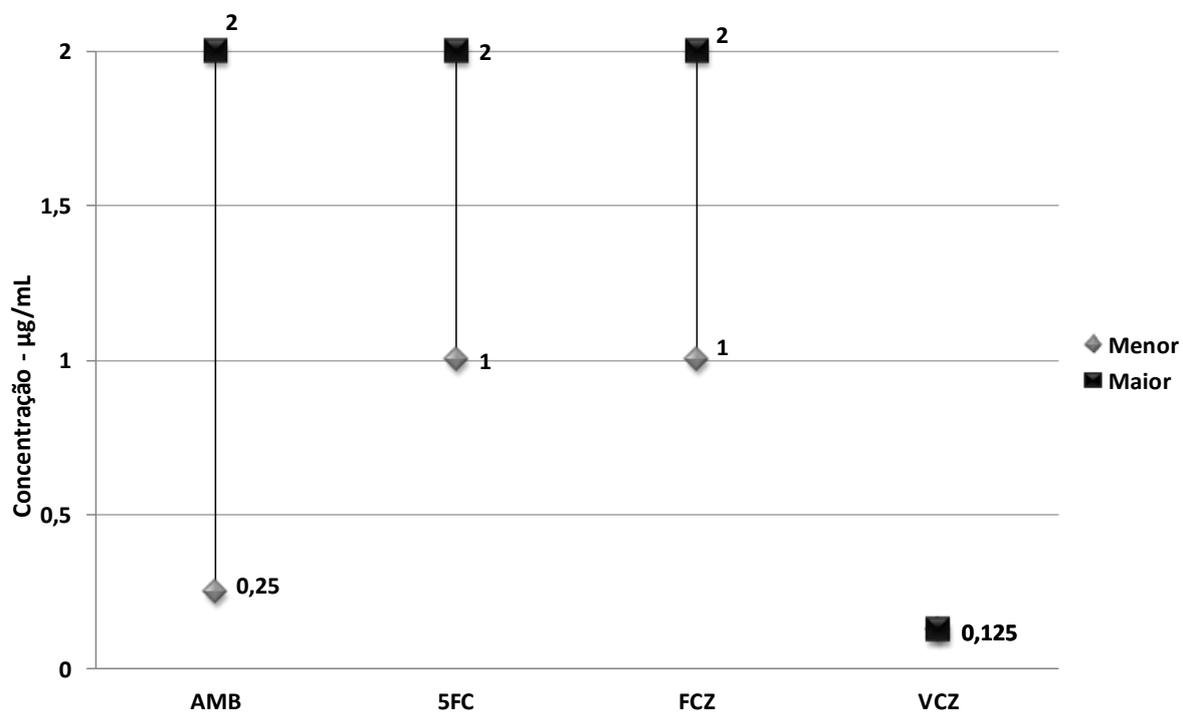


Figura 24

Representação gráfica da Tabela 9 - Vitek 2 - Variação de CIM em cepas clínicas de *C. gattii*.

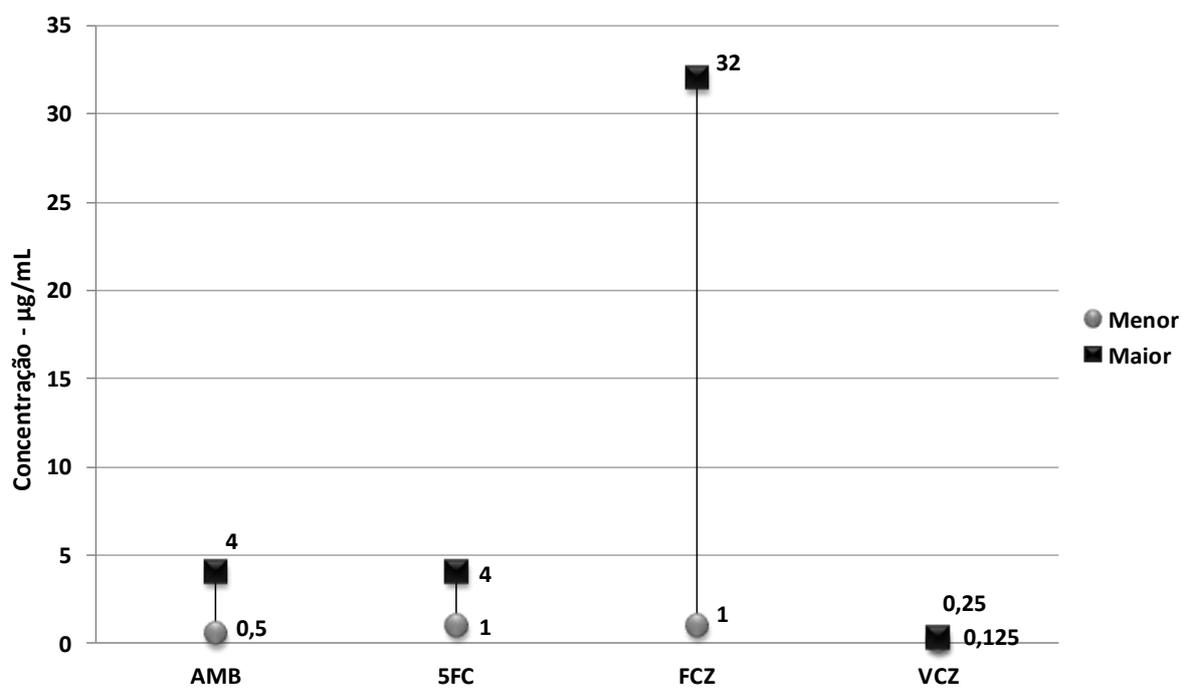
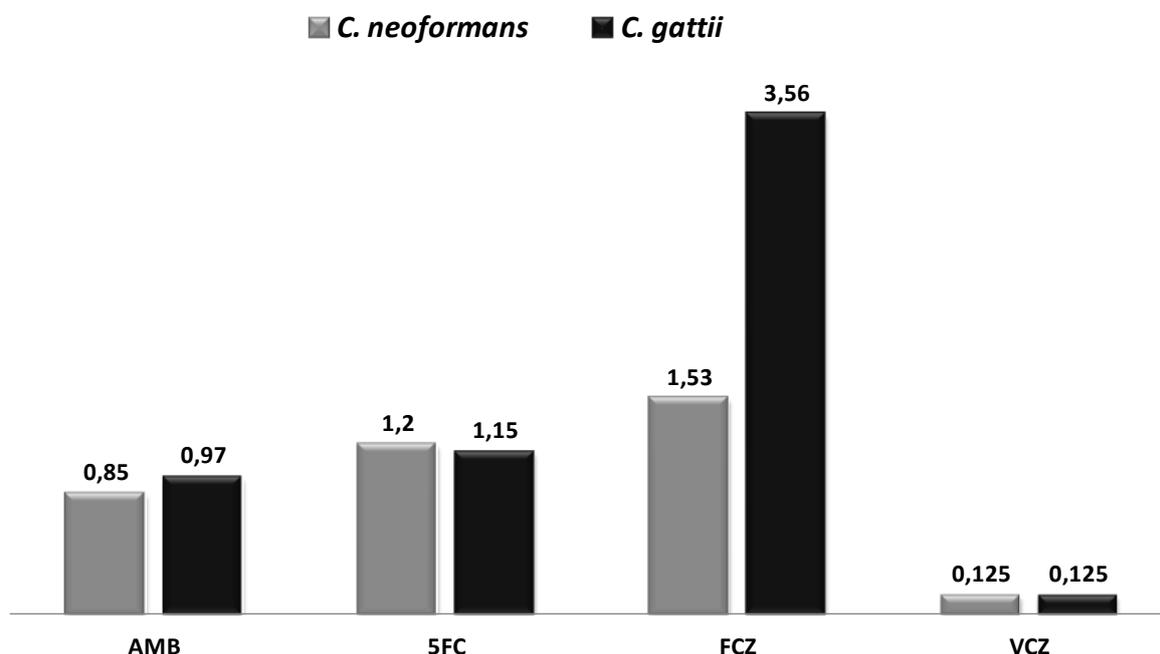


Figura 25

Representação gráfica da Tabela 9 – Vitek 2 – Média Geométrica em cepas clínicas de *C. neoformans* e *C. gattii*.



Com base no protocolo M27-A3 (CLSI, 2008) analisando os resultados de CIM obtidos pelo Vitek 2, 98,99% (98/99) das cepas de *C. neoformans* foram classificadas como sensíveis à AMB e 100% sensíveis a 5FC, ao FCZ e ao VCZ. Do mesmo modo, 93,44% (57/61) das cepas de *C. gattii* foram sensíveis à AMB, 93,44% (57/61) ao FCZ, e 100% a 5FC e ao VCZ. Em relação à S-DD foi observada em 6,56% (4/61) em *C. gattii* para o FCZ. A resistência *in vitro* foi observada em 1,01% (1/99) para *C. neoformans* e 6,56% (4/61) para *C. gattii* frente à AMB (Tabela 10 e Figuras 26 e 27).

Analisando os mesmos resultados de CIM obtidos pelo Vitek 2 e utilizando os parâmetros propostos por Aller e colaboradores (2000) para FCZ, 100% das cepas de *C. neoformans* foram sensíveis. Para as cepas de *C. gattii* 93,44% (57/61) mostraram-se sensíveis e 6,56% (4/61) foram resistentes. Com base no ECV (Espinel-Ingroff et al., 2012) para AMB, tanto as cepas de *C. neoformans* quanto as cepas de *C. gattii*, apresentaram o mesmo resultado obtido pelo CLSI, sendo a resistência *in vitro* observada em 1,01% (1/99) para *C. neoformans* e 6,56% (4/61) para *C. gattii* (Tabela 10 e Figuras 26 e 27).

Tabela 10

Comparação dos percentuais de sensibilidade aos antifúngicos testados pelo sistema Vitek 2, pelos parâmetros propostos no protocolo CLSI M27-A3, por Aller e colaboradores (2000), e S e R com base no ECV proposto por Espinel-Ingroff e colaboradores (2012) para cepas de *C. neoformans* e *C. gattii* de origem clínica.

Micro-organismos	Antifúngicos	% por Categoria - CLSI			Aller et al. (2000)		Espinel-Ingroff et al. (2012)	
		S	S-DD / I	R	S	R	S	R
<i>C. neoformans</i> n=99	Anfotericina B	98,99(98/99)	0	1,01(1/99)	–	–	98,99(98/99)	1,01(1/99)
	Flucitosina	100	0	0	–	–	100	–
	Fluconazol	100	0	0	100	0	–	–
	Voriconazol	100	0	0	–	–	–	–
<i>C. gattii</i> n=61	Anfotericina B	93,44(57/61)	0	6,56(4/61)	–	–	93,44(57/61)	6,56(4/61)
	Flucitosina	100	0	0	–	–	100	–
	Fluconazol	93,44(57/61)	6,56(4/61)	0	93,44(57/61)	6,56(4/61)	–	–
	Voriconazol	100	0	0	–	–	–	–

S – sensível, S-DD – sensível dose dependente, I – intermediário, R – resistente

Figura 26

Representação gráfica da Tabela 10 – Vitek 2 - % por categoria para cepas clínicas de *C. neoformans*.

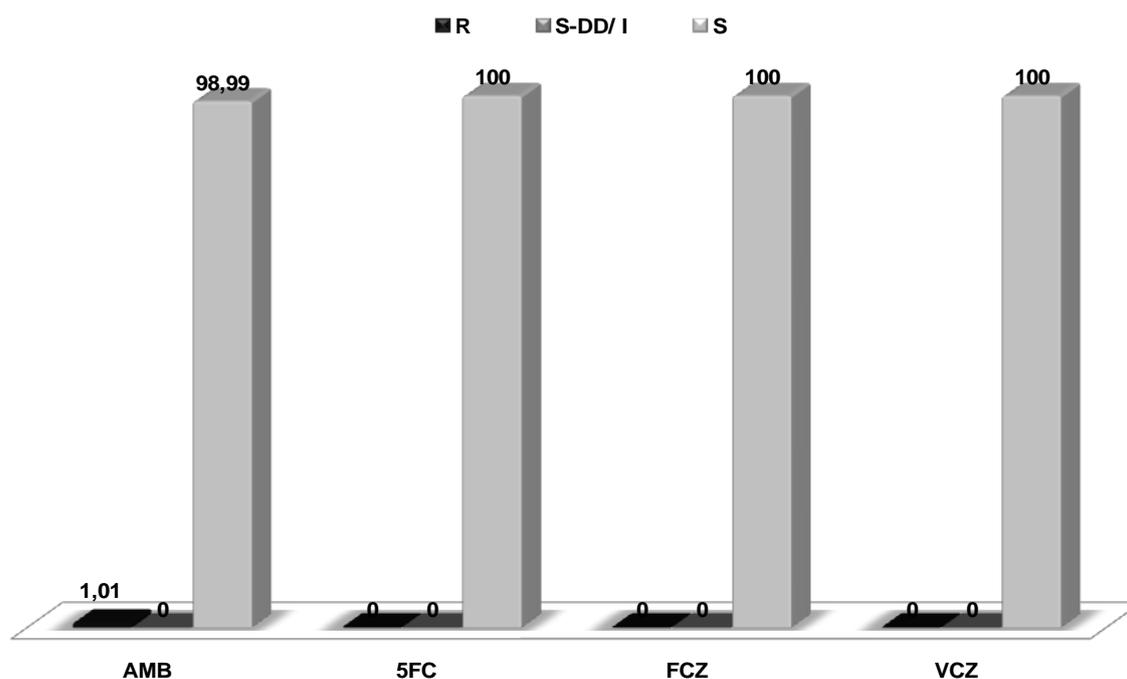
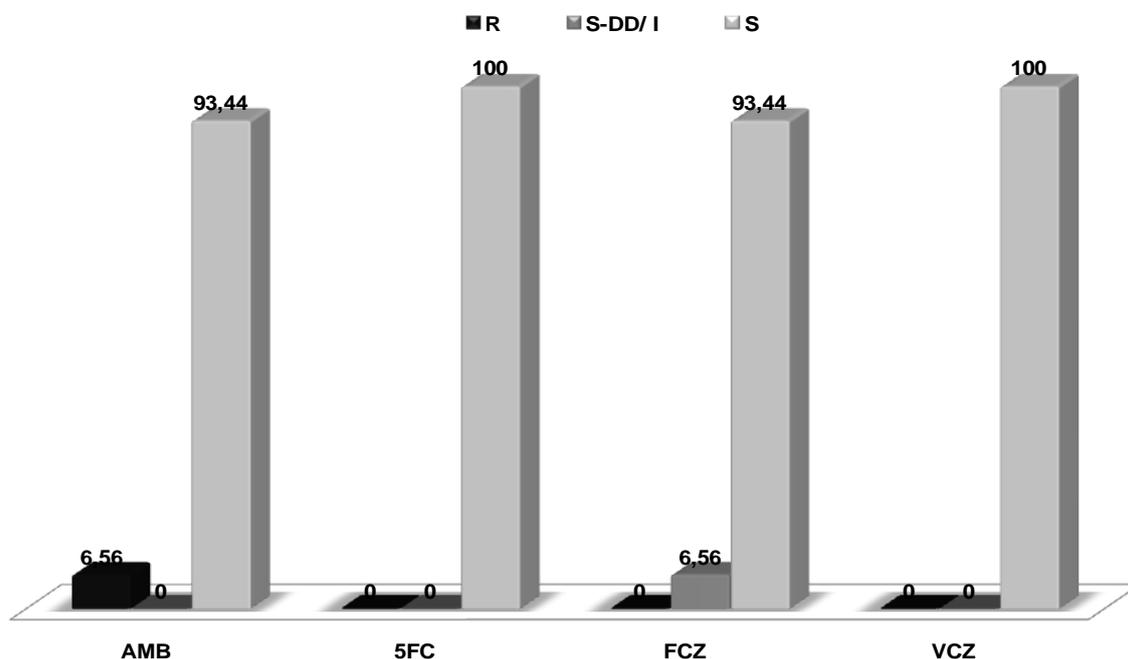


Figura 27

Representação gráfica da Tabela 10 – Vitek 2 - % por categoria para cepas clínicas de *C.gattii*.



Os valores de CIM para *C. neoformans* de origem ambiental foram para AMB de 1,0 µg/mL, para 5FC de ≤1,0 a 2,0 µg/mL, para FCZ de ≤1,0 a 4,0 e para VCZ de ≤ 0,125 µg/mL. Os valores de CIM₅₀, CIM₉₀ e a MG foram para AMB 1,0, 1,0 e 1,0 µg/mL, para 5FC 1,0, 2,0 e 1,07 µg/mL, para FCZ 2,0, 2,0 e 1,74 µg/mL e para VCZ 0,125, 0,125 e 0,125 µg/mL, respectivamente. O tempo de leitura do cartão AST-YSO1 pelo aparelho, para determinar o valor de CIM, variou de 15:25 a 22:15h para *C. neoformans* (Tabela 11 e Figuras 28 e 30).

Para *C. gattii* de origem ambiental os valores de CIM foram para AMB de 1,0 µg/mL, para 5FC ≤ 1,0 µg/mL, para FCZ de ≤1,0 a 2,0 µg/mL e para VCZ de ≤ 0,125 µg/mL. Os valores de CIM₅₀, CIM₉₀ e a MG foram para AMB 1,0, 1,0 e 1,0 µg/mL, para 5FC 1,0, 1,0 e 1,0 µg/mL, para FCZ 1,0, 2,0 e 1,56 µg/mL e para VCZ 0,125, 0,125 e 0,125 µg/mL, respectivamente. O tempo de leitura do cartão AST-YSO1 pelo aparelho, para determinar o valor de CIM para *C. gattii* variou de 18:25 a 22:15h. Estes dados estão apresentados na Tabela 11 e Figuras 29 e 30.

Tabela 11

Variação de CIM, valores de CIM₅₀, CIM₉₀ e MG aos antifúngicos testados para *C. gattii* e *C. neoformans* de origem ambiental obtidos segundo o Sistema Vitek 2.

Micro-organismos	Antifúngicos	CIM (µg/mL)			
		variação	0,50	0,90	MG
<i>C. neoformans</i> n=10	Anfotericina B	1,0	1,0	1,0	1,0
	Flucitosina	≤ 1,0 - 2,0	1,0	2,0	1,07
	Fluconazol	≤ 1 - 4,0	2,0	2,0	1,74
	Voriconazol	≤ 0,125	0,125	0,125	0,125
<i>C. gattii</i> n=6	Anfotericina B	1,0	1,0	1,0	1,0
	Flucitosina	≤ 1,0	1,0	1,0	1,0
	Fluconazol	≤ 1 - 2,0	1,0	2,0	1,56
	Voriconazol	≤ 0,125	0,125	0,125	0,125

MG – Media Geométrica, CIM – Concentração Inibitória Mínima

Figura 28

Representação gráfica da Tabela 11 – Vitek 2 - Variação de CIM em cepas ambientais de *C. neoformans*.

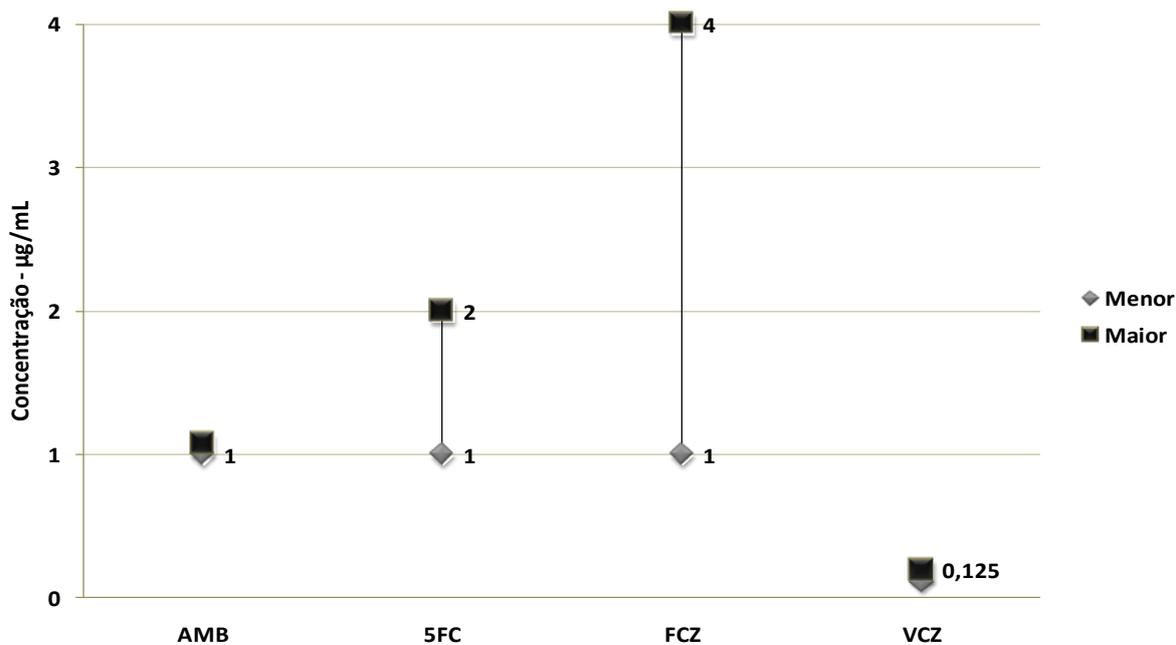


Figura 29

Representação gráfica da Tabela 11 - Vitek 2 - Variação de CIM em cepas ambientais de *C. gattii*.

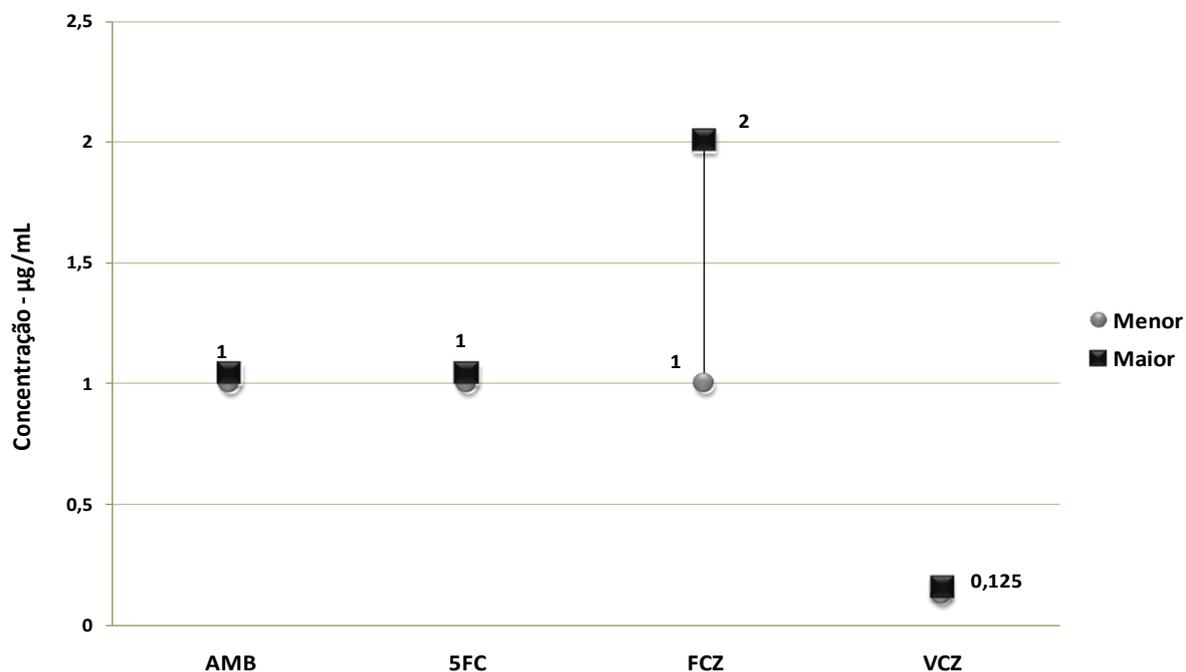
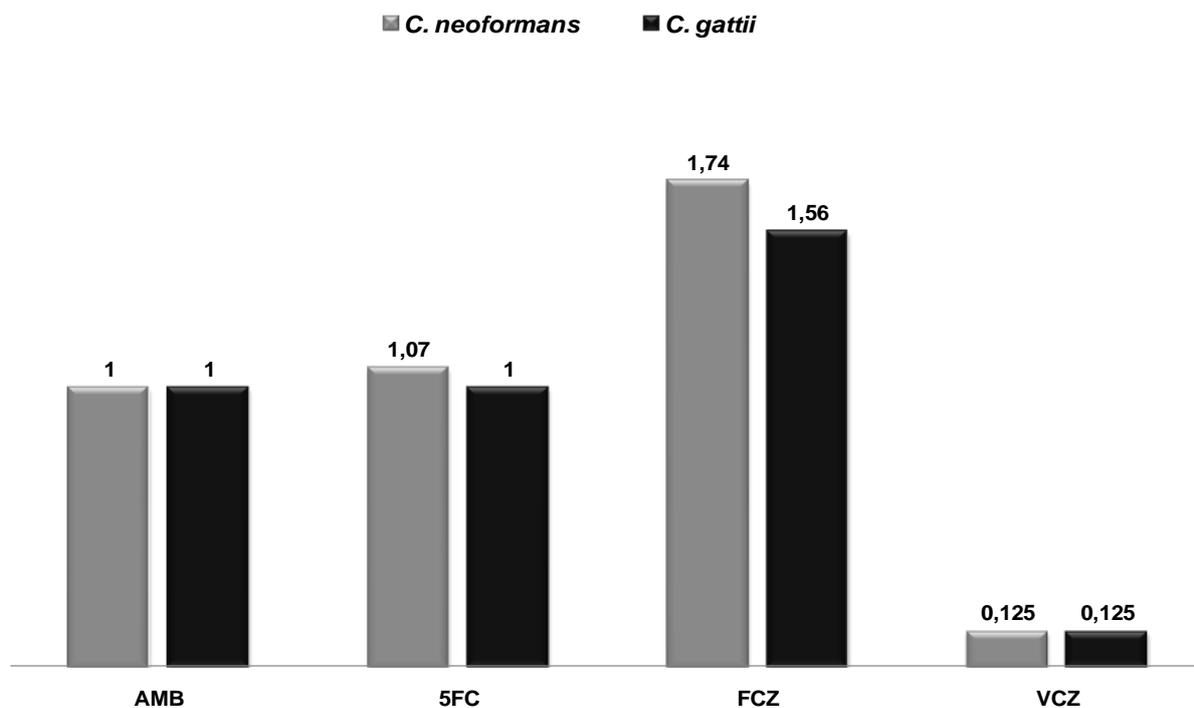


Figura 30

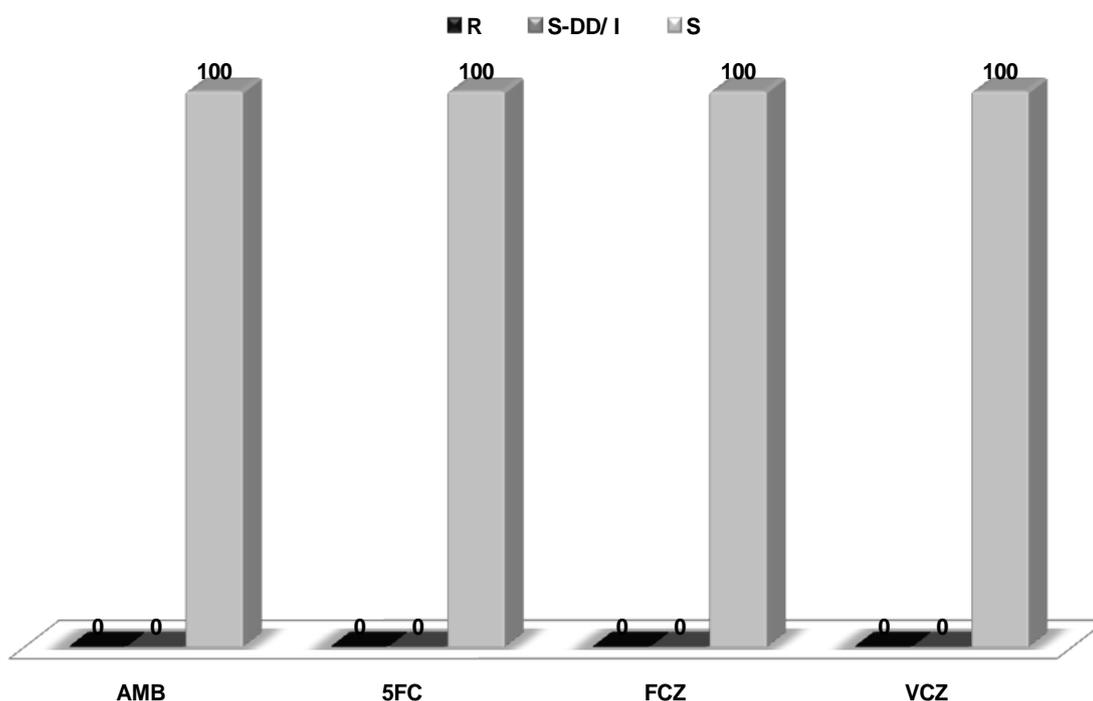
Representação gráfica da Tabela 11 - Vitek 2 – Média Geométrica em cepas ambientais de *C. neoformans* e *C. gattii*.



Diante destes resultados todas as cepas ambientais de *C. neoformans* e *C. gattii* foram classificadas como 100% sensíveis à AMB, a 5FC, ao FCZ e ao VCZ utilizando os critérios estabelecidos pelo CLSI, parâmetros propostos por Aller e colaboradores (2000) e com relação ao ponto de corte epidemiológico (ECV) (Espinel-Ingroff et al., 2012) (Figura 31).

Figura 31

Representação gráfica – Vitek 2 - % por categoria para cepas ambientais de *C. neoformans* e *C. gattii*.



4.4 CONCORDÂNCIA ESSENCIAL ENTRE AS METODOLOGIAS UTILIZADAS

A concordância essencial (EA) entre os valores de CIM obtidos pelos métodos Etest e CLSI para os 99 isolados de *C. neoformans* de origem clínica foi de 1% para a AMB, 95% para 5FC, 92% para ICZ, 96% para FCZ e 98% para VCZ (Tabela 12 e Figura 32).

Tabela 12

Diferentes distribuições de CIM para as 99 cepas de *C. neoformans* de origem clínica e percentual de concordância dentro de ± 2 diluições pelos os métodos CLSI e Etest.

Antifúngicos	No. de cepas com CIM pelo Etest diferentes de CIM pelo CLSI							Percentual de Concordância entre CIM
	< -2	-2	-1	0	+1	+2	> +2	± 2 diluições
Anfotericina B	98	0	1	0	0	0	0	1
Flucitosina	2	4	15	46	24	6	2	95
Itraconazol	2	12	28	27	15	10	5	92
Fluconazol	0	4	10	45	27	10	3	96
Voriconazol	0	7	36	42	11	2	1	98

Para as cepas de *C. gattii* de origem clínica (n=61) a EA entre Etest e CLSI foi de 1,64% para AMB, 62,29% para 5FC, 93,44% para ICZ, 96,72% para FCZ e 93,44% para VCZ (Tabela 13 e Figura 32).

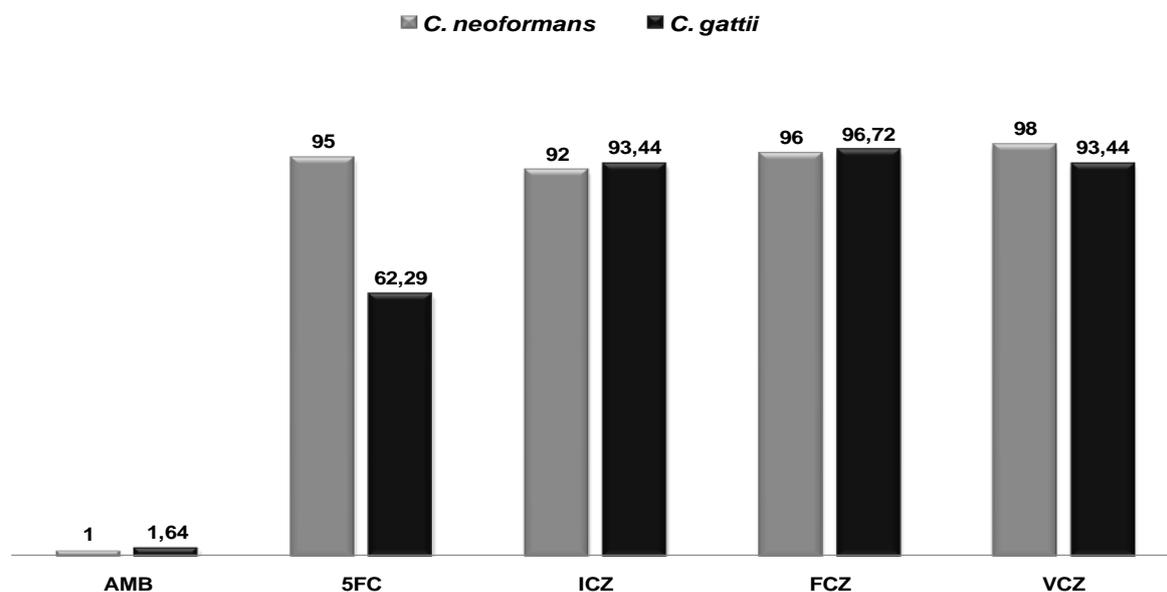
Tabela 13

Diferentes distribuições de CIM para as 61 cepas de *C. gattii* de origem clínica e percentual de concordância dentro de ± 2 diluições pelos métodos CLSI e Etest.

Antifúngicos	No. de cepas com CIM pelo Etest diferentes de CIM pelo CLSI							Percentual de Concordância entre CIM
	< -2	-2	-1	0	+1	+2	> +2	± 2 diluições
Anfotericina B	60	1	0	0	0	0	0	1,64
Flucitosina	23	15	10	8	4	1	0	62,29
Itraconazol	2	8	14	12	12	11	2	93,44
Fluconazol	0	1	8	26	17	7	2	96,72
Voriconazol	4	14	22	12	8	1	0	93,44

Figura 32

Representação gráfica das Tabelas 12 e 13 - Concordância Essencial (EA) entre os valores de CIM obtidos pelo Etest e pelo CLSI em cepas de *C. neoformans* e *C. gattii* de origem clínica.



A EA entre CLSI e Vitek 2 foi estimada para 98 cepas clínicas de *C. neoformans*, pois não foi obtida leitura em uma cepa pelo Sistema Vitek 2. Para o VCZ não foi calculada a EA, pois todas as cepas apresentaram o mesmo valor de CIM $\leq 0,125$ $\mu\text{g/mL}$ pelo Vitek 2, impossibilitando a comparação com os resultados do CLSI. Observou-se 100% EA para a AMB, 26,53% para 5FC e 62,24% para FCZ (Tabela 14 e Figura 33).

Tabela 14

Diferentes distribuições de CIM para 98 cepas de *C. neoformans* de origem clínica e percentual de concordância dentro de ± 2 diluições pelos métodos Vitek 2 e CLSI.

Antifúngicos	No. de isolados com CIM pelo Vitek 2 diferentes de CIM pelo CLSI							Percentual de Concordância entre CIM ± 2 diluições
	< -2	-2	-1	0	+1	+2	> +2	
Anfotericina B	0	0	21	72	5	0	0	100
Flucitosina	0	1	15	10	0	0	0	26,53
Fluconazol	0	0	46	14	1	0	0	62,24
Voriconazol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND - não determinado

A EA entre Vitek 2 e CLSI foi estimada para 61 cepas de *C. gattii*. Pelo mesmo motivo acima descrito 60 cepas não tiveram a EA calculada para VCZ; sendo que em uma cepa a CIM determinada pelo Vitek 2 foi de 0,25 µg/mL e pelo CLSI foi de 0,06 µg/mL havendo concordância de resultados duas diluições acima para o VCZ, sendo a EA de 1,64%. Para a AMB foi observada EA de 100%, 11,47% para 5FC e 91,8% para FCZ (Tabela 15 e Figura 33).

Tabela 15

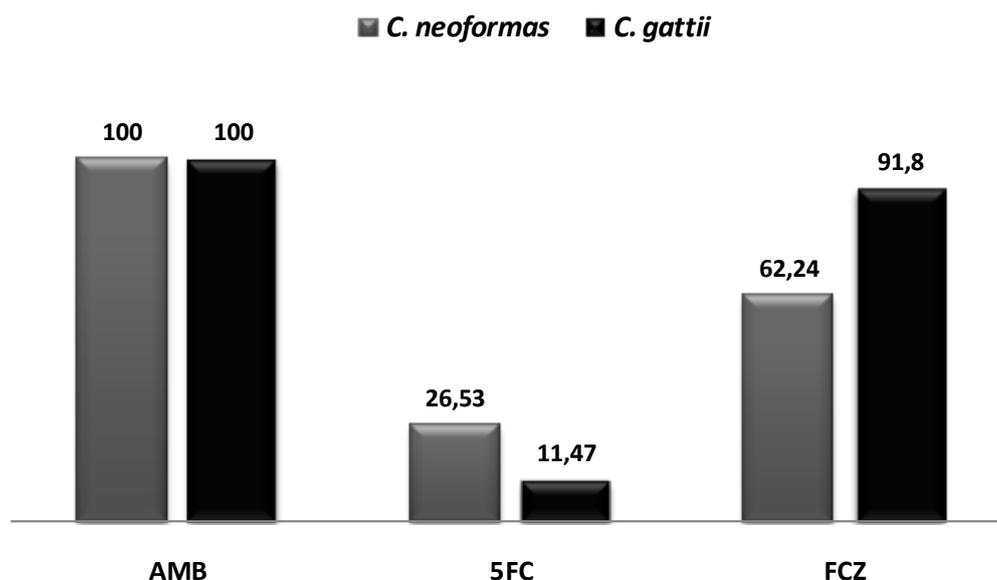
Diferentes distribuições de CIM para as 61 cepas de *C.gattii* de origem clínica e percentual de concordância dentro de ± 2 diluições pelos métodos Vitek 2 e CLSI.

Antifúngicos	No. de isolados com CIM pelo Vitek 2 diferentes de CIM pelo CLSI							Percentual de Concordância entre CIM
	< -2	-2	-1	0	+1	+2	> +2	± 2 diluições
Anfotericina B	0	0	8	47	5	1	0	100
Flucitosina	3	0	2	4	1	0	0	11,47
Fluconazol	0	15	23	11	5	1	1	91,8
Voriconazol	ND	ND	ND	ND	ND	1	ND	1,64

ND - não determinado

Figura 33

Representação gráfica das Tabelas 14 e 15 - Concordância Essencial (EA) entre os valores de CIM obtidos pelo Vitek 2 e pelo CLSI em cepas de *C. neoformans* e *C. gattii* de origem clínica.

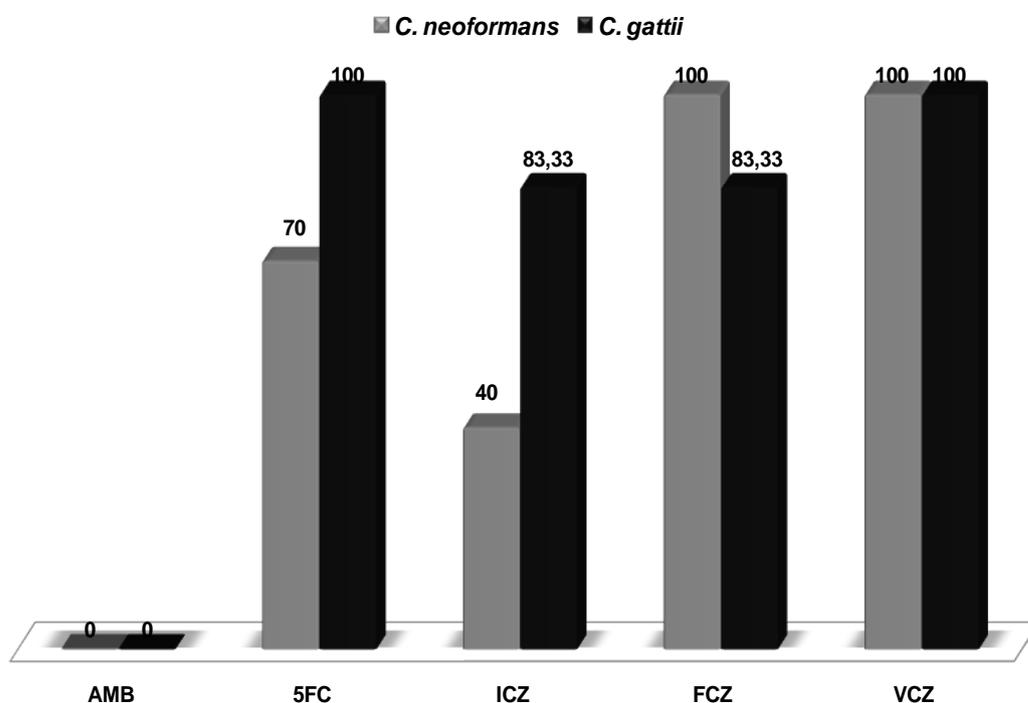


A EA entre os valores de CIM obtidos pelos métodos Etest e CLSI para os 10 isolados de *C. neoformans* de origem ambiental não foi observada para AMB, foi de 70% para 5FC, 40% para ICZ, 100% para FCZ e VCZ (Figura 34).

Para as cepas de *C. gattii* de origem ambiental (n=6) a EA entre Etest e CLSI não foi observada para AMB, sendo concordantes em 100% para 5FC e VCZ, 83,33% para ICZ e FCZ (Figura 34).

Figura 34

Representação gráfica da Concordância Essencial (EA) entre os valores de CIM obtidos pelo Etest e pelo CLSI em cepas de *C. neoformans* e *C. gattii* de origem ambiental.

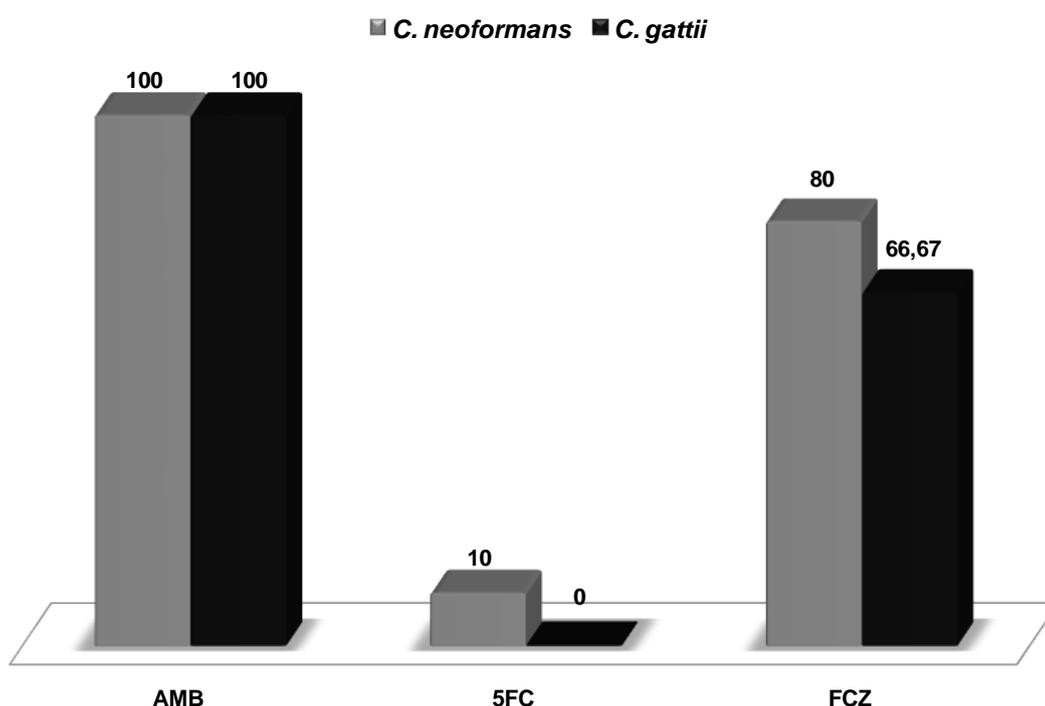


A EA entre Vitek 2 e CLSI foi estimada para 10 cepas ambientais de *C. neoformans*. Observou-se 100% EA para a AMB e 80% para FCZ, em duas cepas o valor não foi determinado ($CIM \leq 1,0$). Para o VCZ não foi calculada a EA, pois todas as cepas apresentaram o mesmo valor de $CIM \leq 0,125 \mu\text{g/mL}$ pelo Vitek 2, impossibilitando a comparação com os resultados do CLSI. A EA para 5FC foi 10%, pois uma cepa (1/10) apresentou valor de CIM determinada pelo Vitek 2 e pelo CLSI de $2,0 \mu\text{g/mL}$ (Figura 35).

A EA entre Vitek 2 e CLSI foi estimada para *C. gattii* em 6 cepas de origem ambiental. A EA não foi calculada para VCZ e 5FC, pois todas as cepas apresentaram o mesmo valor de CIM $\leq 0,125$ $\mu\text{g/mL}$ pelo Vitek 2 para o VCZ e para 5FC de CIM $\leq 1,0$ $\mu\text{g/mL}$. Para a AMB foi observada EA de 100% e para FCZ 66,67%(4/6), e em duas cepas os valores foram CIM 8,0 $\mu\text{g/mL}$ e 16,0 $\mu\text{g/mL}$ pelo CLSI e CIM $\leq 1,0$ $\mu\text{g/mL}$ pelo Vitek 2 (Figura 35).

Figura 35

Concordância Essencial (EA) entre os valores de CIM obtidos pelo Vitek 2 e pelo CLSI em cepas de *C. neoformans* e *C. gattii* de origem ambiental.



4.5 DISCREPÂNCIAS ENTRE AS METODOLOGIAS UTILIZADAS

A discrepância entre os resultados de CIMs obtidos para as 99 cepas de *C. neoformans* pelos métodos CLSI e Etest foi observada em 2,02% para AMB e classificada como erro gravíssimo (EMG), para 5FC 1,01% foi classificado como erro grave (EM) e 5,05% como erro leve (EMi), para ICZ foram classificados em 4,04% para EM e 21,21% EMi, e nenhuma discrepância foi observada para FCZ e VCZ (Tabela 16).

A discrepância entre os resultados de CIMs obtidos pelos métodos CLSI e Vitek 2 para *C. neoformans* foi analisada, sendo observada 1,01% para AMB e classificado como EMG, para 5FC foi de 3,03% e classificado como EMi, para FCZ e VCZ não ocorreram discrepâncias. Os resultados descritos acima estão na Tabela 16.

Tabela 16

Classificação de erros dos resultados discrepantes em relação a interpretação de sensibilidade aos antifúngicos testados segundo o protocolo CLSI M27-A3 comparado com os métodos comerciais Etest e Vitek 2 para *C. neoformans* de origem clínica.

Antifúngicos	Métodos	% por categoria - CLSI			% de resultados discrepantes			% concordância categórica
		S	S-DD / I	R	EMi	EM	EMG	
Anfotericina B	CLSI	97,98	0	2,02	0	0	2,02	97,98
	Etest	100	0	0				
	CLSI	97,98	0	2,02	0	0	1,01	98,99
	Vitek 2	98,99	0	1,01				
Flucitosina	CLSI	96,97	3,03	0	5,05	1,01	0	93,94
	Etest	90,91	8,08	1,01				
	CLSI	96,97	3,03	0	3,03	0	0	96,97
	Vitek 2	100	0	0				
Itraconazol	CLSI	88,89	11,11	0	21,21	4,04	0	74,75
	Etest	72,73	23,23	4,04				
Fluconazol	CLSI	100	0	0	0	0	0	100
	Etest	100	0	0				
	CLSI	100	0	0	0	0	0	100
	Vitek 2	100	0	0				
Voriconazol	CLSI	100	0	0	0	0	0	100
	Etest	100	0	0				
	CLSI	100	0	0	0	0	0	100
	Vitek 2	100	0	0				

S – sensível, S-DD – sensível dose dependente, I – intermediário, R – resistente, EMi – erro leve, EM – erro grave, EMG- erro gravíssimo

A discrepância entre os resultados de CIMs obtidos para os isolados de *C. gattii* pelos métodos CLSI e Etest foi observada em 6,56% para AMB e classificado como erro EMG, para 5FC 18,33% e classificado como EMi, para ICZ classificados como EMG em 3,28% e como EMi em 60,65%, para FCZ foram

classificados como EMI em 31,15% e como EM em 1,64%. Nenhuma discrepância foi observada para o VCZ (Tabela 17).

A discrepância entre os resultados de CIMs obtidos pelos métodos CLSI e Vitek 2 para *C. gattii* foi analisada, sendo observada 4,92% para AMB e classificado como EMG e EMI, para 5FC foi de 18,03% e classificado como EMI, para FCZ foi de 23% e classificado como EMI. Nenhuma discrepância foi observada para VCZ (Tabela 17).

Tabela 17

Classificação de erros dos resultados discrepantes em relação a interpretação de sensibilidade aos antifúngicos testados segundo o protocolo CLSI M27-A3 comparado com os métodos comerciais Etest e Vitek 2 para *C. gattii* de origem clínica.

Antifúngicos	Métodos	% por categoria - CLSI			% de resultados discrepantes			% concordância categórica
		S	S-DD / I	R	EMi	EM	EMG	
Anfotericina B	CLSI	93,44	0	6,56	0	0	6,56	93,44
	Etest	100	0	0				
	CLSI	93,44	0	6,56	4,92	0	4,92	90,16
	VITEK 2	93,44	0	6,56				
Flucitosina	CLSI	81,67	18,33	0	18,33	0	0	81,67
	Etest	100	0	0				
	CLSI	81,97	18,03	0	18,03	0	0	81,67
	VITEK 2	100	0	0				
Itraconazol	CLSI	24,59	75,41	0	60,65	0	3,28	36,07
	Etest	42,63	39,34	18,03				
Fluconazol	CLSI	77,05	22,95	0	31,15	1,64	0	67,21
	Etest	60,7	36	3,3				
	CLSI	77,05	22,95	0	23	0	0	77
	VITEK 2	93,44	6,56	0				
Voriconazol	CLSI	100	0	0	0	0	0	100
	Etest	100	0	0				
	CLSI	100	0	0	0	0	0	100
	VITEK 2	100	0	0				

S – sensível, S-DD – sensível dose dependente, I – intermediário, R – resistente, EMi – erro leve, EM – erro grave, EMG- erro gravíssimo

4.6 RELATO DE CASO COM VÁRIAS CEPAS ISOLADAS DO MESMO PACIENTE

Em uma paciente de sexo feminino, 60 anos, HIV negativo, sem registro de outra(s) patologia(s) associada(s), foram isoladas cepas em três momentos diferentes. No primeiro isolamento, foram coletadas duas colônias isoladas do mesmo cultivo, sendo uma CGB positivo, *C. gattii*, e outra CGB negativo, *C. neoformans*. Utilizando-se o protocolo do CLSI foi observada CIM de 2,0 µg/mL frente ao FCZ para *C. gattii* e 8,0 µg/mL para *C. neoformans*. O segundo isolamento ocorreu 185 dias após o primeiro, foram coletadas duas colônias isoladas do mesmo cultivo, ambas *C. gattii*, que apresentaram CIM de 16,0 µg/mL frente ao FCZ. Um terceiro isolamento aconteceu 50 dias após o segundo, também foram coletadas duas colônias isoladas do mesmo cultivo, ambas *C. gattii*, com CIM de 32,0 µg/mL frente ao FCZ.

Em outra paciente de sexo feminino, 38 anos, HIV negativo, sem registro de outra(s) patologia(s) associada(s), foram coletadas três colônias isoladas do mesmo cultivo, sendo uma *C. gattii* com CIM de 16,0 µg/mL e as outras duas *C. neoformans* com CIM de 4,0 µg/mL para FCZ.

Todas as cepas de *C. neoformans* e *C. gattii* obtidas dos mesmos pacientes em tempo diferentes, ou com infecção mista, ou cepas obtidas de duas colônias isoladas do mesmo cultivo, apresentaram CIM para os antifúngicos testados podendo variar ± 1 diluição (apêndice 3).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na comparação entre as metodologias CLSI, Etest e VITEK 2 as concentrações dos antifúngicos foram classificados em 10 grupos em função dos resultados possíveis para cada teste. As metodologias foram comparadas duas a duas, CLSI - Etest e CLSI - Vitek 2, aplicando o teste de hipótese Wilcoxon com nível de significância de 0,05.

Os valores de CIM para cepas clínicas de *C. neoformans* obtidos pelo Etest e CLSI apresentaram para AMB $p < 0,0001$ e em Vitek 2 e CLSI mostraram para 5FC $p < 0,0004$, sendo significativamente diferentes (Tabela 18).

Para *C. gattii* de origem clínica os valores de CIM pelo Etest e CLSI se mostraram significativamente diferentes para AMB $p < 0,0001$ e 5FC $p < 0,0003$, e CLSI e Vitek 2 apresentaram para 5FC $p < 0,0001$ (Tabela 18).

Tabela 18

P-valor obtido pela comparação de CIM segundo o protocolo CLSI M27-A3 e os métodos comerciais Etest e Vitek 2 para *C. neoformans* e *C. gattii* de origem clínica.

Micro-organismos	Métodos	Antifúngicos - p-valor				
		AMB	5FC	ICZ	FCZ	VCZ
<i>C. neoformans</i>	CLSI - Etest	0,0001	0,28	0,23	0,11	0,97
	CLSI - Vitek 2	0,99	0,0004	–	0,068	nc
<i>C. gattii</i>	CLSI - Etest	< 0,0001	< 0,0003	0,53	0,11	0,5
	CLSI - Vitek 2	0,99	< 0,0001	–	0,18	nc

nc- não comparável, AMB – anfotericina B, 5FC – flucitosina, ICZ – itraconazol, FCZ – fluconazol, VCZ - voriconazol

Os valores de CIM para cepas ambientais de *C. neoformans* obtidos pelo Etest e CLSI apresentaram para AMB $p < 0,004$, sendo os resultados significativamente diferentes (Tabela 19).

Para as cepas ambientais de *C. gattii* os valores de CIM pelo Etest e CLSI se mostraram significativamente diferentes para AMB $p < 0,0001$, e os valores de CIM pelo Vitek 2 e CLSI não foram comparáveis para 5FC (Tabela 19).

Tabela 19

P-valor obtido pela comparação de CIM segundo o protocolo CLSI M27-A3 e os métodos comerciais Etest e Vitek 2 para *C. neoformans* e *C.gattii* de origem ambiental.

Micro-organismos	Métodos	Antifúngicos - p-valor				
		AMB	5FC	ICZ	FCZ	VCZ
<i>C. neoformans</i>	CLSI - Etest	0,004	0,76	0,07	0,78	0,98
	CLSI - Vitek 2	0,99	0,76	–	0,32	nc
<i>C. gattii</i>	CLSI - Etest	< 0,0001	0,06	0,31	0,32	0,95
	CLSI - Vitek 2	0,98	nc	–	0,18	nc

nc- não comparável, AMB – anfotericina B, 5FC – flucitosina, ICZ – itraconazol, FCZ – fluconazol, VCZ - voriconazol

4.8 ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA UTILIZANDO OS PERFIS OBTIDOS POR AFLP

A diversidade genética foi estudada em 52 cepas de *C. neoformans*, sendo 44 de origem clínica e oito ambientais, e 29 cepas de *C. gattii*, sendo 26 de origem clínica e três ambientais, oriundas de diferentes estados do Brasil, uma cepa clínica oriunda dos USA e uma cepa ambiental da Austrália (Apêndice 2).

A maioria das cepas clínicas foi isolada de LCR, sendo 61,4% (27/44) de *C. neoformans* e 57,7% (15/26) *C. gattii*. Não foi relatado o espécime clínico em 34,1% (15/44) e 34,6% (9/26) de *C. neoformans* e *C.gattii*, respectivamente, *C. neoformans* foi também isolado de uma hemocultura e de uma úlcera córnea. *C. gattii* foi isolado de duas amostras de escarro e uma cepa isolada de baço de tatu.

Com relação ao sexo do paciente, as cepas de *C. neoformans* foram isoladas em 75% (33/44) de pacientes do sexo masculino, em 13,64% (6/44) de pacientes do sexo feminino e em 11,36%(5/44) não foi reportado o sexo do paciente. As cepas de *C. gattii* foram isoladas em 46,15% (12/26) de pacientes do sexo masculino, em 34.62% (9/26) de pacientes do sexo feminino e em 19,23% (5/26) não foi reportado o sexo do paciente.

C. neoformans foi isolado de pacientes sem resultado de teste HIV em 56,88% (25/44), de pacientes com resultado de teste HIV positivo foram 27,2% (12/44) e de pacientes com resultado de HIV negativo foram 16% (7/44).

Em *C. gattii* a maioria das cepas foi isolada de pacientes sem o resultado do teste HIV em 60% (15/25), de pacientes com resultado de HIV positivo foram 16%(4/25) e de pacientes com resultado de HIV negativo em 24% (6/25).

A distribuição geográfica de *C. neoformans* e *C. gattii*, em relação ao sexo e infecção por HIV dos pacientes estão na Tabela 20.

Tabela 20

Cepas de *C. neoformans* e *C. gattii* de origem clínica utilizadas na genotipagem por AFLP, distribuídas por região geográfica, sexo e resultado do teste de HIV do paciente

Micro-organismos	Origem	Estado	N	Sexo	HIV (idade)			Total	
					POS	NEG	NR		
<i>C. neoformans</i> n=44	C	AM	3	M	1 (34 anos)	–	–	1	
				F	–	1 (19anos)	–	1	
				RN	–	–	1	1	
		PI	28	M	6 (26 a 41)	1 (28 anos)	–	7	
				F	1 (64 anos)	1 (48anos)	–	2	
				RN	–	–	19	19	
		RJ	10	M	4 (NR)	3 (NR)	–	7	
				F	–	1 (NR)	–	1	
				RN	–	–	2	2	
	PR	3	NR	–	–	3	3		
	Total							44	
	<i>C. gattii</i> n=26 *	C	PI	20	M	–	3 (34, 39, 40 anos)	–	3
					F	–	2 (24,29 anos)	–	2
RN					–	–	13	13	
CE			NR	–	–	1	1		
RJ			M	2 (NR)	1 (NR)	–	3		
				F	–	–	–		
RN		2 (NR)	–	1	3				
Total							25		

n – número de cepas analisadas, F – feminino, M – masculino, NR – não relatado

AM – Amazonas, CE – Ceará, PI – Piauí, PR – Paraná, RJ – Rio de Janeiro

*- uma cepa de origem animal, isolada de baço de tatu no PI

Analisando a diversidade genética das cepas de *C. neoformans* obtida por AFLP, o genótipo AFLP 1 ocorreu em 45 cepas de *C. neoformans* provenientes dos estados PR (2/45) e RJ (9/45), das regiões Sul e Sudeste, respectivamente e do AM (3/45) e PI (27/45) das regiões Norte e Nordeste do Brasil. Nestas cepas predominaram as de origem clínica, sendo que quatro cepas de origem ambiental,

uma a partir de excreta de pombo e duas cepas isoladas a partir de madeira em decomposição no interior de árvore viva (*Cassia grandis*) no Rio de Janeiro e outra isolada em árvore nativa da região amazônica (*Myroxylon peruiferum*).

Quanto ao genótipo AFLP 1A foi identificado em quatro cepas de *C. neoformans*, sendo duas de origem clínica, uma do RJ e outra do PI, e duas cepas ambientais do RJ, sendo uma isolada de excreta de pombo e outra a partir de madeira em decomposição no interior de árvore viva (*Syzygium jambolanum*).

O genótipo AFLP 2 foi observado em duas cepas de *C. neoformans*, sendo uma de origem clínica do PR e uma cepa ambiental obtida em detritos de eucalipto do RS.

O AFLP 3 foi identificado em uma cepa de *C. neoformans* oriunda de excreta de pombo do RJ.

Analisando a diversidade genética das cepas de *C. gattii* obtida por AFLP, o genótipo AFLP 4 foi identificado em duas cepas de origem clínica e uma de excreta de morcego do RJ. Neste genótipo AFLP 4 também se agrupou uma cepa ambiental isolada de eucalipto na Austrália.

O genótipo AFLP 5 foi identificado em duas cepas de *C. gattii* de origem clínica, uma do RJ e outra dos EUA.

O genótipo AFLP 6 foi identificado em 25 cepas de *C. gattii*, sendo 22 de origem clínica humana (uma do CE, três do RJ e 18 do PI), uma de origem clínica animal (tatu) do PI e duas ambientais, sendo uma a partir de madeira em decomposição no interior de árvore viva (*Cassia grandis*) e outra de detritos de eucalipto (*E. camaldulensis*) também do PI, os resultados descritos acima estão representados na Tabela 21.

As cepas de referência de *C. neoformans* e *C. gattii* utilizadas contemplaram os perfis AFLP 1, 2, 3, 4, 5 e 6, preservadas na Coleção de Culturas da CBS e INCQS e foram oriundas de vários lugares, como: USA, países da Europa (Holanda, Dinamarca, Itália, França), Austrália, Tanzânia, Japão e Zaire (África).

Tabela 21
Distribuição dos genótipos obtidos por AFLP para *C. neoformans* e *C. gattii* do Brasil, Austrália e Estados Unidos.

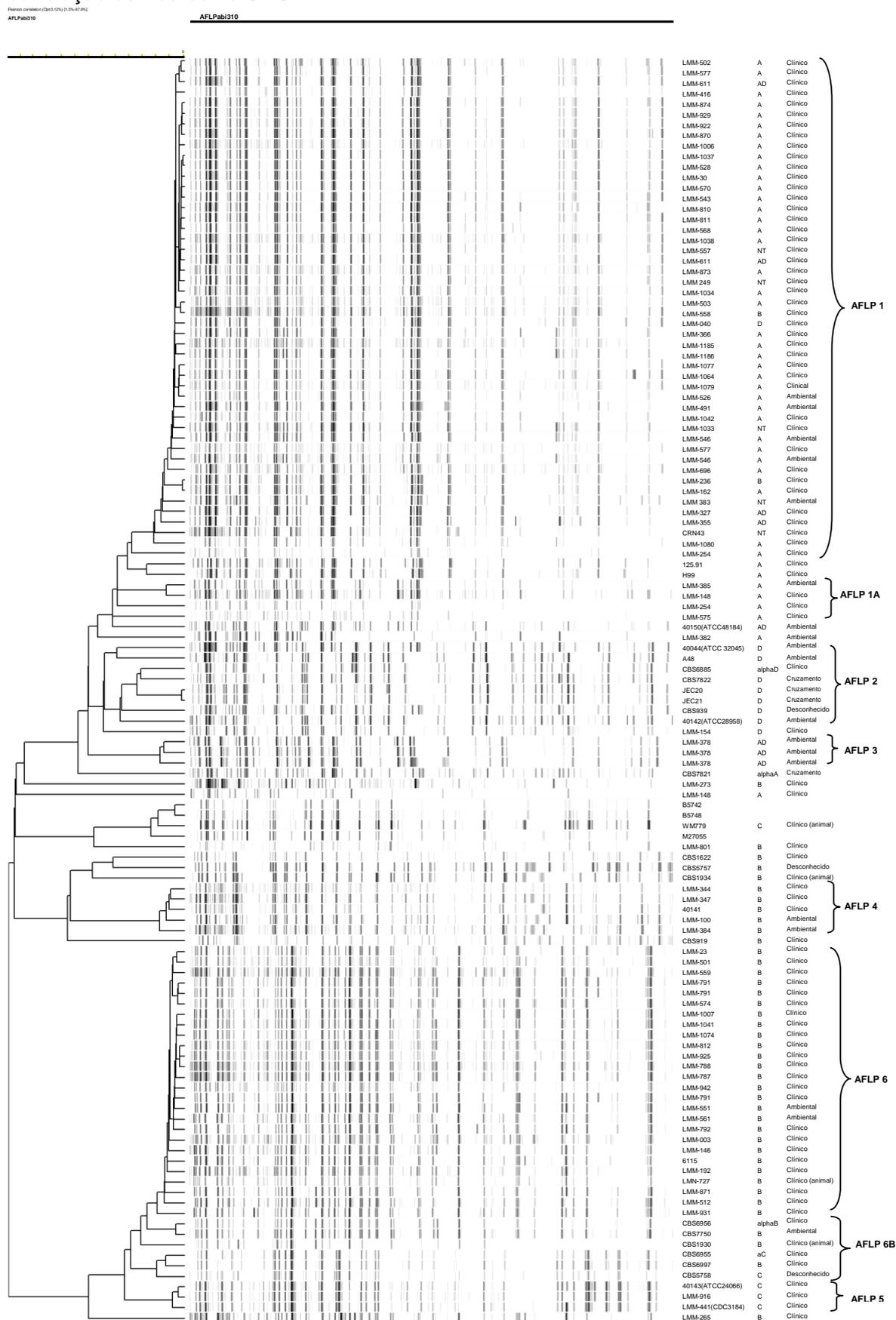
Região Geográfica	Origem	Genótipos <i>C. neoformans</i>				Genótipos <i>C. gattii</i>		
		AFLP 1	AFLP 1A	AFLP 2	AFLP 3	AFLP 4	AFLP 5	AFLP 6
Norte/Nordeste AM/PI, CE	Clínica	30	1	–	–	–	–	19
	Animal	0	–	–	–	–	–	1
	Ambiental	1	–	–	–	–	–	2
Sul/Sudeste RS/PR, RJ	Clínica	11	1	1	–	2	1	3
	Ambiental	3	2	1	1	1	0	–
USA	Clínica	–	–	–	–	–	1	–
AU	Ambiental	–	–	–	–	1	–	–
Total (n=83)		45	4	2	1	4	2	25

AM – Amazonas, CE – Ceará, PI – Piauí, PR – Paraná, RJ – Rio de Janeiro, RS – Rio Grande do Sul, AU – Austrália, USA – Estados Unidos.

n – número de cepas analisadas.

O perfil molecular obtido por AFLP de cepas de *C. neoformans* e *C. gattii* baseado na correlação de *Pearson* pela similaridade das curvas densitométricas e pelo método não ponderado de agrupamento aos pares por média aritmética (UPGMA) estão representados na Figura 36.

Figura 36- Perfil molecular obtido por AFLP de cepas de *C. neoformans* e *C. gattii* obtido pela correlação de Pearson e UPGMA.



5 DISCUSSÃO

5.1 FATORES DE VIRULÊNCIA

A termotolerância é o principal fator que diferencia os fungos patogênicos para o homem de inumeráveis espécies fúngicas incapazes de causar doença em mamíferos (PERFECT, 2006). Neste estudo *C. neoformans* e *C. gattii* demonstraram diferente sensibilidade quando submetidos às temperaturas de 25°C, 36°C e 40°C. Sob temperatura de 36°C, comparável ao do hospedeiro mamífero, a maioria das cepas cresceu bem ou muito bem, sendo que em apenas uma cepa *C. gattii* e outra cepa *C. neoformans* não foi observado crescimento significativo. Quando analisadas a 40°C, temperatura eventualmente atingida em mamíferos no curso de alguma infecção, há evidente redução do crescimento em ambas as espécies. No entanto nenhuma das 238 cepas analisadas perdeu a viabilidade sob estas condições, e retomaram o crescimento quando o mesmo cultivo foi re-incubado a 25°C. A 25°C, todas apresentaram melhor crescimento que a 36°C. Observa-se, portanto, um gradiente progressivo de inibição de crescimento nas cepas de origem clínica e ambiental de *C. gattii* e de *C. neoformans* quando incubados em diferentes temperaturas.

Estas cepas foram mantidas sob criopreservação e ou liofilização e sob estas condições de preservação não houve perda da capacidade de crescimento em diferentes temperaturas, demonstrando a estabilidade deste fator de virulência em condições extremas. Isto se reflete no amplo espectro de infecções que inclui humanos, animais e também em aves, que têm temperatura média próxima a 40°C no trato gastrointestinal (SWINNE-DESGAIN, 1976). A infecção natural ocorre em diversas condições climáticas, desde os trópicos até regiões temperadas, demonstrando a capacidade de adaptação desses agentes, que sobrevivem ao frio congelante da Antártida, em elevadas altitudes no Himalaia e a salinidade dos mares (CASADEVALL; PERFECT, 1998).

Há mais de três décadas Kwon-Chung descreve diferente comportamento entre as duas espécies com relação à termotolerância, embora esse fator não seja específico para cada uma dessas espécies. A autora relata que a maioria das

células de *C. gattii* perde a viabilidade a 40°C em 24h de exposição, diferente de *C. neoformans*, que sobrevive a estas condições (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992).

No presente estudo foi observado que *C. neoformans* e *C. gattii* são inibidos, mas não perdem a viabilidade quando expostos a 40°C por 72h. Portanto, nas condições utilizadas nesse estudo a influência da temperatura de 40°C pode ter gerado estresse celular interferindo no ciclo de crescimento, mas não o suficiente para levar à morte todas as células inoculadas, diferente do observado por Kwon-Chung (1992). Estes resultados se correlacionam com a sobrevivência de ambos os agentes em ambientes de temperaturas elevadas, secos ou muito úmidos. Partes das cepas estudadas são procedentes do semiárido nordestino, clima seco com altas temperaturas; da região amazônica, clima equatorial, caracterizado por altas temperaturas com elevada umidade e do sudeste tropical do Brasil.

O conhecimento das vias que permitem o crescimento de *C. neoformans* e *C. gattii* em altas temperaturas teve avanços importantes através dos estudos genéticos, nas quais foram descritos vários genes específicos e as vias por eles controladas. O crescimento em altas temperaturas é um dos caminhos que podem levar à identificação de novos alvos com potencial para atuação de antifúngicos, sendo as perspectivas promissoras (PERFECT, 2006).

Todas as cepas estudadas produziram melanina, mostrando que a expressão deste característico fator de virulência é estável sob condições utilizadas nos métodos de preservação. Franzot e colaboradores (1998) descreveram que *C. neoformans* é capaz de sofrer mudanças rápidas *in vitro* quando submetido a subcultivos sucessivos, que podem induzir micro-evolução, provavelmente como resultado de adaptação a condições de laboratório, levando ao aparecimento de variantes genotípicas e fenotípicas, tal como redução da produção de melanina, redução do crescimento e da expressão de cápsula, podendo atenuar a virulência, sendo necessária atenção cuidadosa às condições de preservação. Não há relato de infecção humana natural por variante albino de cepas de *C. neoformans* e *C. gattii*. Experimentalmente, mutantes obtidos por deleção do gene *LAC1* não induzem a infecção em camundongos, sendo avirulentos (SALAS, 1996).

Apesar dos avanços no conhecimento sobre melanina e os agentes da criptococose, ainda há grande interesse na elucidação das vias metabólicas envolvidas na produção desse pigmento, tanto em vida sapróbia como em parasitismo. Visando entender melhor a patogenicidade de *C. neoformans* e *C.*

gattii, a melanina pode representar um alvo em potencial para o desenvolvimento de drogas antifúngicas (TROFA, 2011).

Todas as cepas analisadas expressaram cápsula em torno de 1,6 μm de espessura e, sob indução, observou-se aumento na espessura da cápsula que variou entre >1,6 a 6,4 μm , demonstrando a integridade dos mecanismos relacionados à síntese capsular após períodos de preservação de dois anos de congelamento a -70°C .

O crescimento da cápsula *in vitro* é afetado por vários fatores, tal como pH, osmolaridade, fonte de carbono, concentração de nutrientes e temperatura. Em experimentos *in vivo*, a espessura da cápsula de *C. neoformans* variou dependendo do órgão de onde foi isolado. Foi observado que no pulmão o tamanho da cápsula é maior que no cérebro, embora a causa desse fenômeno seja desconhecida, tem-se sugerido diferenças na expressão de genes responsáveis pela síntese da cápsula (RIVERA et al., 1998).

Com relação à síntese capsular, múltiplos aspectos desse processo permanecem obscuros. Houve avanços, quatro genes foram identificados e constatou-se que são necessários para a expressão da cápsula, mas suas funções são ainda desconhecidas: como os polissacarídeos capsular são exportados, como é determinada a estrutura espacial terciária e como ocorre à expansão da cápsula. Esses são aspectos que permanecem em discussão (JANBON; DOERING, 2011).

Neste estudo, observou-se que fatores de virulência como a termotolerância, a produção de cápsula e de melanina foram expressos fenotipicamente em todas as cepas de *C. neoformans* e *C. gattii* preservadas em laboratório. Tais fatores formam a tríade essencial de patogenicidade destes fungos, que desenvolveram mecanismos genéticos e metabólicos bem-sucedidos, resultando em ampla disseminação e sobrevivência no ambiente e em hospedeiros diversos.

A maioria das cepas testadas apresentou atividade enzimática de fosfolipase moderada (Pz 0,4 - 0,69). Não foi observada diferença significativa entre as cepas de origem ambiental e clínica ou entre as duas espécies. Em outro estudo, com cepas de *C. neoformans* oriundas de pacientes com aids do Brasil, foi também observada a atividade enzimática moderada de fosfolipase na maioria das cepas testadas (VIDOTTO et al., 2005). A fosfolipase extracelular está envolvida na iniciação e no desenvolvimento da criptococose pulmonar, pois danifica a

membrana celular dos alvéolos, desempenhando um papel importante no acesso de *Cryptococcus* aos vasos linfáticos pulmonares e na corrente sanguínea (CHEN et al., 1997, 2000, SANTANGELO et al., 2004). Este factor de virulência, também representa alvo potencial para o desenvolvimento de drogas antifúngicas (COX et al., 2001).

5.2 TESTE DE SENSIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS

Com relação ao perfil de sensibilidade *in vitro* analisado no presente estudo, foi observado que a sensibilidade ao FCZ para *C. neoformans* ocorreu em todas as cepas clínicas testadas. Entretanto, para *C. gattii*, observaram-se valores de CIM₉₀ e MG elevados, principalmente frente ao FCZ, com CIM de 32,0 µg/mL, resultando em expressivo percentual de S-DD 22,95% (CLSI, 2008). De acordo com os critérios utilizados por Aller e colaboradores (2000) esses valores de CIM correspondem à resistência *in vitro*. Portanto, este perfil encontrado para *C. gattii* da região norte do Brasil deve ser levado em conta na escolha da medicação antifúngica, principalmente para criptococose por *C. gattii*, grave, disseminada. Nestes casos, deve-se evitar monoterapia inicial com azólicos, especialmente FCZ em protocolos terapêuticos na fase de indução (MORETTI, 2008)

Os critérios de S, S-DD e R definidos pelo CLSI foram estabelecidos a partir de dados *in vitro* padronizados para leveduras do gênero *Candida*, sendo utilizados para outros gêneros de leveduras, porém, não são específicos para *Cryptococcus*, o que deve ser considerado quando se analisa a resistência desses agentes. Falta um ponto de corte que defina a resistência para *C. neoformans* e *C. gattii*. Um dos poucos estudos que relaciona o resultado do TSA com a resposta clínica foi realizado por Aller e colaboradores (2000) para *C. neoformans*, onde se estabeleceu CIM \geq 16 µg/mL somente para FCZ como critério de resistência. Este critério passou a ser utilizado para *C. neoformans* e *C. gattii* em várias publicações (PFALLER et al., 2005b, 2011, OCHIUZZI et al., 2010). Utilizando este critério, foi observado 22,95% de resistência ao FCZ em 61 cepas de *C. gattii* estudadas. Em um estudo de 50 cepas de *C. gattii* de origem clínica, realizado em São Paulo, foi observado 24% de cepas resistentes (SILVA et al., 2012). Um estudo realizado em Goiânia

(FERNANDES et al., 2003), demonstrou resistência em 1,78% de 56 cepas de *C. neoformans* enquanto que para *C. gattii*, de quatro cepas analisadas, três mostraram-se resistentes, com base nos critérios do CLSI. Em estudo de cepas de diferentes regiões brasileiras, foram analisadas 57 cepas clínicas e ambientais de *C. gattii*, com variação de CIM de 1 a 64 µg/mL e MG de 9,54. Neste mesmo estudo, para 30 cepas de *C. neoformans* analisadas, a variação da CIM foi de 1 a 32 µg /mL e MG de 3,89, não sendo discriminado o percentual de resistência nos grupos analisados, pela ausência de ponto de corte para *C. neoformans* e *C. gattii* (TRILLES et al., 2004). No presente estudo foi observada resistência em uma cepa de *C. gattii* de origem ambiental (1/6) de madeira em decomposição em oco de árvore no AM. Em um estudo de cepas *C. neoformans* de origem ambiental oriundas de excretas de pombos da cidade de Santo/SP, utilizando a metodologia EUCAST, foi observada uma cepa resistente ao FCZ (CIM de 64 µg /mL) entre 11 analisadas (SOARES et al., 2005). Em outro estudo realizado em Ribeirão Preto/SP, em 16 cepas ambientais de *C. neoformans* oriundas de excreta de pombos, foi observada CIM de ≥ 64 µg /mL para FCZ, não sendo relatado o percentual de cepas resistentes (PEDROSO et al., 2006). Na cidade de Goiânia, dentre 41 cepas de *C. neoformans* de origem ambiental oriundas de excretas de pombos e detritos de eucaliptos não foi observada resistência a FCZ (KOBAYASHI et al., 2005). Em outro estudo também realizado em Goiânia, em 66 cepas de *C. neoformans* de origem clínica e 40 de origem ambiental não foi observada resistência para o FCZ, sendo este o mesmo resultado observado nas quatro cepas de *C. gattii* (SOUZA et al., 2005).

Em um estudo realizado em 2006, utilizando EUCAST como referência, foram analisadas 100 cepas de *C. neoformans*, de origem clínica de diferentes regiões geográficas do Brasil. Em três cepas foram observadas resistência ao FCZ (CIM de 64 µg /mL) e uma cepa resistente ao VCZ (CIM de 4 µg /mL) (DIAS et al., 2006). Em outro estudo com 79 cepas de *C. neoformans* de origem clínica, oriundas de várias cidades do estado de São Paulo, uma cepa com CIM de 16 µg/mL foi considerada resistente, enquanto que as quatro cepas *C. gattii* analisadas mostraram-se sensíveis (ALMEIDA et al., 2007). Em estudo realizado em Minas Gerais com 31 cepas clínicas de *C. neoformans* e quatro *C. gattii*, observou-se uma cepa *C. gattii* com CIM de 16 µg/mL que foi considerado S-DD (SILVA et al., 2008). Em outro trabalho realizado em Goiânia, foram analisadas 88 cepas de origem clínica, sendo 84

C. neoformans e quatro *C. gattii*, além de 40 cepas *C. neoformans* de origem ambiental, utilizando o protocolo do CLSI, não foi observada resistência para o FCZ (SOUZA et al., 2009). Analisando 37 cepas de *C. gattii* do RJ, SP e MG, sendo 24 de origem clínica e 13 de origem ambiental foram encontradas 22,61% (8/37) de cepas resistentes ao FCZ com CIM de 64 µg /mL, utilizando o critério do CLSI. Analisando os valores da CIM encontrados neste artigo e utilizando o critério de Aller e colaboradores (2000), o percentual de resistência seria ainda maior, com CIM variando de 16 a 64 µg/mL (23/37) (MENDES et al., 2010). Em recente trabalho realizado na Bahia analisando cepas de origem clínica, foi observada resistência em 2% (1/49) das cepas de *C. neoformans* e 15,5% (2/13) de *C. gattii* pelo critério do CLSI (MATOS et al., 2012).

Ao analisar estudos similares realizados em outros países, foi observado que predominam os estudos com *C. neoformans* e poucos incluem *C. gattii*. Na Colômbia foi observada resistência ao FCZ com CIM maior que 16 µg/mL em 5 das 15 cepas de *C. gattii* analisadas (BEDOUT et al., 1999). Em um estudo realizado na Espanha foram analisadas 19 cepas de *C. gattii* oriundas do Instituto Adolfo Lutz (SP/BR), quatro cepas de *C. gattii* oriundas dos Estados Unidos e 340 cepas de *C. neoformans* da Espanha, utilizando EUCAST, os valores da CIMs variaram de 4 a 64 µg/mL para FCZ em *C. gattii* e *C. neoformans*, demonstrando a ocorrência de resistência nesses patógenos, (GOMEZ-LOPEZ et al., 2008). A observação de resistência neste estudo pode ser relacionada ao inóculo utilizado pelo EUCAST, maior que o preconizado pelo CLSI. Outro estudo na Espanha, com 22 cepas ambientais de *C. neoformans*, identificou quatro cepas resistentes ao FCZ (CIM ≥ 64µg /mL), sendo que três destas apresentaram também resistência ao VCZ com CIM ≥ 1 µg /mL (MORERA-LÓPEZ et al., 2005). Em outro estudo onde 80 cepas de Coleção de Culturas na Espanha foram analisadas, sendo 50 cepas de *C. neoformans* e 30 de *C. gattii*, demonstrou-se que a CIM para *C. gattii* foi significativamente maior do que para *C. neoformans*, especialmente para FCZ (TORRES-RODRÍGUEZ et al., 2008). A menor sensibilidade do *C. gattii* foi relatada em outros estudos *in vitro* (TRILLES et al., 2004, ZARAGOZA et al., 2011, MATOS et al., 2012).

Na Índia, um estudo envolvendo 246 cepas de *C. neoformans* e 62 cepas de *C. gattii*, de origem clínica e ambiental, mostrou que a MG dos valores de CIM foram maiores para *C. gattii* do que para *C. neoformans* com relação ao FCZ, ao ICZ e ao

VCZ (CHOWDHARY et al., 2011). No presente estudo a MG dos valores de CIM para *C. gattii* e *C. neoformans* foram respectivamente 6,27 e 3,36 para FCZ; 0,25 e 0,12 para ICZ e 0,15 e 0,05 para VCZ, mostrando um padrão similar ao descrito por Chowdhary e colaboradores (2011). Não foi descrita resistência para os isolados de origem clínica, mas observou-se CIM de 16 µg/mL para isolados ambientais de *C. gattii* (CHOWDHARY et al., 2011).

No mais amplo estudo realizado com *C. gattii* em que foi analisado 350 cepas clínicas e ambientais provenientes dos cinco continentes, das quais 81 cepas foram provenientes da América do Sul, foi observada variação nos valores de CIM de 0,25 a 16 µg/mL e MG de 3,55 para FCZ; 0,016 a 1 µg/mL e MG de 0,13 para ICZ e 0,016 a 0,5 µg/mL e MG de 0,11 para VCZ (HAGEN et al., 2010). No presente trabalho tanto a variação da CIM como MG apresentaram valores maiores, principalmente para FCZ. Em um estudo realizado com 43 cepas de *C. gattii* de origem clínica humana e veterinária dos USA, apresentaram valores de CIM variando de 0,5 a 32 µg/mL e MG de 6,38 (IQBAL et al., 2010), sendo estes resultados semelhantes aos observados no presente trabalho, na qual foi observada uma cepa de *C. gattii* isolada de madeira em decomposição no interior de oco em árvore viva, *Theobroma cacao* no AM, com CIM de 16 µg/mL para FCZ.

Estudo realizado com 522 cepas clínicas de *C. neoformans*, oriundas de quatro regiões metropolitanas dos USA, mostrou valores de CIM de 16, 32, 64 e 128 µg/mL para FCZ em 16%, 9%, 5% e 1% das cepas, respectivamente (BRANDT et al., 2001). Em outro estudo, foram analisadas 1.811 cepas de *C. neoformans* de origem clínica, oriundas de 100 laboratórios de cinco regiões geográficas distintas (Europa, África, América do Norte, América do Sul e Pacífico) isoladas no período de 1990 a 2004. Observou-se que a resistência para FCZ foi menor que 1%, sendo o mesmo observado para AMB e 5FC. Esse é o mais amplo estudo realizado com cepas de *C. neoformans* e os autores concluíram que a resistência *in vitro* aos antifúngicos utilizados no tratamento da criptococose continua a ser evento incomum entre as cepas de *C. neoformans* (PFALLER et al., 2005a). No entanto em 80 cepas clínicas de *C. neoformans* em Nairobi, Quênia, foi observada resistência em 11,2% das cepas a FCZ (64 µg/mL) e S-DD em 65% (CIM de 16 a 32 µg/mL). Neste país a resistência pode estar relacionada ao largo uso de FCZ para o tratamento da meningite criptocócica na aids (BII et al., 2007).

Em outro estudo realizado no Quênia em 67 cepas de *C. neoformans* isoladas de líquido de paciente HIV+, a resistência ao FCZ foi observada em 3% (2/67) das cepas (MDODO et al., 2011). Estes resultados mostram a variabilidade com relação à sensibilidade ou à resistência de *C. neoformans* aos antifúngicos e pode estar relacionada ao largo uso de FCZ para o tratamento da meningite criptocócica na aids, azólico amplamente utilizado na África. Outro estudo realizado na África do Sul no período de 2002-2003 e 2007-2008, onde 487 cepas clínicas de *C. neoformans* foram submetidas ao teste de sensibilidade ao FCZ, somente 0,6% (3/487) apresentaram resistência, com CIM ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$ (GOVENDER et al., 2011). No entanto em outro trabalho realizado por Pfaller e colaboradores em 1999, quando foram analisadas 566 cepas clínicas de *C. neoformans*, das quais 164 da África e 402 dos Estados Unidos, os valores de CIM variaram de 16 a 32 $\mu\text{g/mL}$, sendo observados S-DD em 6% (10/164) das cepas oriundas da África e 19% (78/402) das cepas oriundas dos USA e resistência de 0,3% (3/402) com CIM ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$ verificadas em cepas oriundas dos USA.

Em estudo realizado na Índia com 44 cepas de origem clínica de *C. neoformans*, observou-se CIM ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$ para FCZ em 36,4% (16/44) das cepas analisadas (DATTA et al., 2003). Em estudo realizado em Taiwan, cerca de 4% (3/70) com CIM ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$ cepas clínicas de *C. neoformans* apresentaram resistência ao FCZ (HSUEH et al., 2005).

No presente estudo, em que 99 cepas de *C. neoformans* de origem clínica e 10 ambientais foram analisadas não foi observada resistência ao FCZ, entretanto, é necessário monitorar o aparecimento de resistência ao FCZ no Brasil para *C. neoformans*, pois ao longo do tempo este perfil pode mudar.

Recentemente foi proposto para *C. neoformans* o valor de corte de CIM ≤ 8 $\mu\text{g/mL}$ para FCZ, útil para detectar emergência de resistência frente aos azólicos (PFALLER et al., 2011). Este valor de CIM vem ao encontro do critério estabelecido por Aller e colaboradores (2000) pelo estudo de correlação clínica que identifica resistência a FCZ em CIM ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$. Observa-se, portanto, que há uma tendência progressiva de reduzir os valores de CIM indicadores de resistência a FCZ.

Com relação a outro azólico, ICZ, estudos brasileiros relatam resistência em cepas clínicas de *C. neoformans* quando os valores de CIM foram ≥ 1 $\mu\text{g/mL}$ em 8,4% (7/79) (ALMEIDA et al., 2007) e em *C. gattii* os valores de CIM variaram de 0,12 a 2 $\mu\text{g/mL}$ (GOMEZ-LOPEZ et al., 2008). Em uma cepa de *C. neoformans* de

origem ambiental isolada de excreta de pombo na cidade de Fortaleza/CE foi observada resistência ao ICZ, com CIM de 1,0 µg/mL (COSTA et al., 2010). Em estudo anterior realizado com 16 cepas ambientais de *C. neoformans* isoladas de excretas de pombos observaram-se valores de CIM de 0,06 a 8 µg /mL para ICZ, indicando resistência, porém, não foi relatado o percentual de cepas resistentes (PEDROSO et al., 2006). No presente estudo foi observado S-DD em 12,12% (12/99) e 75,41% (46/61) para ICZ nas cepas de *C. neoformans* e *C. gattii*, respectivamente, chamando atenção o alto percentual S-DD observado para *C. gattii*.

No cenário mundial, um estudo de 522 cepas clínicas de *C. neoformans*, a resistência ao ICZ foi observada em 8,2% (43/522) das cepas com CIM de 1µg/mL e em 0,4% (2/522) com CIM de 2 µg/mL (BRANDT et al., 2001). Em amplo estudo realizado com 1.615 cepas de *C. neoformans*, a resistência ao ICZ foi observada em 20% (323/1615) das cepas, onde os valores de CIM variaram de 1 a 8 µg/mL (PFALLER et al., 2005b). Em 43 cepas de origem clínica humana e animal de *C. gattii*, a resistência ao ICZ foi observada em 23,26% (10/43), onde os valores de CIM variaram de 1 a 2 µg/mL (IQBAL et al., 2010). A resistência ao ICZ foi observada em três cepas ambientais de *C. neoformans* isoladas na Espanha com valores de CIM de 4, 8 e 16 µg/mL (MORERA-LÓPEZ et al., 2005). No presente estudo foi observado S-DD em 50%(3/6) para ICZ em cepas ambientais de *C. gattii*.

Com relação ao VCZ, a maioria dos estudos mostra CIM compatíveis com sensibilidade *in vitro* a esta droga (TRILLES et al., 2004, SOARES et al., 2005, MORACE et al., 2005, PERKINS et al., 2005, GOMEZ-LOPEZ et al., 2008, SOUZA et al., 2009, IQBAL et al., 2010, HAGEN et al., 2010 TRILLES et al., 2012). Um único estudo no Brasil, mostra resistência com CIM de 4 µg/mL em uma cepa dentre 100 cepas de *C. neoformans* analisadas (DIAS et al., 2006). Em outro estudo, nos USA, uma dentre 1.800 cepas *C. neoformans* apresentou resistência ao VCZ (PFALLER et al., 2005). Esses estudos mostram que se trata de evento esporádico, no entanto, estudo realizado na Espanha com cepas *C. neoformans* de origem ambiental, mostrou três cepas resistentes dentre 22 analisadas (MORERA-LÓPEZ et al., 2005).

Aspectos regionais e a origem ambiental de cepas analisadas podem influenciar perfis de sensibilidade/resistência aos antifungicos. Questões ambientais relacionadas à origem dos isolados, presença de xenobióticos em substratos onde

crecem *Cryptococcus*, podem interferir no metabolismo destas leveduras e induzir heteroresistência, descrita principalmente para azólicos (VARMA; KWON-CHUNG, 2010). Portanto, considera-se que estudos com ampla amostragem de cepas analisadas revelam médias de perfis ou comportamento de cepas de uma determinada espécie, no entanto, ressalta-se a importância e necessidade de estudos regionais bem desenhados para analisar perfis de sensibilidade *in vitro* a médio e longo prazo, tanto para cepas clínicas como ambientais, para conhecer melhor mecanismos relacionados ao risco de emergência de resistência. Fatores de indução de resistência, seja o uso de drogas antifúngicas em humanos e animais, sejam fatores ambientais como o uso de agrotóxicos, inseticidas e outros poluentes devem ser analisados em contextos locais ou regionais.

Com relação à AMB observou-se neste estudo a resistência em 2,02% nas cepas de *C. neoformans* e de 6,56% para *C. gattii* de origem clínica. Resistência foi também observada no ambiente em duas cepas (33,33% - 2/6) de *C. gattii* isoladas de madeira em decomposição no interior de oco em árvore viva, *Guettarda acreana*, na Ilha de Maracá – RR. Esta é uma área silvestre, preservada e de baixa antropização, que leva a supor que estas cepas não tiveram exposição prévia à AMB. Portanto, esse achado sugere resistência de *C. gattii* à AMB em ambiente silvestre. Na Colômbia, foi também observada resistência à AMB > 2,0 µg/mL em 10% (2/20) das cepas de *C. neoformans* (BEDOUT et al., 1999). Estes achados de resistência *in vitro* para AMB ocorreram em áreas geográficas contiguas.

Em diferentes estudos brasileiros, *C. neoformans* mostrou-se sensível para AMB com CIM ≤ 1 µg/mL (FRANZOT et al., 1996, CALVO et al., 2001, ALVES et al., 2001, FERNANDES et al., 2003, MORAES et al., 2003, DELGADO et al., 2005, SANTOS et al., 2005, KOBAYASHI et al., 2005, SOUZA et al., 2005, ALMEIDA et al., 2007, SOUZA et al., 2009, DA SILVA et al., 2012). No entanto a resistência à AMB foi observada em 30% (30/100) das cepas de *C. neoformans* utilizando o protocolo EUCAST (DIAS et al., 2006). Este método tem sido utilizado por alguns autores em vez do CLSI, limitando a comparação dos resultados por motivos descritos acima. Por outro lado, utilizando o protocolo M27- A2 (CLSI, 2002) foram encontrados valores de CIM de 2 µg/mL para AMB em *C. neoformans* e *C.gattii* compatíveis com resistência (TRILLES et al., 2004). Em cepas ambientais de *C. neoformans* foi observada CIM de 2 µg /mL para AMB, não sendo relatado o percentual de cepas resistentes (PEDROSO et al., 2006). Um trabalho na Bahia

utilizando M27-A3 (CLSI, 2008) registrou a resistência em 3,23% (2/62) das cepas de *C. neoformans* (MATOS et al., 2012). Este resultado se aproxima do resultado observado no presente estudo que analisou cepas de *C. neoformans* do norte do Brasil.

De fato, faltam estudos de correlação clínica com valores de CIM obtidos *in vitro* frente à AMB, e recentemente foi proposto valor de corte epidemiológico para AMB com valor de CIM de 1,0 µg/mL como sensível, tanto para *C. neoformans* como para *C. gattii* (ESPINEL-INGROFF et al., 2012). O valor de CIM de 1,0 µg/mL para AMB categorizado como sensível já era usado com base no estudo de Lozano-Chiu e colaboradores (1998). A resistência para AMB permanece mundialmente em torno de 1%, por outro lado no presente estudo foi observado percentual maior para *C. neoformans* (2,02%, 2/99) e principalmente para *C. gattii* (6,56%, 4/61). As cepas *C. neoformans* foram obtidas de dois casos, sem informação da idade e do sexo dos pacientes; as quatro cepas de *C.gattii* foram isoladas de três casos: uma criança de oito anos HIV negativa e um adolescente de 14 anos HIV negativo ambos do Pará, além de uma criança de 11 anos do Amazonas.

A ocorrência de resistência à AMB em crianças e adolescentes pode estar relacionada à casuística da qual se originaram a cepas, uma vez que no norte do Brasil 10 a 15% dos casos de criptococose ocorrem em crianças (LAZERA et. al., 2005). No entanto são necessários estudos de correlação clínica e *in vitro* para verificar se há uma diferenciação na resistência dos agentes da criptococose nesta faixa etária na região norte.

Com relação à 5FC são ocasionais os relatos de resistência nos estudos de cepas do Brasil (TRILLES et al., 2003, DELGADO et al., 2005, SANTOS et al., 2005, PEDROSO et al., 2006, ALMEIDA et al., 2007, TRILLES et al., 2012, MATOS et al., 2012).

Foi observado para *C. gattii* CIM de 32 µg/mL em uma das 19 cepas analisadas na Espanha (GOMEZ-LOPEZ et al., 2008), enquanto que em 49 cepas de *C. gattii* foi observada variação de CIM 0,25 a ≥ 64 µg/mL (TRILLES et al., 2012). Em *C. neoformans* há relato de uma cepa da Bahia resistente com CIM de 64 µg/mL, dentre 49 analisadas (MATOS et al., 2012). No presente estudo, CIM ≥ 32 µg/mL foi observada apenas pelo Etest em duas cepas de *C. neoformans* de origem ambiental do AM. Nas cepas de *C. neoformans* e de *C. gattii* de origem clínica não foi observado resistência a 5FC.

Em estudo de 1.811 cepas de *C. neoformans* (PFALLER, 2005) de diferentes continentes obtidas de 1990 a 2004, foi detectada 2% de resistência segundo o critério do CLSI adotado pelos autores (resistência com CIM ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$), o que se superpõe com o critério estabelecido por Espinel-Ingroff e colaboradores (2012). Mas pelo CLSI há ainda uma categoria S-DD para 5FC com CIM entre 8 e 16 $\mu\text{g/mL}$ e neste amplo estudo observaram-se 12 cepas em 1.811 nesta categoria.

Com relação ao critério S-DD, que sugere tendência à resistência, ou estado de vigilância a uma determinada droga, o trabalho de Almeida e colaboradores (2007) observou CIM de 16 $\mu\text{g/mL}$ em 23/79 de *C. neoformans* isolados de várias cidades do interior paulista.

Com relação a *C. gattii*, estudo com 43 cepas clínicas de humanos e animais da costa noroeste pacífica dos USA, não observou resistência e nem S-DD (IQBAL et al., 2010). Em estudo envolvendo 350 cepas de *C. gattii*, de origem diversa e global, foi observada CIM ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$ em algumas cepas, mas não foi discriminado o percentual destas no conjunto analisado, por ser considerado inexpressivo. Neste trabalho, 81 cepas provinham da América do Sul, sem evidência de resistência com CIM de 0,5 a 16 $\mu\text{g/mL}$ e MG de 2,86 $\mu\text{g/mL}$ (HAGEN et al., 2010). No presente trabalho, foram observados resultados idênticos na variação do valor de CIM e de MG maior para *C. gattii* (MG de 3,25 $\mu\text{g/mL}$) como observado por HAGEN e colaboradores (2010) quando o conjunto total de 350 cepas foram analisadas. É interessante ressaltar um estudo no Quênia com cepas *C. neoformans*, no qual foi observado CIM >16 $\mu\text{g/mL}$ em 51,2% (41/80) cepas analisadas (BII et al., 2007).

A padronização do teste de sensibilidade *in vitro* a drogas antifúngicas deu-se pelo uso sistematizado dos protocolos propostos pelo CLSI dos USA, utilizando inicialmente macro-diluição e em seguida micro-diluição em micro-placa em diversos centros de pesquisas. Em paralelo, o EUCAST estabeleceu também protocolos padronizados junto à comunidade científica na Europa, semelhantes ao CLSI, mas utilizando inóculo maior, em torno de 10^5 UFC/mL, enquanto que o CLSI recomenda inóculo de 10^3 UFC/mL. Portanto, uma das questões básicas destes protocolos é o tamanho do inóculo utilizado, o que certamente interfere no resultado final, isto é, no valor de CIM. Em vários estudos onde se utilizou a metodologia recomendada pelo EUCAST, para FCZ os valores de CIM foram maiores (DIAS et al., 2006, CUENCA-ESTRELLA et al., 2010, ZARAGOZA et al., 2011).

A adição de glicose e a agitação também passaram a ser uma recomendação do CLSI e do EUCAST quando cepas de *Cryptococcus* são analisadas, visto que se trata de uma levedura não fermentativa, mas, são necessários importantes ajustes técnicos padronizados, sem os quais os valores de CIM não serão totalmente confiáveis (ZARAGOZA et al., 2011).

Vários métodos estão disponíveis comercialmente, tais como *Sensititre-YeastOne*, Etest, *ATB Fungos* (França), Sistema Vitek 2, entre outros. Os resultados dos TSA obtidos por essas metodologias comerciais são na maioria das vezes compatíveis com aqueles obtidos pelos métodos padronizados (BORGHI et al., 2010, CEJUDO et al., 2010, TEWARI et al. 2012). No presente estudo foram também utilizadas duas metodologias comercializadas, Etest e Vitek 2, e seus resultados comparados com o método padronizado pelo CLSI.

No Brasil, destacam-se dois trabalhos utilizando Etest, um estudo com 100 cepas de *C. neoformans*, que mostrou resultados concordantes com EUCAST, com percentuais elevados para FCZ, VCZ e 5FC, e menores para ICZ e baixa concordância para AMB (DIAS et al., 2006). O segundo trabalho utiliza somente Etest, analisando cepas *C. neoformans* e *C. gattii*, encontrando resistência para ICZ e FCZ em cepas de *C. neoformans* (FAVALESSA et al., 2009).

Considerando a concordância essencial, onde são comparados os valores de CIM obtidos em cada método (CLSI e Etest), no presente trabalho a EA se apresentou elevada para todos os azólicos (FCZ 96%, ICZ 92%, VCZ 98%) e para 5FC (95%). A diferença de percentual de concordância para ICZ observado por Dias e colaboradores (2006) pode ser atribuída a diferenças no método de referência utilizado para comparação, o EUCAST. Não houve concordância entre CLSI e Etest para AMB no presente trabalho.

A maioria dos estudos analisa concordância de resultados entre testes para azólicos, sendo menos frequentes os que incluem a AMB. Analisando 12 isolados e comparando Etest com CLSI, Lozano-Chiu e colaboradores (1998) observaram concordância entre resultados para AMB. No entanto estes autores ressaltam que a utilização de meios diferentes, tal como Yeast Nitrogen Base (YNB, Difco Laboratories), muda os resultados finais para AMB.

Aller e colaboradores (2000) na Espanha analisaram 35 cepas *C. neoformans*, utilizaram o teste estatístico de Wilcoxon, adotando o coeficiente de concordância de ± 2 diluições, e utilizando RPMI-1640 adicionado de glicose a 2%,

foi observado baixo grau de concordância entre CLSI e Etest para AMB (13,5%), similar ao presente estudo, tanto em resultados como em metodologia. Estas variações, incluindo o tempo de leitura 48 ou 72 horas e variações do inóculo, são fatores que limitam as comparações entre metodologias. Portanto, apesar dos esforços, persistem resultados díspares, evidenciando as dificuldades para análise de EA, por exemplo, o relatado por Maxwell e colaboradores (2003) que encontraram alta concordância entre CLSI e Etest em 162 cepas de *C. neoformans* para AMB, com resultados divergentes de Aller e colaboradores (2000), e dos apresentados no presente trabalho. Maxwell e colaboradores (2003) utilizaram leitura de 72 horas para o Etest enquanto Aller e colaboradores (2000) e no presente trabalho realizaram leitura com 48 horas de incubação. Em 72 horas, com o inóculo de 10^8 UFC/mL utilizado no Etest, tem-se dificuldade de leitura do valor de CIM com base no ponto de interseção. Portanto, deve-se considerar que a utilização de 48 ou de 72 horas para leitura no Etest pode gerar resultados diferentes para a mesma cepa.

A análise da concordância categórica em relação aos critérios de interpretação dos valores de CIM em sensibilidade, S-DD e resistência obtida para cada método é expressa em percentual de discrepância (EMi, EM e EMG). Com relação ao CLSI e Etest, para AMB, 5FC, FCZ e VCZ observou-se alta concordância (maior que 94%) e menor para ICZ (75%) onde 4% das cepas consideradas como S-DD pelo método de referência foram classificadas como resistentes pelo Etest (EM), para cepas de *C. neoformans*. Em estudo comparando EUCAST com Etest foram identificados 30% de EMG para AMB em cepas *C. neoformans*, enquanto neste estudo foi observado somente 2%. Tais resultados divergentes estariam relacionados a diferenças de inóculo inicial e tempo de leitura utilizado em cada metodologia, da heterogeneidade das cepas analisadas e das leituras subjetivas. Deve-se levar em consideração a complexidade de fatores que influenciam sensibilidade dos testes *in vitro* que ainda não estão padronizados especificamente para *Cryptococcus*, mas foram transpostos a partir do proposto para leveduras do gênero *Candida*.

Com relação a cepas *C. gattii*, concordância foi observada acima de 90% para AMB e VCZ, e de 82% para 5FC. Para ICZ, observou-se 60,65% de resultados discordantes, causados por EMi, refletindo a ocorrência de S-DD em cepas de *C. gattii* frente a esta droga, verificada em ambos os métodos. De maneira similar,

para FCZ observou-se 31% de discordância para EMI. O EMG ocorreu em baixos percentuais para AMB e ICZ, 6% e 3% respectivamente, em uma cepa identificada como resistente pelo método padrão e classificada como sensível pelos demais métodos. O impacto do EMG para o clínico é receber um resultado sensível falso, principalmente nos casos de falência da droga antifúngica utilizada, não disparando um sinal de alerta para a revisão de esquema terapêutico em uso. Até o momento não existem casos relatados de falha terapêutica com AMB correspondendo à resistência *in vitro* a este antifúngico. Faltam estudos de correlação clínica para diferenciar estes achados *in vitro*, seja do resultado obtido pelo CLSI ou do Etest, principalmente para AMB. Qual metodologia realmente identifica resistência, aos agentes da criptococose e qual permite discriminar *in vitro*, cepas que são resistentes *in vivo*? São necessários estudos clínico-laboratoriais de correlação e inter-laboratoriais para tentar responder as questões acima.

Na falta de estudo de correlação *in vivo* e *in vitro*, um esforço nesta direção foi à recente determinação de ponto de corte epidemiológico para *C. neoformans* e *C.gattii* baseado nos valores de CIM obtidos para AMB e 5FC por vários pesquisadores no âmbito mundial. Este valor equivale ao ponto de corte para atribuir sensibilidade ou resistência para AMB e 5FC (ESPINEL-INGROFF et al., 2012), sendo para AMB $>1,0 \mu\text{g/mL}$ e para 5FC $>16 \mu\text{g/mL}$.

Com relação à comparação do CLSI e Vitek 2, obteve-se 100% de EA para AMB, 62,24% para FCZ e 26% para 5FC, não sendo possível determinar CIM para VCZ, por não ter sido expresso o valor exato de CIM. Na Espanha, estudo similar com 89 cepas de *C. neoformans*, com tempo de leitura variando de 15:50 a 33:15h para Vitek 2, relata que não foi determinado o valor de CIM para VCZ, como observado neste estudo. No entanto obtiveram-se diferentes percentuais de AE para os demais antifúngicos, AMB 69%, FCZ 91%, e 5FC 84%, quando comparados aos do presente estudo. A CC foi também determinada no presente estudo, sendo para AMB 98,99% (1,01% de EMG), para FCZ 100%, e 5FC 96,97% (3,03% de EMI), resultados similares aos observados por Cejudo e colaboradores (2010), exceto para 5FC.

Em outro estudo, onde 16 cepas de *C. neoformans* foram analisadas, foi observado AE média de 92% entre os métodos CLSI e Vitek 2. O tempo de leitura para Vitek 2 foi no máximo 34 horas e para o CLSI a leitura foi de 48h. Outras análises realizadas neste estudo não especificam separadamente os resultados

obtidos para *C. neoformans* (CUENCA-ESTRELLA et al., 2010). Estudo realizado na Itália comparando CIM, sem atribuir EA, relata que os resultados obtidos pelo CLSI e Vitek 2 para AMB e FCZ, em 10 cepas clínicas de *C. neoformans*, foram todos categorizados como sensíveis, sendo que a CIM para VCZ não foi determinado pelo Vitek 2, o tempo de leitura no Vitek 2 variou de 19 a 29h (BORGHI et al., 2010).

Estudo realizado na Índia comparou 62 cepas clínicas de *C. neoformans* por CLSI e Vitek 2, observando AE para FCZ 82,2% e para AMB 75,8%, e CC para AMB 80,7%, sendo 19,3% de EMI e para FCZ 98,39%, sendo 1,61% de EM (TEWARI et al., 2012). Os resultados obtidos no presente estudo foram diferentes, principalmente na EA.

Não há estudos comparando Vitek 2 e CLSI para cepas *C. gattii*, exceto o presente trabalho que revela 100% de EA para AMB, 91,8% para FCZ e 11,45% para 5FC. Pela dificuldade de determinação do valor real de CIM para VCZ nas cepas de *C. neoformans* e *C. gattii* e para 5FC em cepas de *C. gattii* não foi possível determinar a EA nesses grupos. Com relação a CC observou-se 95% para AMB, com 5% de EMG, 77% para FCZ, com 23% EMI e 81,7% para 5FC, com 17,7% EMI. Portanto, pelo Sistema Vitek 2 existem limitações para comparação entre os valores de CIM, influenciando os valores calculados para EA na comparação com os valores de CIM obtidos pelo CLSI. Outro aspecto é o tempo de leitura do próprio Sistema Vitek 2, com leitura variando entre 15 a 33:00h segundo a literatura, e entre 15 a 27:00h no presente trabalho.

Os agentes da criptococose, *C. neoformans* e *C. gattii*, são leveduras de crescimento mais lento e uma leitura precoce pode comprometer o resultado. Por outro lado, a temperatura utilizada de 37°C no Vitek 2 é diferente da utilizada pelo CLSI de 35°C. Portanto, são necessários mais estudos de correlação para verificar a utilização desse método comercial na prática clínica, cuja principal vantagem é ser totalmente automatizado e ter leitura por espectrofotometria.

A importância de fatores como temperatura, composição do meio para obtenção de valores de CIM e detecção de resistência in vitro foi estudada por Zaragoza e colaboradores (2011), utilizando RPMI com glicose 0,2 % ou 2%, sob temperatura de 30°C ou 35°C, com e sem agitação, e variação do inoculo (10^3 , 10^4 e 10^5 UFC/mL). Este autor observou que *C. neoformans* atinge mais rápido a fase log em 6 horas de cultivo com inoculo 10^5 UFC/mL e agitação a 30°C, sendo indiferente a concentração de glicose. Ao contrário, o tempo mais longo para iniciar a fase lag,

acima de 12 horas, foi com inóculo de 10^3 UFC/mL e temperatura de 35°C, conforme preconizado pelo CLSI.

5.3 DIVERSIDADE GENÉTICA

Com relação à diversidade genética, dentre as 52 cepas de *C. neoformans* observou-se o predomínio do genótipo AFLP1, sendo 41/52 (78,85%) em cepas clínicas, das quatro regiões brasileiras analisadas, que apresentam entre si similaridade de mais de 90%, formando um grupo bem definido e homogêneo, sugerindo estrutura populacional predominantemente clonal. Vale ressaltar que apesar das distâncias e diferenças climáticas regionais este perfil mante-se bem homogêneo. O genótipo AFLP1 foi detectado também em fontes ambientais, incluindo uma cepa isolada de madeira em decomposição em oco de árvore nativa, *Myroxylon peruiferum*, do Amazonas (região N), uma cepa isolada de madeira em decomposição em oco de árvore (*Cassia grandis*), e duas cepas de excretas de pombos em área urbana no Rio de Janeiro (região SE), demonstrando alta similaridade entre cepas de origem clínica e ambiental, e reafirmando possibilidade de infecção humana a partir destas fontes ambientais (BOEKHOUT et al., 2001; TRILLES et al., 2003).

No Brasil estudo de cepas predominantemente ambientais utilizando AFLP (TRILLES et al., 2003) demonstrou o predomínio de AFLP1 dentre os isolados de *C. neoformans*, com similaridade acima de 90%, com resultados similares aos do presente estudo, no qual *C. neoformans* de origem clínica predominou. Portanto, estes dados se complementam e indicam a endemicidade deste genótipo no Brasil. Por outro lado, AFLP1 é cosmopolita e predomina como agente da criptococose associado a aids em todo o mundo (BOEKHOUT et al., 2001; BOVERS et al., 2008). O Brasil reproduz este padrão cosmopolita e apresenta fontes ambientais, relacionadas a substratos vegetais em árvores e a excretas de aves. O genótipo AFLP1 corresponde ao tipo molecular VNI, identificado por PCR-RFLP do gene *URA5*. Em trabalho realizado em Vancouver (KIDD et al., 2004) ambas as metodologias foram utilizadas para estudos epidemiológicos e ficou evidente a correspondência entre os tipos AFLP e VN/VG e também sorotipos, por exemplo, o

AFLP1 corresponde ao tipo VNI, e a maioria ao sorotipo A. O genótipo variante AFLP1A foi observado em cepas *C. neoformans* oriundas do RJ e do PI. Considerando o total de cepas analisadas 54,22% (45/83) corresponde ao genótipo AFLP1 e 4,82% (4/83) ao AFLP1A.

Estudo de 443 isolados do Brasil usando a genotipagem por PCR- RFLP do gene *URA5* o tipo VNI/AFLP1 ocorreu em 64% e VNII/AFLP1A em 5%. Estes dois genótipos têm sido descritos associados a aids, em todo o mundo, e este padrão cosmopolita repete-se no Brasil (TRILLES et al., 2008).

O genótipo AFLP2 foi identificado em 2,41% (2/83) no presente trabalho, correspondendo a um isolado clínico do PR e outro de detritos de eucalipto do RS, da região sul do Brasil, ambas de clima temperado. Neste genótipo se agrupa cepas de *C. neoformans* sorotipo D, formando um grupo diferenciado com similaridade muito baixa, cerca de 50%, principalmente com o genótipo AFLP1. O poder discriminatório desta técnica é alto e relaciona-se com os distintos perfis encontrados dentro da mesma espécie. *C. neoformans* sorotipo D/AFLP2/VNIV tem maior incidência nos estudos realizados em países europeus: Portugal, Espanha, França, Itália, Bélgica, Alemanha entre outros, como apresentado por Meyer e colaboradores (2011).

O genótipo AFLP3, sorotipo AD, híbrido de cepas AFLP1 e AFLP2, ocorreu em uma cepa do Rio de Janeiro isolada de excreta de pombo (LMM 378), este se agregou com a cepa sorotipo A/AFLP1A (LM 385), que possivelmente, também seja híbrida com expressão de um só sorotipo. Observou-se que os fenótipos com sorotipo AD ocorreram em perfis AFLP1, AFLP2 e AFLP3, demonstrando a necessidade de estudos envolvendo expressão capsular e rearranjo de cromossomas durante o processo de hibridação. Híbridos têm sido descritos entre *C. neoformans* sorotipo A e sorotipo D, bem como entre as espécies *C. neoformans* e *C. gattii* (BOVERS et al., 2006, 2008, LI et al., 2012).

Com relação às cepas analisadas de *C. gattii*, o genótipo AFLP4 formou um grupo separado, composto por uma cepa de referência ambiental oriunda da Austrália e três cepas do Rio de Janeiro, sendo duas clínicas e uma ambiental de excretas de morcego, correspondendo a 4.82% (4/83). Este genótipo AFLP4/VGI também foi encontrado em 3% de cepas de *C. gattii* do Brasil em estudo realizado anteriormente (TRILLES et al., 2008). Chama a atenção, o isolamento deste perfil relacionado ao habitat de morcegos em uma casa no Rio de Janeiro, no bairro

Humaitá, e a ocorrência de casos clínicos no mesmo município. Observa-se também que fontes ambientais de *Cryptococcus* patogênicos não se restringem aos clássicos habitat de aves e a substratos vegetais, tendo ecologia complexa. São necessários estudos epidemiológicos para verificar a possível dispersão do genótipo AFLP4/VGI por morcegos, tão bem adaptados ao ambiente urbano.

Com relação ao AFLP5, somente uma cepa do Rio de Janeiro foi identificada, isolada de caso clínico e sorotipo C. Esta cepa ficou agrupada junto com outras duas cepas de referência da CBS e uma cepa clínica oriunda dos USA. O genótipo AFPL5 corresponde ao tipo molecular VGIII. A ocorrência deste perfil é ocasional no Brasil e já foi observado em cepas de Pernambuco e do Rio Grande do Sul (TRILLES et al. 2008). Na America Latina este genótipo foi descrito na Colômbia, principalmente em cepas *C. gattii* de origem ambiental (ESCANDÓN et al., 2006).

O predomínio de AFLP6 é evidente no conjunto analisado 30,12%(25/83), prevalecendo de forma expressiva nas cepas de *C. gattii*, sendo 80,64% (25/31) em cepas de origem clínica e ambiental: 18 do PI, uma do AM, uma do Ceará, três do RJ, uma da Austrália e uma dos Estados Unidos. Apresentam entre si elevada similaridade, exceto uma do Rio de Janeiro. No Rio de Janeiro três cepas *C. gattii*, com esse perfil, foram isoladas de pacientes com aids, e esses podem ser casos que migraram para RJ, como já sugerido em trabalhos anteriores (ROZENBAUM, 1994, NISHIKAWA et al., 2003, TRILLES et al., 2003). As cepas oriundas do NE, das quais havia informação disponível, foram obtidas de pacientes HIV negativo, confirmando a prevalência já observada de *C.gattii* sorotipo B, AFLP6/VGII, como causa de criptococose em indivíduos sem evidência de imunodepressão, e como agente de micose primária endêmica (CAVALCANTI 1995, NISHIKAWA et al., 2003, TRILLES et al., 2008). Um trabalho realizado no Pará também evidencia o predomínio de infecções por VGII/AFLP6 em crianças e adultos jovens, HIV negativos causando meningoencefalite grave (CORRÊA et al., 1999)

Um trabalho pioneiro utilizando AFLP com cepas de *C. neoformans* e *C. gattii* do Brasil, identificou sete cepas de *C. gattii* com genótipo AFLP6 em 12,3% (7/57) e chama a atenção para a variabilidade de genótipos encontrados no Brasil (BARRETO-OLIVEIRA et al., 2004). Somente uma das cepas foi oriunda do NE e nenhuma do N. O genótipo AFLP6 foi encontrado em casos diagnosticados em São Paulo (SILVA et al., 2012).

Das cepas de *C. gattii* ambientais AFLP6, encontradas no presente estudo, deve-se mencionar aquela isolada de baço de tatu, a qual mostra que este animal adaptado ao semi-árido pode inalar e desenvolver infecção sub clínica nesta região, e torna evidente que os habitats deste agente podem ser diversos e se adaptam em áreas de condições climáticas extremas, com baixa umidade e elevadas temperaturas. Este mesmo genótipo endêmico do N e NE brasileiros (DA SILVA et al., 2012, FREIRE et al., 2012, MARTINS et al., 2011, SANTOS et al., 2008, COSTA et al., 2009) têm sido relacionados ao surto, que evoluiu para endemicidade, no Canadá, na ilha de Vancouver, com expansão para os EUA, na costa pacífica (KIDD et al., 2004, DATTA et al., 2009). Esta região é predominantemente temperada, e diferente do ponto de vista climático em relação ao N e NE do Brasil.

6 CONCLUSÕES

6.1 FATORES DE VIRULÊNCIA

Todas as cepas de *C. neoformans* e *C. gattii* apresentaram termotolerância a 36°C e a 40°C por 72h, mantendo-se viáveis nestas condições de estudo.

A presença de cápsula foi observada em todas as cepas testadas, sendo que sob indução a produção de cápsula foi maior nas cepas de *C. gattii*.

A atividade enzimática de fosfolipase extracelular esteve presente em todas as cepas analisadas, com atividade moderada em cepas de *C. neoformans* e *C. gattii*.

A produção de melanina foi expressa em todas as cepas testadas, sem identificação de variante albino.

A expressão fenotípica dos fatores de virulência: termotolerância, produção de cápsula, melanina e de fosfolipase extracelular foi observada em todas as cepas de *C. neoformans* e *C. gattii*, mantidas no laboratório, sob congelamento a -20°C (9 a 16 anos), ultracongelamento a -70°C (2 a 9 anos) e liofilizadas (9 a 24anos), demonstrando estabilidade, destes fatores de virulência, fundamentais para a patogenicidade desses fungos, preservados na Coleção de Culturas do INCQS,

6.2 TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS

A resistência para ao FCZ não foi observada em *C. neoformans*, no entanto, em 14 cepas de *C. gattii* apresentaram S-DD, correspondendo à resistência pelo critério de Aller e colaboradores (2000). Estes achados têm implicações para questões terapêuticas de casos oriundos da região N do Brasil.

A S-DD ao FCZ foi detectada em *C.gattii* isoladas de três casos em crianças e adolescentes, podendo estar relacionada ao perfil epidemiológico da região N, porém, mais estudos dirigidos à sensibilidade *in vitro* nestas faixas etárias são necessários.

A detecção de resistência ao FCZ em *C.gattii* isolado de madeira em decomposição de árvore nativa, *Theobroma cacao*, sugere ocorrência de resistência primária em ambiente silvestre, com baixa ação antrópica na região do estado do Amazonas.

Para o ICZ foi observada S-DD em 12 cepas de *C. neoformans* e em 46 cepas de *C. gattii* de origem clínica. Chama à atenção a ocorrência de S-DD em três de seis cepas ambientais de *C. gattii*.

Com relação ao azólico VCZ, todas as cepas foram sensíveis.

A resistência à AMB foi observada em 2 cepas clínicas de *C. neoformans* analisadas. Por outro lado, a resistência à AMB foi maior em cepas clínicas de *C. gattii* (n=4), ocorrendo também em cepas ambientais. Ressalta-se a detecção de resistência a AMB em dois isolados de área silvestre, em *Guettarda acreana*, árvore original da Amazônia, em área preservada, sugerindo resistência primária neste ambiente.

Para 5FC foi detectado S-DD em 11 das 61 cepas de *C. gattii* analisadas, enquanto que para *C. neoformans* foi observado em três cepas

Todas as cepas de *C. neoformans* e *C. gattii* de origem ambiental (n=16) foram sensíveis aos antifúngicos testados, exceto para a AMB.

6.3 COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS

Na comparação entre os valores de CIM obtidos pelo CLSI e Etest a EA demonstrou alto percentual para os azólicos nas cepas analisadas de *C. neoformans* (FCZ 96%, ICZ 92% e VCZ 98%) e de *C. gattii* (FCZ 96,72%, ICZ e VCZ em 93,44%). Com relação à 5FC a EA foi menor nas cepas de *C. gattii* (62,3%) do que *C. neoformans* (95%).

No entanto para AMB chama-se à atenção a baixa EA, em torno de 1% entre estas metodologias, demonstrando a baixa eficiência do Etest para este antifúngico. Contudo a EA obtida pela comparação entre os valores de CIM para AMB, pelos métodos CLSI e Etest, foram significativamente diferentes ($p < 0,0001$), entretanto, a EA foi alta para ICZ, FCZ e VCZ para as cepas de *C. neoformans* e *C. gattii* de origem clínica e ambiental.

Ainda na comparação CLSI e Etest a CC foi elevada para *C. neoformans* sendo de 100% para FCZ e VCZ. Para ICZ foi 74,75% (21,21% EMI e 4% EM), e para 5FC foi de 93,94% (5,05% EMI e 1,01% EM). Entretanto, em cepas de *C. gattii* foram verificados valores de CC menores, sendo para FCZ 67,21% (31,15% EMI e 1,64 EM), ICZ 36,07% (60,65% EMI e 3,28% EMG), VCZ 100%, e 5FC 81,67% (18,33% EMI).

Para AMB a CC entre esses métodos foi de 93,44% (6,56% EMG) em cepas *C. gattii* e para *C. neoformans* a foi de 97,98% (2,02% EMG). Apesar da elevada concordância deve-se ficar atento com resultado sensível a partir do Etest, pois eventual resultado falso sensível poderá ocorrer.

Na comparação do CLSI com Vitek 2, a EA foi de 100% para AMB, em ambas espécies de origem clínica. No entanto para FCZ, em 37% das cepas o valor real de CIM não foi determinado pelo Vitek 2, gerando um percentual de EA baixo para *C. neoformans* (62,24%). A mesma limitação foi observada para o cálculo de AE para 5FC, com obtenção de baixo percentual, sendo 26,53% para *C. neoformans* e 11,47% para *C. gattii*, significativamente diferentes com $p < 0,0001$ nas duas espécies estudadas.

A resistência a AMB foi identificada pelo CLSI e pelo Vitek 2 em quatro cepas de clínicas de *C. gattii*, sendo a resistência á AMB identificada na mesma cepa pelos dois métodos.

A CC entre esses métodos para AMB foi elevada, com 90,16% apresentando 4,92% de EMG e 4,92% de EMI para *C. gattii*, e para cepas de *C. neoformans* foi 99% em CC, sendo 1% EMG; novamente é observada a ocorrência de EMG levando a um resultado falso sensível para esta droga. Para 5FC a CC foi de 96,97% (3,03% EMI), enquanto que para FCZ e VCZ foi de 100%.

6.4 DIVERSIDADE GENÉTICA

Dentre as 52 cepas de *C. neoformans* observou-se o predomínio do genótipo AFLP1 (78,85% - 41/52) em cepas clínicas, das quatro regiões brasileiras, com mais de 90% de similaridade. O genótipo AFLP1 é constituído principalmente por

C. neoformans sorotipo A algumas cepas sorotipo AD, característico de híbrido, e cepas não tipáveis que também apresentaram esse genótipo.

O genótipo AFLP1A mostra o polimorfismo gerado pelo alto poder discriminatório desta técnica, formado por cepas de *C. neoformans* sorotipo A. Foi observado 7,69% (4/52) em cepas de *C. neoformans* do RJ e PI.

Com relação ao genótipo AFLP2, identificado em 3,84% (2/52), sorotipo D, sendo um isolado clínico do Paraná e outro de detritos de eucalipto do RS, região sul do Brasil.

Com relação ao genótipo AFLP3, sorotipo AD, híbrido de cepas AFLP1 e AFLP2, ocorreu somente em uma cepa do Rio de Janeiro isolada de excreta de pombo.

Nas cepas de *C. gattii* observou-se polimorfismo mais acentuado dentro do mesmo genótipo, demonstrando maior diversidade genética entre cepas dessa espécie, que se agruparam nos genótipos AFPL 4, 5 e 6.

O genótipo AFLP4 formou um grupo separado composto por cepas de referência e três cepas do Rio de Janeiro, sendo duas clínicas e uma ambiental de excretas de morcego, correspondendo a 9,68% (3/31). Neste genótipo se agrupou uma cepa ambiental da Austrália.

Com relação ao AFLP5, somente uma cepa do Rio de Janeiro foi identificada, isolada de caso clínico e sorotipo C, essa cepa ficou agrupada junto com outras duas cepas de referência da CBS e uma cepa clínica oriunda dos USA.

Finalmente, dentro das cepas de *C. gattii* o predomínio de AFLP6 é evidente no conjunto analisado de forma expressiva em 80,64% (25/31). Apresentam entre si elevada similaridade, e prevalecem as cepas clínicas e ambientais do nordeste brasileiro. Estes resultados reafirmam achados anteriores da ocorrência endêmica de infecções humanas por este genótipo nesta região.

Pode-se concluir que os resultados obtidos neste trabalho contribuí para o desenvolvimento de políticas relativas à vigilância na prevenção e no monitoramento do aparecimento de resistência aos antifúngicos mais utilizados na clínica médica para o tratamento da criptococose, resultando em programas de controles baseados em dados documentados em publicações científicas.

O perfil de sensibilidade aos antifúngicos, os fatores de virulência e os perfis moleculares demonstrados neste estudo servirão como base descritiva, gerando indicadores para o estabelecimento de políticas relativas à vigilância sanitária e

epidemiológica da criptococose, de seus agentes nas diferentes regiões geográficas do Brasil. Também, colabora para a expansão na vigilância internacional relacionada à sensibilidade a antifúngicos utilizados na criptococose, visto que os dados publicados são relativos a estudos com casuística pequena, isolados de regiões geográficas limitadas e em curto período de tempo. Por fim, possibilita subsídios para intervir nos riscos sanitários relativos à prevenção e ao monitoramento de resistência aos antifúngicos nas cepas virulenta.

Deste modo os resultados obtidos nesta pesquisa demonstram ser necessário o uso racional de antifúngicos na terapia da criptococose, permitindo, assim, a prevenção e o controle de disseminação da resistência. Logo colabora na construção de indicadores para assistência à Saúde Pública e que futuramente servirá de base para a inclusão das espécies de *Cryptococcus* no grupo de micro-organismos prioritários da Rede RM.

REFERÊNCIAS

ALLER, A. I. et al. Correlation of fluconazole MICs with clinical outcome in cryptococcal infection. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 44, n. 6, p. 1544-1548, 2000.

ALMEIDA, A. M. et al. Molecular typing and antifungal susceptibility of clinical sequential isolates of *Cryptococcus neoformans* from Sao Paulo State, Brazil. **FEMS Yeast Res.**, v. 184, n. 2, p. 152-164, 2007.

ALSPAUGH, J. A. et al. *RAS1* regulates filamentation, mating and growth at high temperature of *Cryptococcus neoformans*. **Mol. Microbiol.**, v. 36, n. 2, p. 352-365, 2000.

ALSPAUGH, J. A. et al. G- Protein Signaling Pathways: Regulating Morphogenesis and Virulence of *Cryptococcus*. In: HEITMAN, J. et al. **Cryptococcus: From Human Pathogen to Model Yeast**. American Society for Microbiology Press, Washington, DC., 2011, p. 153-165.

ALVES, S. H et al. *In vitro* susceptibility to antifungal agents of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolated in Southern of Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 43, n. 5, p. 267-270, 2001.

AMINNEJAD, M. et al. Identification of novel hybrids between *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* VNI and *Cryptococcus gattii* VGII. **Mycopathologia**, v. 173, p. 337-346, 2012.

ANVISA. Boletim Informativo da Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde. **Rede RM**, 2009. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/divulga/newsletter/rede_rm/index.asp>. Acesso em: 27 maio 2012.

ANVISA. Diretrizes para prevenção e controle da resistência microbiana. Brasília, 2007. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/diretrizes.pdf>>. Acesso em: 27 maio 2012.

ANVISA; OPAS. Monitoramento e Prevenção da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde Projeto Termo de Cooperação: ANVISA / OPAS Brasília: ANVISA, 2006. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/69a6fc804902d6b8a6e7be466b74119d/tc37_projeto_231106.pdf?MOD=AJPERE>. Acesso em: 27 maio 2012.

ANVISA; OPAS. Monitoramento e prevenção da resistência microbiana em serviços de saúde: relatório anual 2008. Brasília: ANVISA, 2009. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/divulga/newsletter/rede_rm/2009/100709_relatorio_2008.pdf>. Acesso em: 27 maio 2012.

ANVISA; OPAS. Projeto de implantação da Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde: Termo de Cooperação ANVISA/OPAS. Brasília: ANVISA, 2005. Disponível em:

<http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/hsentinela/projeto_rede_microbiana.pdf>
Acesso em: 27 maio 2012.

BALKIS, M. M. et al. Mechanisms of Fungal Resistance: An Overview. **Drugs**, v. 62, p. 1025-1040, 2002.

BALLOU, E. R. et al. Two CDC42 paralogues modulate *Cryptococcus neoformans* thermotolerance and morphogenesis under host physiological conditions. **Mol. Microbiol.**, v. 75, n. 3, p. 763–780, 2010.

BARRETO DE OLIVEIRA, M. T et al. *Cryptococcus neoformans* shows a remarkable genotypic diversity in Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 3, p. 1356-1359, 2004.

BEDOUT, C. et al. *In vitro* antifungal susceptibility of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* and *C. neoformans* var. *gattii*. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 16, p. 36-39, 1999.

BERG, J. C. J. et al. The hidden danger of primary fluconazole prophylaxis for patients with AIDS. **Clin. Infect. Dis.**, v. 26, p. 186-187, 1998.

BICANIC, T. et al. High-dose amphotericin B with flucytosine for the treatment of cryptococcal meningitis in HIV-infected patients: a randomized trial. **Clin. Infect. Dis.**, v. 47, n. 1, p. 123-130, 2008.

BII, C. C. et al. Antifungal drug susceptibility of *Cryptococcus neoformans* from clinical sources in Nairobi, Kenya. **Mycoses**, v. 50, n. 1, p. 25-30, 2007.

BLOCK, E. R. et al. 5-Fluorocytosine resistance in *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 3, p. 649–656, 1973.

BOEKHOUT, T. et al. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology**, v. 147, p. 891-907, 2001.

BOURGEOIS, N. et al. Antifungal susceptibility of 205 *Candida* spp. isolated primarily during invasive candidiasis and comparison of the Vitek 2 system with the CLSI broth microdilution and Etest methods. **J. Clin. Microbiol.**, v. 48, p. 154–161, 2010.

BORGHI, E. et al. Comparative evaluation of the Vitek 2 yeast susceptibility test and CLSI broth microdilution reference method for testing antifungal susceptibility of invasive fungal isolates in Italy: the GISIA3 study. **J. Clin. Microbiol.**, v. 48, n. 9, p. 3153-3157, 2010.

BOVERS, M. et al. Unique hybrids between the fungal pathogens *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **FEMS Yeast Research.**, v. 6, n. 4, p. 599–607, 2006.

BOVERS, M. et al. AIDS Patient Death Caused by Novel *Cryptococcus neoformans* × *C. gattii* Hybrid. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 14, n. 7, p. 1105–1108, 2008.

BRANDT, M. E. et al. Trends in antifungal drug susceptibility of *Cryptococcus neoformans* isolates in the United States: 1992 to 1994 and 1996 to 1998. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 45, n. 11, p. 3065-3069, 2001.

BRASIL. Constituição (1988). **Constituição da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF: Senado, 1988.

BRASIL. Lei nº 9782 de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária e cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, configure infrações à legislação sanitária federal e estabelece as sanções respectivas. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, p. 1-6, 27 jan. 1999.

BRASIL. Medida Provisória nº 2.190-34, de 23 de agosto de 2001. Altera dispositivos das Leis no 9.782, de 26 de janeiro de 1999, que define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária e cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e no 6.437, de 20 de agosto de 1977, que configura infrações à legislação sanitária federal e estabelece as sanções respectivas, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, Seção 1, p. 15, 24 ago. 2001.

BRASIL. Portaria n. 1133/GM, de 6 de julho de 2005. Institui o Comitê Técnico Assessor para Uso Racional de Antimicrobiano e Resistência Microbiana - Curarem e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo**. Brasília, 2005. Disponível em: <<http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2005/GM/GM-1133.htm>>. Acesso em: 21 jan. 2012.

BRASIL. Portaria n. 629, de 8 de junho de 2009. Instituir a Comissão de Assessoria Técnica em Resistência Microbiana em Serviços de Saúde (CATREM). **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo**. Brasília, 9 jun. 2009. Seção 2, p. 33-34. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/divulga/newsletter/rede_rm/2009/100709_portaria.pdf>. Acesso em: 27 maio 2012.

BRASIL. Resolução nº 8 de 15 de outubro de 1999. A Gerência-Geral de Laboratórios da Agência Nacional de Vigilância Sanitária funciona junto ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - INCQS, sendo responsável pela Gerência Geral o Diretor do INCQS. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, Seção 1, 18 out. 1999.

BROUWER, A. E.; Combination antifungal therapies for HIV-associated cryptococcal meningitis: a randomised trial. **Lancet**, v. 363, n. 9423, p. 1764-1767, 2004.

BUTTKE, T. M.; CHAPMAN, S. W. Inhibition by ketoconazole of mitogen-induced DNA synthesis and cholesterol biosynthesis in lymphocytes. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 24, n. 4, p. 217-270, 1983.

CALLEJAS, A. et al. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* serotype C from the environment in Colombia. **Med. Mycol.**, v. 36, p. 341-344, 1998.

CALVO, B. M. et al. Antifungal susceptibilities, varieties, and electrophoretic karyotypes of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* from Brazil, Chile, and Venezuela. **J. Clin. Microbiol.**, v.39, n. 6, p. 2348-2350, 2001.

CASADEVALL, A.; PERFECT, J. R. In: *Cryptococcus neoformans*. **American Society for Microbiology Press, Washington, DC.**, 1998.

CAVALCANTI, M. A. S. Criptococose e seu agente no Meio Norte, estados do Piauí e Maranhão, Brasil. Rio de Janeiro, 1995. Tese [Doutorado em Biologia parasitária] - **Fundação Oswaldo Cruz e Universidade Federal do Piauí (Teresina)**, 1995.

CEJUDO, M. A. et al. Evaluation of the VITEK 2 system to test the susceptibility of *Candida* spp., *Trichosporon asahii* and *Cryptococcus neoformans* to amphotericin B, flucytosine, fluconazole and voriconazole: a comparison with the M27-A3 reference method. **Med. Mycol.**, v. 48, n. 5, p. 710-719, 2010.

CHANG, Y. C. et al. Complementation of a capsule deficiency mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. **Mol. Cell. Biol.**, v. 14, p. 4912-4919, 1994.

CHANG, Y. C. et al. The second capsule gene of *Cryptococcus neoformans*, *Cap64*, is essential for virulence. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 1977-1983, 1996.

CHANG, Y. C.; KWON-CHUNG, K. J. Isolation of the third capsule-associated gene, CAP60, required for virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 2230-2236, 1998.

CHEN, S. C. et al. Identification of extracellular phospholipase B, lysophospholipase, and acyltransferase produced by *Cryptococcus neoformans*. **Infect. Immun.**, v. 65, n. 2, p. 405-411, 1997.

CHEN, S. C. et al. Purification and characterization of secretory phospholipase B, lysophospholipase and lysophospholipase/transacylase from a virulent strain of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **J. Biochem.**, v. 15, p. 347, p. 431-439, 2000.

CHERNIAK, R. et al. Facilitated isolation, purification, and analysis of glucuronoxylomannan of *Cryptococcus neoformans*. **Infect. Immun.**, v. 59, p.59-64, 1991.

CHERNIAK, R.; SUNDSTROM, J. B. Polysaccharide antigens of the capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 5, p. 1507-1512, 1994.

CHOWDHARY, A. et al. *In vitro* antifungal susceptibility profiles and genotypes of 308 clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii* serotype B from north-western India. **J. Med. Microbiol.**, v. 60, n. 7, p. 961-967, 2011.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Reference Method for broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard. **M-27A3**. 3^a

edição Ed. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA., v. 28, n. 14, 2008.

CORRÊA, M. P. C. S. et al. Criptococose em crianças no estado do Pará, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 32, p. 505-508, 1999.

COSTA, A. K. et al. Urban pigeons (*Columba livia*) as a potential source of pathogenic yeasts: a focus on antifungal susceptibility of *Cryptococcus* strains in Northeast Brazil. **Mycopathologia**. v. 169, n. 3. p. 207-213, 2010.

COSTA, S. P. et al. First isolation of *Cryptococcus gattii* molecular type VGII and *Cryptococcus neoformans* molecular type VNI from environmental sources in the city of Belém, Pará, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 4, p. 662-664, 2009.

COX, G. M. et al. Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. **Mol. Microbiol.**, v. 39, n. 1, p. 166-175, 2001.

CUENCA-ESTRELLA, M.; RODRÍGUEZ-TUDELA, J. L. Pueden Basarse las Indicaciones de los Antifúngicos en los Estudios de Sensibilidad. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 19, p. 133-138, 2002.

CUENCA-ESTRELLA, M. et al. Comparison of the Vitek 2 antifungal susceptibility system with the clinical and laboratory standards institute (CLSI) and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Broth microdilution reference Methods and with the sensititre YeastOne and Etest techniques for *in vitro* detection of antifungal resistance in yeast isolates. **J. Clin. Microbiol.**, v. 48, n. 5, p. 1782-1786, 2010.

DA SILVA, B. K. et al. Characterization of clinical isolates of the *Cryptococcus neoformans* - *Cryptococcus gattii* species complex from the Amazonas State in Brazil. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 29, n. 1, p. 40-43, 2012.

DARZYNKIEWICZ, Z. Differential staining of DNA and RNA in intact cells and isolated cell nuclei with acridine orange. **Methods. Cell. Biol.**, v. 33, p. 285-298, 1990.

DATTA, K. et al. Fluconazole and itraconazole susceptibility of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* at a tertiary care centre in India: a need for care. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 52, n. 4, p. 683-686, 2003.

DATTA, K. et al. Spread of *Cryptococcus gattii* into Pacific Northwest region of the United States. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 15, n. 8, p. 1185-91, 2009.

DAVEY, K. G. In vivo susceptibility of *Cryptococcus neoformans* isolates to fluconazole and itraconazole. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 42, p. 217-270, 1998.

DELGADO, A.C. et al. Human cryptococcosis: relationship of environmental and clinical strains of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* from urban and rural areas. **Mycopathologia**, Jan: v. 159, n. 1, p 7-11, 2005.

DIAS, A. L. et al. Comparative analysis of Etest and broth microdilution method (AFST-EUCAST) for trends in antifungal drug susceptibility testing of Brazilian *Cryptococcus neoformans* isolates. **J. Med. Microbiol.**, v. 55, p. 1693-1699, 2006.

DIASIO, R.; BENNETT, J.; MYERS, C. Mode of action of 5-fluorocytosine. **Biochem. Pharmacol.**, v. 27, p. 703-707, 1978.

DIAZ, M. R. et al. Comparative analysis of the intergenic spacer regions and population structure of the species complex of the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. **FEMS Yeast Res.**, v. 5, n.12, p. 1129-1140, 2004.

DORNELAS, R. M. Análise comparativa por diferentes metodologias do perfil de susceptibilidade aos antifúngicos de leveduras isoladas de espécimes clínicos. Rio de Janeiro, Dissertação [Mestrado em Microbiologia] – **Instituto de Microbiologia Programa Pós-Graduação IMPPG / UFRJ**, 2006.

ESCANDÓN, P. et al. 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.**, v. 6, p. 625-635, 2006.

ELLIS, D. H.; PFEIFFER, T. J. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 28, p. 1642-1644, 1990.

ESPINEL-INGROFF, A. et al. *Cryptococcus neoformans* - *Cryptococcus gattii* species complex: an international study of wild-type susceptibility endpoint distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B and flucytosine. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 56, n. 6, p. 3107-3113, 2012.

ETEST Technical Guide 4b, Antifungal susceptibility testing of yeasts. **AB BIODISK**, June 1994, Solna, Sweden.

EVANS, E. E. The antigenic composition of *Cryptococcus neoformans*. I-A serologic classification by means of the capsular and agglutination reactions. **J. Immunol.**, v. 64, p. 423-430, 1950.

EVANS, E. E.; KESSEL, J. F. The antigenic composition of *Cryptococcus neoformans*. **J. Immunol.**, v. 67, p. 109-114, 1951.

FAVALESSA, O. C. et al. Primeira descrição da caracterização fenotípica e susceptibilidade *in vitro* a drogas de leveduras do gênero *Cryptococcus* spp isoladas de pacientes HIV-positivos e negativo, no estado de Mato Grosso. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 42, n. 6, p. 661-665, 2009.

FELDMESSER, M. et al. The effect of the echinocandin analogue caspofungin on cell wall glucan synthesis by *Cryptococcus neoformans*. **J. Infect. Dis.**, v. 182, p. 1791-1795, 2000.

FELL, J. W.; KURTZMAN C. P.; KWON-CHUNG, K. J. Proposal to conserve *Cryptococcus*. **Taxon**, v. 38, p. 151-152, 1989.

FERNANDES, O. F. L. et al. *In vitro* susceptibility characteristics of *Cryptococcus neoformans* varieties from AIDS patients in Goiânia, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 6, p. 839-841, 2003.

FONSECA, A. et al. **The Yeast. A Taxonomic Study**. 5. ed. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, p. 1665-1740, 2010.

FORTES, S. T. et al. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from a native jungle tree in the Brazilian Amazon rainforest. **Mycoses**, v. 44, p. 137-140, 2001.

FRANZOT, S. P.; HAMDAN, J. S. *In vitro* susceptibilities of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* to five antifungal drugs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 3, p. 822-824, 1996.

FRANZOT, S. P. et al. Microevolution of a standard strain of *Cryptococcus neoformans* resulting in differences in virulence and other phenotypes. **Infect. Immun.**, v. 66, n. 1, p. 89-97, 1998.

FREIRE, A. K. et al. Molecular characterisation of the causative agents of Cryptococcosis in patients of a tertiary healthcare facility in the state of Amazonas-Brazil. **Mycoses**, v. 55, n.3, p. 145-150, 2012.

FRIES, B. C.; COX, G. M. Cryptococcosis in AIDS. In: HEITMAN, J.; KOZEL, T. R.; KWON-CHUNG, K. J.; PERFECT, J. R. **Cryptococcus: From Human Pathogen to Model Yeast**. Washington, DC: American Society for Microbiology Press, 2011, p. 515-526.

FROMTLING, R. A.; SHADOMY, H. J.; JACOBSON, E. S. Decreased virulence in stable acapsular mutants of *Cryptococcus neoformans*. **Mycopathologia**, v. 79, p. 23-29, 1982.

GATES, M. A.; THORKILDSON, P.; KOZEL, T. R. Molecular architecture of the *Cryptococcus neoformans* capsule. **Mol. Microbiol.**, v. 52, p. 13-24, 2004.

GHANNOUM, M. et al. Sterol composition of *Cryptococcus neoformans* in the presence and absence of fluconazole. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 38, p. 2029-2033, 1994.

GHANNOUM, M. A.; RICE, L. B. Antifungal Agents: Mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Rev. Clin. Microbiol.**, v. 12, p. 501-17, 1999.

GHANNOUM, M. A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. **Clin. Microbiol.**, v.13, n.1, p.122-143, 2000.

GOLDMAN, D. L. et al. Serologic evidence for *Cryptococcus neoformans* infection in early childhood. **Pediatrics**, v. 107, p. 1-6, 2001.

GOMEZ-LOPEZ, A. et al. *In vitro* susceptibility of *Cryptococcus gattii* clinical isolates. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 14, n.7, p. 727-730, 2008.

- GOVENDER, N. P. et al. Trends in antifungal drug susceptibility of *Cryptococcus neoformans* isolates obtained through population-based surveillance in South Africa in 2002-2003 and 2007-2008. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 55, n. 6, p. 2606-2611, 2011.
- HAGEN, F. et al. *In vitro* antifungal susceptibilities and amplified fragment length polymorphism genotyping of a worldwide collection of 350 clinical, veterinary, and environmental *Cryptococcus gattii* isolates. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 54, n. 12, p. 5139-5145, 2010.
- HITCHCOCK, C. et al. Interaction of azole antifungal antibiotics with cytochrome P450-dependent 14 α -sterol demethylase purified from *Candida albicans*. **J. Biochem.**, v. 266, p. 475–480, 1990.
- HOLZ, R. W. The effects of the polyene antibiotics nystatin and amphotericin B on thin lipid membranes. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 235, p. 469–79, 1974.
- HSUEH, P. R. et al. Antifungal susceptibilities of clinical isolates of *Candida* species, *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus* species from Taiwan: surveillance of multicenter antimicrobial resistance in Taiwan program data from 2003. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 49, n. 2, p. 512-517, 2005.
- INCQS. INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE (BRASIL). A instituição e suas atividades. Rio de Janeiro: **FIOCRUZ/INCQS**, p. 55, 1988.
- INFORMAÇÃO de produtos de sensibilidade. In: VITEK 2 technology: manual do utilizador do software. Durham: Biomérieux, 2008. Cap. 7
- IKEDA, R. et al. Antigenic characterization of *Cryptococcus neoformans* serotypes and its application to serotyping of clinical isolates. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 22-29, 1982.
- IKEDA, R. et al. Chemical characterization of capsular polysaccharide from *Cryptococcus neoformans* serotype A-D. **Microbiol. Immunol.**, v. 29, n.10, p. 981-991, 1985.
- IQBAL, N. et al. Correlation of genotype and in vitro susceptibilities of *Cryptococcus gattii* strains from the Pacific Northwest of the United States. **J. Clin. Microbiol.**, v. 48, n. 2, p. 539-544, 2010.
- JACOBSON, E. S.; TINNELL, S. B. Antioxidant function of fungal melanin. **J. Bacteriol.**, v.175, p. 443-450, 1993.
- JANBON, G.; DOERING, T. L. Biosynthesis and genetics of the *Cryptococcus* of the polysaccharide. In. HEITMAN, J.; KOZEL, T. R.; KWON-CHUNG, K. J.; PERFECT, J. R. **Cryptococcus: From Human Pathogen to Model Yeast**. 1^a edição. Ed. American Society for Microbiology Press, Washington, DC., 2011, p. 153-165.
- JARVIS, J. N.; HARRISON, T. S. HIV-associated cryptococcal meningitis. **AIDS**, v. 21, n. 16 p. 2119-2129, out. 2007.

JENKINSON, H. F. Ins and outs of antimicrobial resistance: era of the drug pumps. **J. Dent. Res.**, v. 75, p. 736–742, 1996.

JOSEPH-HORNE, T. et al. Crossresistance to polyene and azole drugs in *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 39, p.1526–1529, 1995.

JULIANO, R. et al. Mechanism of the selective toxicity of amphotericin B incorporated into liposomes. **Mol Pharmacol.**, v. 31, p. 1–11, 1987.

KELLY, S. L. et al. Resistance to amphotericin B associated with defective sterol delta 8–7 isomerase in a *Cryptococcus neoformans* strain from an AIDS patient. **FEMS. Microbiol. Lett.** v. 122, p. 39–42, 1994.

KIDD, S. E. et al. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 101, n.49, p. 17258-17263, 2004.

KOBAYASHI, C. C. et al. Characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated from urban environmental sources in Goiânia, Goiás State, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 47, n. 4, p. 203-207, 2005.

KOLACZKOWSKI, M.; GOFFEAU, A. Active efflux by multidrug transporters as one of the strategies to evade chemotherapy and novel practical implications of yeast pleiotropic drug resistance. **Pharmacol. Ther.**, v. 76, p. 219-242, 1997.

KONTOYIANNIS, D. P.; LEWIS, R. E. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. **The Lancet**, v. 359, p. 1135–1144, 2002.

KOZEL, T. R. Virulence factors of *Cryptococcus neoformans* – Review. **Trends in Microbiology**, v. 3, p. 295- 298, 1995.

KRUIJFF, B.; DEMEL, R. A. Polyene antibiotic-sterol interactions in membranes of *Acholeplasma laidlawii* cells and lecithin liposomes. III. Molecular structure of the polyene antibiotic-cholesterol complexes. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 339, p. 57–70, 1974.

KWON-CHUNG, K. J. Morphogenesis of *Filobasidella neoformans*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans*. **Mycologia**, v. 68, p. 821-883, 1976.

KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E.; THEODORE, T. S. C. *Cryptococcus bacillisporus* sp. nov.: Serotype B-C of *Cryptococcus neoformans*. **International Journal of Systematic and Bacteriology**, v. 28, p. 616-620, 1978.

KWON-CHUNG, K. J.; POLACHEK, I.; BENNETT, J. E. Improved diagnostic medium for separation, of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C). **J. Clin. Microbiol.**, v. 15, p. 535-537, 1982.

KWON-CHUNG, K. J.; EDMAN, J. C.; WICKES, B. L. Genetic association of mating types and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Infect. Immun.**, v. 60, n 2, p. 602-605, 1992.

KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. Cryptococcosis. **Medical Mycology**. Ed. Philadelphia, Lea & Febiger, p. 392-446, 1992.

KWON-CHUNG, K. J. et al. Molecular biology of *Cryptococcus neoformans* and Therapy of cryptococcosis. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 32, p. 407-415, 1994.

KWON-CHUNG, K. J. *Filobasidiella* Kwon-Chung, In. KURTZMAN C. P.; FELL, J. W. **The Yeast. A Taxonomic Study**. 4^a edição. Ed. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, 1998, p. 656-662.

KWON-CHUNG., K. J. et al. Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae). **Taxon**, v. 51, p. 804-806, 2002.

KWON-CHUNG, K. J.; VARMA, A. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? **FEMS Yeast Res.**, v. 6, n. 4, p. 574-587, 2006.

LANYI, J.; PLACHY, W. Z.; KATES, M. Lipid interactions in membranes of extremely halophilic bacteria. II. Modification of the bilayer structure by squalene. **Biochemistry**, v. 13, p. 4914-4920, 1974.

LARSEN, R. A. et al. Fluconazole combined with flucytosine for treatment of cryptococcal meningitis in patients with AIDS. **Clin. Infect. Dis.**, v. 19, n. 4, p. 741-745, out. 1994.

LATOUCHE, G. N.; SORRELL, T. C.; MEYER, W. Isolation and characterisation of the phospholipase B gene of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. **FEMS Yeast Res.**, v. 2, n. 4, p. 551-561, 2002.

LAZERA, M. S.; WANKE, B.; NISHIKAWA, M. M. Isolation of both varieties of *Cryptococcus neoformans* from saprophytic sources in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 31, p. 449-454, 1993.

LAZERA, M. S. et al. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in decaying wood forming hollows in living trees. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 34, p. 127-131, 1996.

LAZERA, M. S. et al. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in a pottery tree hollow - evidence for a natural habitat related to decaying wood. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 6, p. 119-122, 1998.

LAZERA, M. S. et al. Possible primary niche of *Cryptococcus neoformans*. **Med. Micol.**, v. 38, p. 379-383, 2000.

LAZERA, M. S. et al. Criptococose. **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. 1^a edição. Ed. Coura, José Rodrigues, Rio de Janeiro; v. 2, p. 1223-1235, 2005.

LEENDERS, A. C. et al. Liposomal amphotericin B (AmBisome) compared with amphotericin B both followed by oral fluconazole in the treatment of AIDS-associated cryptococcal meningitis. **A.I.D.S.**, v. 11, n. 12, p. 1463-1471, out. 1997.

LI, W. et al. Genetic diversity and genomic plasticity of *Cryptococcus neoformans* AD hybrid strains. **G3.**, v. 2, p. 83-97, 2012.

LITVINTSEVA, A. P.; XU, J.; MITCHELL, T. Population structure and ecology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. In: HEITMAN, J. et al. **Cryptococcus: From Human Pathogen to Model Yeast**. 1ª edição. Ed. American Society for Microbiology Press, Washington, DC., 2011, p. 97-111.

LOZANO-CHIU, M. et al. 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.**, v. 36, n. 10, p. 2817-2822, 1998.

MARTINS, L. M. S. Epidemiologia da criptococose em crianças e adultos jovens e diversidade de *Cryptococcus neoformans* no Meio Norte do Brasil. Rio de Janeiro Dissertação [Mestrado em Biologia Parasitária] - **Instituto Oswaldo Cruz FIOCRUZ**; 2003.

MARTINS, L. M. et al. Genotypes of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Teresina, Piauí (northeastern Brazil). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 106, n. 6, p. 725-30. 2011.

MATOS, C. S. et al. Microbiological characteristics of clinical isolates of *Cryptococcus* spp. in Bahia, Brazil: molecular types and antifungal susceptibilities. **J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 31, n. 7, p. 1647-1652, 2012.

MAXWELL, M. J. et al. Evaluation of Etest method for determining fluconazole and voriconazole MICs for 279 clinical isolates of *Candida* species infrequently isolated from blood. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n. 3, p. 1087-1090, 2003.

MCQUISTON, T.; DEL PETA, M. The Interaction of *Cryptococcus neoformans* with Host Macrophages and Neutrophils. In: HEITMAN, J.; KOZEL, T. R.; KWON-CHUNG, K. J.; PERFECT, J. R. **Cryptococcus: From Human Pathogen to Model Yeast**. 1ª edição. Ed. American Society for Microbiology Press, Washington, DC., 2011, p. 373-385.

MDODO, R. et al. Antifungal susceptibilities of *Cryptococcus neoformans* cerebrospinal fluid isolates from AIDS patients in Kenya. *Mycoses*, v. 54, p. 438-442, 2011.

MENDES, F. E. et al. Correlation of the *in vitro* antifungal drug susceptibility with the *in vivo* activity of fluconazole in a murine model of cerebral infection caused by *Cryptococcus gattii*. **J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 29, n. 12, p. 1525-1529, 2010.

MEYER, W. et al. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 9, n. 2, p. 189-195, 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico AIDS. **B.E.A.**, 17, v.1, p. 56, 2003.

MONDON, P. et al. Heteroresistance to fluconazole and voriconazole in *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 43, n. 8, p. 1856–1861, 1999.

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

MORACE, G.; POLONELLI, L.; GISIA GROUP. Voriconazole activity against clinical yeast isolates: a multicentre Italian study. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 26, n. 3, p. 247-253, 2005.

MORAES, E. M.; PRÍMOLA, N. S.; HAMDAN, J. S. Antifungal susceptibility of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* to four antifungal drugs determined by two techniques. **Mycoses**, v. 46, p. 164-168, 2003.

MOREIRA, T. A. et al.. Cryptococcosis: clinical epidemiological laboratorial study and fungi varieties in 96 patients. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n.3, p. 255-258, 2006.

MORERA-LÓPEZ, Y. et al. DNA fingerprinting pattern and susceptibility to antifungal drugs in *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* isolates from Barcelona city and rural environmental samples. **Mycopathologia**, v. 160, n. 1, p. 9-14, 2005.

MORETTI, M. L. et al. Consenso em criptococose – 2008. **Ver. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 41, n. 5, p. 524-544, 2008.

MUELLER, U. G.; WOLFENBARGER, L. L. AFLP genotyping and fingerprinting. **Trends Ecol. Evol.**, v. 14, n. 10, p. 389-394, 1999.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Reference Method for broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Approved Standard. **M-27P**. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa. 1992.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Reference Method for broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Approved Standard. **M-27A**. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa. 1997.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Reference Method for broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Approved Standard. **M-27A2**. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa. 2002.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Reference Method for Disk diffusion Susceptibility Testing of Yeasts. Proposed Guideline. **M-44P**. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa. 2003.

NGUYEN, M. H. et al. Combination therapy with fluconazole and flucytosine in the murine model of cryptococcal meningitis. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 41, n. 5, p. 1120-1123, 1997.

NIELSEN, K.; KWON-CHUNG, K. J. A Role for Mating in Cryptococcal Virulence. In: HEITMAN, J.; KOZEL, T. R.; KWON-CHUNG, K. J.; PERFECT, J. R. **Cryptococcus: From Human Pathogen to Model Yeast**. 1^a edição. Ed. American Society for Microbiology Press, Washington, DC., 2011, p. 167-174.

NISHIKAWA, M. M. et al. Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Brazil: analysis of host and regional patterns. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n. 1, p. 73-77, 2003.

OCHIUZZI, M. E.; SANTISO, G. M.; ARECHAVALA, A. I. Correlation of Etest and Neo-Sensitabs diffusion assays on Mueller-Hinton-methylene blue agar with broth microdilution reference method (CLSI-M27-A2) for testing susceptibilities of *Cryptococcus neoformans* to amphotericin B and fluconazole. **Med. Mycol.**, v. 48, n. 6, p. 893-896, 2010.

PAPPALARDO, M. C. S. M.; MELHEM, M. S. C. Cryptococcosis: a review of the Brazilian experience for the disease. **Rer. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 45, p. 299-305, 2003.

PASSONI, L. F. C. et al. *Cryptococcus neoformans* isolated from human dwellings in Rio de Janeiro, Brazil: an analysis of the domestic environment of AIDS patients with and without Cryptococcosis. **Med. Mycol.**, v. 36, p. 305-311, 1998.

PEDROSO, R. S.; FERREIRA, J. C.; CANDIDO, R. C. *In vitro* susceptibility to antifungal agents of environmental *Cryptococcus* spp. isolated in the city of Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 101, n.3, p. 239-243, 2006.

PERKINS, A. et al. Rates of antifungal resistance among Spanish clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 56, n. 6, p. 1144-1147, 2005.

PERFECT, J. R. et al. *Cryptococcus neoformans*: virulence and host defenses. **Med. Mycol.**, v. 36, n. 1, p. 79-86, 1998.

PERFECT, J. R.; COX, G. M. Drug resistance in *Cryptococcus neoformans*. **Drug Resistance Updates**, v. 2, p. 259-269, 1999.

PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans*: the yeast that likes it hot. **FEMS Yeast Res.**, v. 6, n. 4, p. 463-468, 2006.

PFALLER, M. A. Epidemiology of fungal infections: the promise of molecular typing. **Clin. Infect. Dis.**, v. 20, p. 1535-1539, 1995.

PFALLER, M. A. et al. Global Trends in the Antifungal Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* (1990 to 2004). **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, p. 2163-67, 2005a.

PFALLER, M. A. et al. *In vitro* susceptibilities of clinical isolates of *Candida* species, *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus* species to itraconazole: Global survey of 9,359 isolates tested by clinical and laboratory standards institute broth microdilution methods. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, n. 8, p. 3807-3810, 2005b.

PFALLER, M. A. et al. Multicenter comparison of the VITEK 2 antifungal susceptibility test with the CLSI broth microdilution reference method for testing amphotericin B, flucytosine, and voriconazole against *Candida* spp. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, p. 3522–3528, 2007.

PFALLER, M. A. et al.. Echinocandin and triazole antifungal susceptibility profiles for *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus fumigatus*: application of new CLSI clinical breakpoints and epidemiologic cutoff values to characterize resistance in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2009). **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 69, n. 1, p. 45-50, 2011.

POLAK, A.; SCHÖLER, H. Mode of action of 5-fluorocytosine and mechanisms of resistance. **Chemotherapy**, v. 21, p. 113–130, 1975.

POLACHECK, I. The discovery of melanin production in *Cryptococcus neoformans* and its impact on diagnosis and the study of virulence. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 276, p. 120-123, 1991.

POLACHECK, I.; LEBENS, G.; HICKS, J. B. Development of DNA probes for early diagnosis and epidemiological study of *Cryptococcus* in AIDS patients. **J. Clin. Microbiol.**, v. 30, p. 312-316, 1992.

POSTERARO, B. et al. Identification and characterization of a *Cryptococcus neoformans* ATP binding cassette (ABC) transporter encoding gene, *CnAFR1*, involved in the resistance to fluconazole. **Mol. Microbiol.**, v. 47, p. 357–371.

POSTERARO, B. et al. Reliability of the Vitek 2 yeast susceptibility test for detection of *in vitro* resistance to fluconazole and voriconazole in clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 47, p. 1927–1930, 2009.

RIVERA, J.; Organ-dependent variation of capsule thickness in *Cryptococcus neoformans* during experimental murine infection. **Infect. Immun.**, v. 66, n. 10, p. 5027-5030, 1998.

RODERO, L. et al. G484S Amino Acid Substitution in Lanosterol 14- α Demethylase (ERG11) Is Related to Fluconazole Resistance in a Recurrent *Cryptococcus neoformans* Clinical Isolate. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 47, p. 3653– 3656, 2003.

ROZENBAUM, R.; GONÇALVES, A. J. R. Clinical epidemiological study of 171 cases of cryptococcosis. **Clin. Infect. Dis.**, V. 18, p. 369-380, 1994.

RUDENSKY, B. et al. Rapid flow-cytometric susceptibility testing of *Candida* species. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 55, n. 1, p. 106–107, 2005.

RYDER, N.; FAVRE, B. Antifungal activity and mechanism of action of terbinafine. **Rev. Contemp. Pharmacother**, v. 8, p. 275–87, 1997.

SALAS, S. D. et al. Effect of the laccase gene CNLAC1, on virulence of *Cryptococcus neoformans*. **J. Exp. Med.**, v. 184, n. 2, p. 377-386, 1996.

SANGLARD, D.; ODDS, F. C. Clinical relevance of mechanisms of antifungal drug resistance in yeast. **Enferm. Infect. Microbiol. Clin.**, v. 20, n. 9, p. 462-470, 2002.

SANGUINETTI, M. et al. Response to fluconazole and virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Infect. Immun.**, v. 74, p. 1352–1359, 2006.

SANTANGELO, R. et al. Role of extracellular phospholipases and mononuclear phagocytes in dissemination of cryptococcosis in a murine model. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 2229-2239, 2004.

SANTOS, L. O. Criptococose no estado do Amazonas: estudo de 75 casos diagnosticados na Fundação de Medicina Tropical/FMT/IMTM (1988-1998). Rio de Janeiro. Dissertação [Mestrado] - **Instituto Oswaldo Cruz FIOCRUZ**, 2000.

SANTOS, W. R. et al. Primary endemic Cryptococcosis *gattii* by molecular type VGII in the state of Pará, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 8, p. 813-818, 2008.

SILVA, D. C. et al. Susceptibility to antifungal agents and genotypes of Brazilian clinical and environmental *Cryptococcus gattii* strains. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 74, n. 4, p. 332-339, 2012.

SILVA, P. R. et al. Suscetibilidade a antifúngicos de variedades de *Cryptococcus neoformans* isoladas de pacientes em hospital universitário. **Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 41, n. 2, p. 158-162, 2008.

SIONOV, E. et al. Heteroresistance to fluconazole in *Cryptococcus neoformans* is intrinsic and associated with virulence. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 53, n. 7, p. 2804–2815, 2009.

SIONOV, E. et al. *Cryptococcus neoformans* Overcomes Stress of Azole Drugs by Formation of Disomy in Specific Multiple Chromosomes Filler SG, org. **PLoS. Pathogens**, v. 6, n. 4, 2010.

SOARES, M. C. et al. Environmental strains of *Cryptococcus neoformans* variety grubii in the city of Santos, SP, Brazil. **Rer. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 47, n. 1 p. 31-36, 2005.

SOUZA, L. K. H. et al. Antifungal susceptibilities of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* in Goiania city, Goias, Brazil. **Rer. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 47, n. 5, p. 253-256, 2005.

SOUZA, L. K. H. et al. Molecular typing and antifungal susceptibility of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* species complex isolates in Goiania, Brazil. **Mycoses**, v. 53, n. 1, p. 62-67, 2009.

STAIB, F. New concepts in the occurrence and identification of *Cryptococcus neoformans*. **Mycopathol Mycol. Appl.**, v. 19, p. 143-145, 1963.

SWINNE-DESGAIN, D. *Cryptococcus neoformans* in the crops of pigeons following its experimental administration. **Sabouraudia**, v. 14, n. 3, p. 313-317, 1976.

TEWARI, A. et al. Comparative analysis of the Vitek 2 antifungal susceptibility system and E-test with the CLSI M27-A3 broth microdilution method for susceptibility testing of Indian clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. **Mycopathologia**, v. 173, p. 427-433, 2012.

THORNWELL, S. J.; PEERY, R. B.; SKATRUD, P. C. Cloning and characterization of *CneMDR1*: a *Cryptococcus neoformans* gene encoding a protein related to multidrug resistance proteins. **Gene**, v. 201, p. 21–29, 1997.

THOMPSON, J. R. et al. A glucan synthase FKS1 homolog in *cryptococcus* is a single copy and encodes an essential function. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 444–453, 1999.

TORRES-RODRÍGUEZ, J. M. et al. MICs and minimum fungicidal concentrations of posaconazole, voriconazole and fluconazole for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 62, n. 1, p. 205-206, 2008.

TRILLES, L. et al. Genetic characterization of environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex from Brazil. **Med. Mycol.**, v. 41, n. 5, p. 383-390, 2003.

TRILLES, L. et al. *In vitro* antifungal susceptibility of *Cryptococcus gattii*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 10, p. 4815-4817, 2004.

TRILLES, L. et al. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 103, n. 5, p. 455-462, 2008.

TRILLES, L. et al. Correlation of antifungal susceptibility and molecular type within the *Cryptococcus neoformans/C. gattii* species complex. **Med. Mycol.**, v. 50, n. 3, p. 328-332, 2012.

TROFA, D. et al. Melanina: Structure, Function and Biosynthesis in *Cryptococcus*. In. HEITMAN, J.; KOZEL, T. R.; KWON-CHUNG, K. J.; PERFECT, J. R. ***Cryptococcus: From Human Pathogen to Model Yeast***. 1ª edição. Ed. American Society for Microbiology Press, Washington, DC., 2011, p. 55-66.

VALE-SILVA, L. A.; BUCHT, A. V. Antifungal susceptibility testing by flow cytometry: is it the future? **Mycoses**, v. 49, n. 4, p. 261-273, jul. 2006.

VANDEN BOSSCHE, H. et al. Effects of itraconazole on cytochrome P-450-dependent 14 α -demethylation and reduction of 3-ketosteroids in *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 37, p. 2101–2105, 1993.

VANDEN BOSSCHE, H. Mechanisms of antifungal resistance. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 12, n. 2, p. 44-49, 1997.

VANDEN BOSSCHE, H. et al. Antifungal drug resistance in pathogenic fungi. **Med. Mycol.**, v. 36, p. 119-1128, 1998.

VARMA, A.; KWON-CHUNG, K. J. heteroresistance of *Cryptococcus gattii* to fluconazole. **antimicrob. agents chemother.**, v. 54, n. 6, p. 2303–2311, 2010.

VENKATESWARLU, K. et al. Fluconazole tolerance in clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 41, p. 748–775, 1997.

VIDOTTO, V. et al. Extracellular enzymatic activity and serotype of *Cryptococcus neoformans* strains isolated from AIDS patients in Brazil. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 22, n. 1, p. 29-33, 2005.

VOS, P. et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Res.**, v. 23, n. 21, p. 4407-14, 1995.

WANG, Y.; CASADEVALL, A. Decreased susceptibility of melanized *Cryptococcus neoformans* to UV light. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 60, p. 3864-3866, 1994.

WANG, Y.; AISEN, P.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: mechanism of action. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 3131-3136, 1995.

WARNOCK, D. W.; JOHNSON, E. M.; ROGERS, T. R. Multi-centre evaluation of the Etest method for antifungal drug susceptibility testing of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans*. BSAC Working Party on Antifungal Chemotherapy. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 42, n. 3, p. 321–331, 1998.

WHELAN, W. L. The genetic basis of resistance to 5-fluorocytosine in *Candida* species and *Cryptococcus neoformans*. **Crit. Rev. Microbiol.**, v. 15, p. 45-56, 1987.

WICKES, B. L. et al. Dimorphism and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*: association with the alpha-mating type. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 93, n. 14, p. 7327-7331, 1996.

WILLIAMSON, P. R. Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans*: identification as a laccase. **J. Bacteriol.**, v. 176, p. 656-664, 1994.

WILSON, D. E.; BENNETT, J. E.; BAILEY, J. W. Serologic grouping of *Cryptococcus neoformans*. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 127, p. 820-823, 1968.

YAMAZUMI, T. et al. Characterization of heteroresistance to fluconazole among clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n. 1, p. 267–272, 2003.

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

ZARAGOZA, O. et al. Process analysis of variables for standardization of antifungal susceptibility testing of nonfermentative yeasts. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 55, n. 4, p. 1563-1570, 2011.

Apêndice 1

Cepas de <i>Cryptococcus neoformans</i> de origem clínica, oriundas da região Norte do Brasil, utilizadas no TSA													
INCQS	LMM	ORDEM /IPEC	Material Biológico	Sexo	Idade	Patologia Associada	CGB	Sorotipo	UF	Origem	Método de Preservação	Data do congelamento ou liofilização	Ativação de crescimento
70383-A	1420-A	05/05/03-01A	LCR	M	45	HIV pos	N	NT	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70383-B	1420-B	05/05/03-01B	LCR	M	45	HIV pos	N	NT	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70384-A	1421-A	05/06/03-02A	LCR	M	20	HIV pos	N	NT	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70384-B	1421-B	05/06/03-02B	LCR	M	20	HIV pos	N	NT	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70386	1423	25/06/03-04	LCR	M	43	HIV pos	N	A	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70386-A	1423-A	25/06/03-04A	LCR	M	43	HIV pos	N	–	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70387-A	1424-A	07/07/03-05A	LCR	F	19	HIV neg	N	A	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70387-B	1424-B	07/07/03-05B	LCR	F	19	HIV neg	N	–	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70389-B	1426-B	25/09/03-07B	LCR	F	60	HIV neg	N	–	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70390-A	1427-A	17/10/03-08A	LCR	M	31	HIV pos	N	A	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70390-B	1427-B	17/10/03-08B	LCR	M	31	HIV pos	N	–	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70396-A	1433-A	23/01/04-29A	LCR	M	27	HIV pos	N	A	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70396-B	1433-B	23/01/04-29B	LCR	M	27	HIV pos	N	–	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70397-A	1434-A	10/02/04-30A	LCR	M	65	HIV neg	N	NT	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08

70397-B	1434-B	10/02/04-30B	LCR	M	65	HIV neg	N	NT	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70406-A	1443-A	11/05/05-39A	LCR	M	28	HIV pos	N	A	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70406-B	1443-B	11/05/05-39B	LCR	M	28	HIV pos	N	_	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70407-A	1444-A	16/03/04-40A	LCR	M	7	HIV neg	N	_	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70408-A	1445-A	10/07/04-42A	LCR	F	38	HIV neg	N	A	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70408-B	1445-B	10/07/04-42B	LCR	F	38	HIV neg	N	_	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70409-A	1446-A	17/08/04-43A	LCR	F	38	HIV neg	N	_	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70409-B	1446-B	17/08/04-43B	LCR	F	38	HIV neg	N	_	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70410-A	1447-A	17/09/04-44A	LCR	F	28	HIV neg	N	_	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70410-B	1447-B	17/09/04-44B	LCR	F	28	HIV neg	N	_	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70411-A	1448-A	22/09/04-45A	LCR	F	28	HIV neg	N	A	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70411-B	1448-B	22/09/04-45B	LCR	F	28	HIV neg	N	_	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70413	1450	06/10/04-47	LCR	F	35	HIV neg	N	A	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70413-A	1450-A	06/10/04-47A	LCR	F	35	HIV neg	N	_	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70413-B	1450-B	06/10/04-47B	LCR	F	35	HIV neg	N	_	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70415	1452	21/10/04-49	LCR	M	58	HIV pos	N	A	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70415-A	1452-A	21/10/04-49A	LCR	M	58	HIV pos	N	_	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70415-B	1452-B	21/10/04-49B	LCR	M	58	HIV pos	N	_	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08

70418-A	1455-A	13/01/05-52A	LCR	M	29	HIV pos	N	A	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70418-B	1455-B	13/01/05-52B	LCR	M	29	HIV pos	N	–	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70420	1457	07/03/05-54	LCR	M	33	HIV pos	N	A	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70420-A	1457-A	07/03/05-54A	LCR	M	33	HIV pos	N	–	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70420-B	1457-B	07/03/05-54B	LCR	M	33	HIV pos	N	–	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70421-B	1458-B	11/03/05-55B	LCR	M	32	HIV neg	N	–	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70422-B1	1459-B1	28/03/05-56B1	LCR	M	14	HIV neg	N	–	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70424-B	1461-B	04/05/05-58B	LCR	M	37	HIV neg	N	–	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70425	1462	25/05/05-59	LCR	M	27	HIV neg	N	A	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70425-B	1462-B	25/05/05-59B	LCR	M	27	HIV neg	N	–	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70425-B1	1462-B1	25/05/05-59B1	LCR	M	27	HIV neg	N	–	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70425-B3	1462-B3	25/05/05-59B3	LCR	M	27	HIV neg	N	–	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70427-A	1464-A	12/09/05-61A	LCR	M	48	HIV Pos	N	A	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70428-A	1465-A	19/09/05-62A	LCR	M	58	HIV Pos	N	A	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70428-B	1465-B	19/09/05-62B	LCR	M	58	HIV Pos	N	–	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70429-A	1466-A	21/08/05-63A	LCR	F	7	HIV neg	N	–	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70430-A	1468-A	06/09/05-65A	LCR	M	34	HIV pos	D	A	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70430-B	1468-B	06/09/05-65B	LCR	M	34	HIV pos	D	–	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08

70431-B	1469-B	21/09/05-66B	LCR	F	30	HIV neg	N	A	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70432-A	1470-A	24/04/06-67A	LCR	M	29	HIV pos	N	A	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70432-B	1470-B	24/04/06-67B	LCR	M	29	HIV pos	N	_	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70433-A	1471-A	22/07/05-68A	LCR	F	32	HIV pos	N	NT	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70433-B	1471-B	22/07/05-68B	LCR	F	32	HIV pos	N	NT	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70434-A	1472-A	11/09/05-69A	LCR	M	34	HIV pos	N	A	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70434-B	1472-B	11/09/05-69B	LCR	M	34	HIV pos	N	_	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70435-A	1473-A	18/04/06-70A	LCR	M	28	HIV neg	N	A	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70435-B	1473-B	18/04/06-70B	LCR	M	28	HIV neg	N	_	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70436-A	1474-A	30/09/05-71A	LCR	M	58	HIV Pos	N	A	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70436-B	1474-B	30/09/05-71B	LCR	M	58	HIV Pos	N	_	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70437-A	1475-A	08/06/06-72A	LCR	M	6	HIV neg	N	NT	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70437-B	1475-B	08/06/06-72B	LCR	M	6	HIV neg	N	NT	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70438-A	1476-A	08/06/06-73A	LCR	M	31	HIV neg	N	A	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70438-B	1476-B	08/06/06-73B	LCR	M	31	HIV neg	N	_	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70439-A	1477-A	14/06/06-74A	LCR	M	19	HIV pos	N	A	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70439-B	1477-B	14/06/06-74B	LCR	M	19	HIV pos	N	_	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70440-A	1478-A	07/07/06-75A	LCR	F	24	HIV pos	N	A	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08

70441-A	1479-A	20/07/06-76A	LCR	M	44	HIV pos	N	A	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70441-B	1479-B	20/07/06-76B	LCR	M	44	HIV pos	N	_	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70443-B	1481-B	13/09/06-78B	LCR	F	29	HIV neg	N	_	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70444-A	1483-A	18/09/06-80A	LCR	M	36	HIV pos	N	_	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70444-B	1483-B	18/09/06-80B	LCR	M	36	HIV pos	N	_	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70447-B	1487-B	08/09/06-84B	LCR	F	42	HIV pos	N	_	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70448	1489	19/03/07-86	Sangue	F	42	HIV neg	N	_	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70449	1490	03/04/07-87	LCR	M	36	HIV neg	N	_	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70450	1491	09/04/07-88	LCR	M	17	HIV neg	N	_	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70451	1492	10/04/07-89	LCR	F	42	HIV neg	N	_	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70322	696	2507	LCR	M	34	HIV pos	N	A	AM	Clin.	liofilização	jun/02	ago/10
70323	697	2669	LCR	M	25	HIV pos	N	A	AM	Clin.	liofilização	jun/02	ago/10
70324	716	2681	LCR	M	25	HIV pos	N	A	AM	Clin.	liofilização	jun/02	ago/10
70327	721	2701	LCR	M	24	HIV pos	N	A	AM	Clin.	liofilização	jun/02	ago/10
70329	723	48	LCR	F	3	HIV neg	N	A	AM	Clin.	liofilização	jun/02	ago/10
70366	1029	52	_	F	3	HIV neg	N	A	AM	Clin.	liofilização	jun/02	ago/10
70367	1031	2923	_	F	20	HIV pos	N	_	AM	Clin.	liofilização	jun/02	ago/10
70368	1032	2819	_	F	_	_	N	_	AM	Clin.	liofilização	jun/02	ago/10
70369	1033	115	_	M	_	_	N	_	AM	Clin.	liofilização	jun/02	ago/10

70370	1034	2892	_	F	19	HIV neg	N	A	AM	Clin.	liofilização	jun/02	ago/10
70336A	807	-	LCR	M	_	HIV pos	N	_	RR	Clin.	cong. -70°C	dez/01	abr/11
70340	855	RR27-(03)	LCR	M	33	HIV neg	N	_	RR	Clin.	cong. -70°C	dez/01	abr/11
70344	860	219-RR	LCR	M	_	HIV neg	N	_	RR	Clin.	cong. -70°C	dez/01	abr/11
70345	861	228-RR	LCR	M	_	HIV neg	N	_	RR	Clin.	cong. -70°C	dez/01	mar/11
70347	863	381-RR	LCR	M	_	_	N	_	RR	Clin.	cong. -70°C	dez/01	mar/11
70336-2	864	-	LCR	M	_	HIV pos	N	A	RR	Clin.	cong. -70°C	dez/01	mar/11
70349	865	MSN-RR	LCR	M	_	HIV neg	N	_	RR	Clin.	cong. -70°C	dez/01	mar/11
70362-1	997-1	-	LCR	M	42	HIV pos	N	_	RR	Clin.	cong. -70°C	dez/01	mar/11
70362-2	997-2	-	LCR	M	42	HIV pos	N	_	RR	Clin.	cong. -70°C	dez/01	mar/11
70363-1	998-1	-	LCR	M	34	_	N	_	RR	Clin.	cong. -70°C	dez/01	mar/11
70363-2	998-2	-	LCR	M	34	_	N	_	RR	Clin.	cong. -70°C	dez/01	mar/11

M - masculino
 F - feminino
 N - negativo
 NT - não tipável
 Clin. - clínica
 cong. - congelado

Cepas de <i>Cryptococcus neoformans</i> de origem ambiental, oriundas da região Norte do Brasil, utilizadas no TSA													
INCQS	LMM	ORDEM /IPEC	Material Biológico	Sexo	Idade	Patologia Associada	CGB	Sorotipo	UF	Origem	Método de Preservação	Data do congelamento ou liofilização	Ativação de crescimento
70299	526	ZI 2•	Raspado Interno Oco	-	-	-	N	A	AM	Amb.	liofilização	jul/98	ago/10
70300	527	ZI 6•	Raspado Interno Oco	-	-	-	N	A	AM	Amb.	liofilização	jul/98	ago/10
70320-B	645	78MC1**	Raspado Interno Oco	-	-	-	N	B	RR	Amb.	cong. -70°C	dez/01	abr/11
70320-D	645	78MC2D**	Raspado Interno Oco	-	-	-	N	-	RR	Amb.	cong. -70°C	dez/01	abr/11
70320-E	645	78MC2D1**	Raspado Interno Oco	-	-	-	N	-	RR	Amb.	cong. -70°C	dez/01	abr/11
70320-F	645	78MC2D2**	Raspado Interno Oco	-	-	-	N	-	RR	Amb.	cong. -70°C	dez/01	abr/11
70341-1	857	MY1	Poeira Domiciliar	-	-	-	N	A	RR	Amb.	cong. -70°C	dez/01	abr/11
70341-2	857	MY2	Poeira Domiciliar	-	-	-	N	A	RR	Amb.	cong. -70°C	dez/01	abr/11
70341-6	857	MY 4	Poeira Domiciliar	-	-	-	N	A	RR	Amb.	cong. -70°C	dez/01	abr/11
70346	862	199BV**	Raspado Interno Oco	-	-	-	N	A	RR	Amb.	cong. -70°C	dez/01	mar/11

- - *Myroxyton peruiferum* ** - *Guettarda acreana*
 •• - *Syzygium jambolanum* Amb. - ambiental

Cepas de <i>Cryptococcus gattii</i> de origem clínica, oriundas da região Norte do Brasil, utilizadas no TSA													
INCQS	LMM	ORDEM /IPEC	Material Biológico	Sexo	Idade	Patologia Associada	CGB	Sorotipo	UF	Origem	Método de Preservação	Data do congelamento ou liofilização	Ativação de crescimento
70385-B	1422-B	06/06/03-03B	LCR	M	15	HIV neg	P	B	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70388	1425	15/09/03-06	LCR	F	15	HIV neg	P	B	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70389-A	1426-A	25/09/03-07A	LCR	F	60	HIV neg	P	B	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70391-A	1428-A	18/11/03-23A	LCR	F	33	HIV neg	P	B	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70392-A	1429-A	19/11/03-24A	Sangue	F	33	HIV neg	P	B	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70393-A	1430-A	21/11/03-25A	LCR	F	9	HIV neg	P	NT	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70393-B	1430-B	21/11/03-25B	LCR	F	9	HIV neg	P	NT	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70394-A	1431-A	03/12/03-26A	LCR	M	5	HIV neg	P	B	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70395-A	1432-A	16/12/03-27A	LCR	F	30	HIV neg	P	B	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70395-B	1432-B	16/12/03-27B	LCR	F	30	HIV neg	P	B	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70398-A	1435-A	12/02/04-31A	LCR	M	11	HIV neg	P	B	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70398-B	1435-B	12/02/04-31B	LCR	M	11	HIV neg	P	–	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70399-A	1436-A	04/12/03-32A	LCR	F	9	HIV neg	P	B	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70399-B	1436-B	04/12/03-32B	LCR	F	9	HIV neg	P	–	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70400-A	1437-A	05/04/04-33A	LCR	M	13	HIV neg	P	–	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08

70400-B	1437-B	05/04/04-33B	LCR	M	13	HIV neg	P	-	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70401-A	1438-A	16/04/04-34A	LCR	F	60	HIV neg	P	-	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70401-B	1438-B	16/04/04-34B	LCR	F	60	HIV neg	P	-	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70402-A	1439-A	03/06/04-35A	LCR	F	60	HIV neg	P	-	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70402-B	1439-B	03/06/04-35B	LCR	F	60	HIV neg	P	-	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70403-A	1440-A	14/10/03-36A	LCR	M	6	HIV neg	P	-	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70403-B	1440-B	14/10/03-36B	LCR	M	6	HIV neg	P	-	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70403-B1	1440-B1	14/10/03-36B1	LCR	M	6	HIV neg	P	-	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70403-B2	1440-B2	14/10/03-36B2	LCR	M	6	HIV neg	P	-	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70404-A	1441-A	08/04/03-37A	LCR	M	8	HIV neg	P	NT	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70404-B	1441-B	08/04/03-37B	LCR	M	8	HIV neg	P	NT	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70405-A	1442-A	01/04/03-38A	LCR	F	15	HIV neg	P	-	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70405-B	1442-B	01/04/03-38B	LCR	F	15	HIV neg	P	-	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70407-B	1444-B	16/03/04-40B	LCR	M	7	HIV neg	P	-	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70408	1445	10/07/04-42	LCR	F	38	HIV neg	P	-	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70412	1449	23/09/04-46	LCR	F	11	HIV neg	P	-	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70412-B	1449-B	23/09/04-46B	LCR	F	11	HIV neg	P	-	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70414-A	1451-A	09/10/04-48A	LCR	F	21	HIV neg	P	B	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08

70414-B	1451-B	09/10/04-48B	LCR	F	21	HIV neg	P	-	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70416	1453	09/02/05-50	LCR	M	42	HIV neg	P	B	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70416-B	1453-A	09/02/05-50A	LCR	M	42	HIV neg	P	-	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70417-A	1454-A	02/02/05-51A	LCR	M	20	HIV neg	P	B	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70417-B	1454-B	02/02/05-51B	LCR	M	20	HIV neg	P	-	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70419-A	1456-A	02/12/04-53A	LCR	F	36	HIV neg	P	-	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70419-B	1456-B	02/12/04-53B	LCR	F	36	HIV neg	P	-	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70421-A	1458-A	11/03/05-55A	LCR	M	32	HIV neg	P	B	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70422-A	1459-A	28/03/05-56A	LCR	M	14	HIV neg	P	B	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70422-B	1459-B	28/03/05-56B	LCR	M	14	HIV neg	P	-	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70422-B2	1459-B2	28/03/05-56B2	LCR	M	14	HIV neg	P	-	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70423-A	1460-A	03/04/05-57A	LCR	M	8	HIV neg	P	B	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70423-B	1460-B	03/04/05-57B	LCR	M	8	HIV neg	P	-	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70426-B	1463-B	15/06/05-60B	LCR	M	52	HIV pos	P	NT	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70442-A	1480-A	25/07/06-77A	LCR	F	38	HIV neg	P	B	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70445-A	1485-A	10/10/06-82A	LCR	M	15	HIV neg	P	-	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70445-B	1485-B	10/10/06-82B	LCR	M	15	HIV neg	P	-	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70446-A	1486-A	13/10/06-83A	LCR	F	24	HIV neg	P	-	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08

70446-B	1486-B	13/10/06-83B	LCR	F	24	HIV neg	P	_	PA	Clin.	cong. -70°C	mai/06	jun/08
70319	624	1910	LCR	F	11	HIV neg	P	B	AM	Clin.	liofilização	jun/02	ago/10
70325	717	2974	LCR	M	18	HIV neg	P	B	AM	Clin.	liofilização	jun/02	ago/10
70326	718	3005	LCR	M	6	HIV neg	P	B	AM	Clin.	liofilização	jun/02	ago/10
70328	722	2767	LCR	M	7	HIV neg	P	B	AM	Clin.	liofilização	jun/02	ago/10
70330	724	3111	LCR	M	20	HIV neg	P	B	AM	Clin.	liofilização	jun/02	ago/10
70371	1035	2700	_	F	38	HIV neg	P	B	AM	Clin.	liofilização	jun/02	ago/10
70453	-	2466	_	F	-	-	P	-	AM	Clin.	liofilização	jun/02	ago/10
70350	866	-	LCR	M	14	-	P	B	RR	Clin.	cong. -70°C	dez/01	mar/11
70361	964	-	LCR	F	30	-	P	B	RR	Clin.	cong. -70°C	dez/01	mar/11

M - masculino NT - não tipável
F - feminino P - positivo

Cepas de <i>Cryptococcus gattii</i> de origem ambiental, oriundas da região Norte do Brasil, utilizadas no TSA													
INCQS	LMM	ORDEM /IPEC	Material Biológico	Sexo	Idade	Patologia Associada	CGB	Sorotipo	UF	Origem	Método de Preservação	Data do congelamento ou liofilização	Ativação de crescimento
70452	525	ZI-1*	Raspado oco interno cacaeiro	-	-	-	P	-	AM	Amb.	liofilização	jul/98	ago/10
70320-A	645	78MC1**	Raspado interno oco	-	-	-	P	-	RR	Amb.	cong. -70°C	dez/01	abr/11
70320-C	645	78MC3**	Raspado interno oco	-	-	-	P	B	RR	Amb.	cong. -70°C	dez/01	abr/11
70342-1	858	14BV1•	Raspado Oco interno de tento	-	-	-	P	-	RR	Amb.	cong. -70°C	dez/01	abr/11
70342-3	858	14BV3 •	Raspado oco interno de tento	-	-	-	P	-	RR	Amb.	cong. -70°C	dez/01	abr/11
70343-7	859	40BV7 ••	Raspado oco interno de mulungu	-	-	-	P	B	RR	Amb.	cong. -70°C	dez/01	abr/11

* - *Theobroma cacao*

• - *Adenanthera pavonina*

P - positivo

** - *Guettarda acreana*

•• - *Erithrina velutina*

Amb. - ambiental

Apêndice 2

Cepas de <i>Cryptococcus neoformans</i> de origem clínica, oriundas de diferentes regiões do Brasil, utilizadas no AFLP														
INCQS	LMM	ORDEM /IPEC	Material Biológico	Sexo	Idade	Patologia Associada	CGB	Sorotipo	UF	Origem	Método de preservação	Data do congelamento ou liofilização	Ativação do crescimento	Genótipo
70454		CRN 43	–	–	–	–	N	A	PR	Clin.	liofilização	fev/97	jan/12	1
70375	1042		ulcera de cornea	M	–	–	N	A	PI	Clin.	cong. -70°C	jun/03	jan/12	1
70318	611	CRN 51	–	–	–	–	N	AD	PR	Clin.	liofilização	fev/97	jan/12	1
70306	502	–	LCR	M		HIV pos	N	A	PI	Clin.	liofilização	dez/96	jan/12	1
70317	577	–	LCR	M	31		N	A	PI	Clin.	cong. -70°C	jul/02	–	1
70304	416	–	LCR	M	28	HIV pos	N	A	PI	Clin.	liofilização	dez/96	jan/12	1
70455	40	9519	LCR	M		HIV pos	N	D	RJ	Clin.	liofilização	mar/94	jan/12	1
70046	236	4152	LCR	F	46		N	AD	PI	Clin.	liofilização	jun/91	jan/12	1
70113	162	5410	–	–	–	–	N	A	RJ	Clin.	liofilização	abr/91	jan/12	1
70381	1185	15315	–	M	–	HIV neg	N	A	RJ	Clin.	cong. -70°C	mar/04	–	1
70382	1186	15390	–	M	–	HIV neg	N	A	RJ	Clin.	cong. -70°C	mar/04	–	1
70378	1077	–	LCR	M	–	–	N	A	PI	Clin.	liofilização	nov/03	jan/12	1
70379	1079	–	LCR	M	–	–	N	A	PI	Clin.	liofilização	nov/03	jan/12	1

70376	1064	_	_	_	_	_	N	A	PI	Clin.	cong. -70°C	out/03	jan/12	1
70456	543	_	LCR	M	32	HIV pos	N	A	PI	Clin.	cong. -70°C	fev/03	jan/12	1
70314	570	_	LCR	M	28	HIV neg	N	A	PI	Clin.	cong. -70°C	mai/98	jan/12	1
70457	557	_	LCR	F	64	HIV pos	N	NT	PI	Clin.	cong. -70°C	jul/02	_	1
70317	568	_	_	M	_	HIV pos	N	A	PI	Clin.	cong. -70°C	jul/02	_	1
70224	249	4035	LCR	M	_	HIV pos	N	NT	RJ	Clin.	liofilização	jan/93	jan/12	1
70354	874	_	LCR	M	41	_	N	A	PI	Clin.	cong. -70°C	set/03	jan/12	1
70358	929	_	_	M	30	_	N	A	PI	Clin.	cong. -70°C	set/03	jan/12	1
70356	922	_	_	M	_	_	N	A	PI	Clin.	cong. -70°C	out/01	_	1
70351	870	_	LCR	M	61	_	N	A	PI	Clin.	cong. -70°C	dez/01	_	1
70364	1006	_	_	M	_	_	N	A	PI	Clin.	cong. -70°C	set/03	jan/12	1
70372	1037	_	LCR	M	_	_	N	A	PI	Clin.	liofilização	set/03	jan/12	1
70288	30	10892	LCR	M	32	_	N	A	PI	Clin.	liofilização	out/94	jan/12	1
70373	1038	_	LCR	M	_	_	N	A	PI	Clin.	cong. -70°C	out/03	jan/12	1
70337	811	_	LCR	M	41	HIV pos	N	A	PI	Clin.	cong. -70°C	mar/01	_	1
70458	528	_	LCR	F	_	_	N	A	PI	Clin.	liofilização	fev/98	jan/12	1
70338	810	_	_	M	_	_	N	A	PI	Clin.	cong. -70°C	mar/01	_	1

70353	873	_	_	M	36	_	N	A	PI	Clin.	cong. -70°C	dez/01	_	1
70370	1034	_	LCR	F	19	HIV neg	N	A	AM	Clin.	liofilização	jun/01	ago/10	1
70459	503	_	LCR	M	26	HIV pos	N	A	PI	Clin.	cong. -70°C	mar/96	jan/12	1
70460	558	_	LCR	F	48	HIV neg	N	A	PI	Clin.	cong. -70°C	mar/98	jan/12	1
70150	366	19	LCR	F	_	HIV neg	N	A	RJ	Clin.	liofilização	abr/88	jan/12	1
70369	1033	_	_	M	_	_	N	NT	AM	Clin.	liofilização	jun/01	ago/10	1
70322	696	_	LCR	M	34	HIV pos	N	A	AM	Clin.	liofilização	jun/01	ago/10	1
70153	355	1982	Hemocultura	M	_	HIV pos	N	AD	RJ	Clin.	liofilização	fev/92	jan/12	1
70171	327	2538	LCR	M	_	HIV pos	N	AD	RJ	Clin.	liofilização	jan/92	jan/12	1
70380	1080	_	LCR	M	_	_	N	A	PI	Clin.	cong. -70°C	out/03	jan/12	1
70226	254	3942	LCR	M	_	HIV neg	N	A	RJ	Clin.	liofilização	jan/93	jan/12	1
70124	148	5501	LCR	M	_	_	N	A	RJ	Clin.	liofilização	mar/93	jan/12	1A
70316	575	_	_	M	22	_	N	A	PI	Clin.	cong. -70°C	jul/02	_	1A
70118	154	5418	_	_	_	_	N	D	PR	Clin.	liofilização	mar/91	jan/12	2

Cepas de <i>Cryptococcus neoformans</i> de origem ambiental, oriundas de diferentes regiões do Brasil, utilizadas no AFLP														
INCQS	LMM	ORDEM /IPEC	Material Biológico	Sexo	Idade	Patologia Associada	CGB	Sorotipo	UF	Origem	Método de preservação	Data do congelamento ou liofilização	Ativação do crescimento	Genótipo
70278	546	Cassia 2	madeira decomp.	-	-	-	N	A	RJ	Amb.	liofilização	jul/96	jan/12	1
70299	526	Zi2-Bç	cabori da folha pequena	-	-	-	N	A	AM	Amb.	liofilização	dez/96	jan/12	1
70004	383	RJ-46	poeira, sementes excreta de pombo	-	-	-	N	NT	RJ	Amb.	liofilização	abr/88	jan/12	1
70235	491	oco 7B	madeira decomp.	-	-	-	N	A	RJ	Amb.	liofilização	dez/92	jan/12	1
70002	385	RJ-24	madeira decomp.	-	-	-	N	A	RJ	Amb.	liofilização	abr/88	jan/12	1
70005	382	RJ-59	poeira, excreta de pombo	-	-	-	N	A	RJ	Amb.	liofilização	abr/88	jan/12	1A
70461		A-48	detritos de eucalipto	-	-	-	N	D	RS	Amb.	liofilização	abr/03	jan/12	2
70009	378	RJ-85	poeira, excreta de pombo	-	-	-	N	AD	RJ	Amb.	liofilização	abr/88	jan/12	3

Cepas de <i>Cryptococcus gattii</i> de origem clínica, oriundas de diferentes regiões do Brasil, utilizadas no AFLP														
INCQS	LMM	ORDEM /IPEC	Material Biológico	Sexo	Idade	Patologia Associada	CGB	Sorotipo	UF	Origem	Método de preservação	Data do congelamento ou liofilização	Ativação do crescimento	Genótipo
70018	344	2090	LCR	_	_	HIV pos	P	B	RJ	Clin.	liofilização	nov/90	jan/12	4
70017	347	2071	LCR	_	_	HIV pos	P	B	RJ	Clin.	liofilização	ago/98	jan/12	4
70126	146	5503	_	_	_	_	P	B	CE	Clin.	liofilização	mar/91	jan/12	6
70189		6115	_	_	_	_	P	B	RJ	Clin.	liofilização	mai/91	jan/12	6
70084	192	5203	escarro	M	_	HIV pos	P	B	RJ	Clin.	liofilização	out/90	jan/12	6
70331	727	Tatu 10-PI	Fraguimento do baço tatu	_	_	_	P	B	PI	Clin.	liofilização	ago/98	jan/12	6
70334	791	_	_	F	12	_	P	B	PI	Clin.	cong. -70°C	dez/01	_	6
70315	574	_	LCR	M	23	_	P	B	PI	Clin.	cong. -20°C	jul/98	jan/12	6
70359	931	_	_	F	_	_	P	B	PI	Clin.	liofilização	jun/03	jan/12	6
70355	916	_	escarro	M	_	HIV neg	P	C	RJ	Clin.	liofilização	nov/98	jan/12	5
70027		CDC 3184	_	_	_	_	P	C	USA	Clin.	cong. -20°C	jan/96	jan/12	5
70285	23	10993	LCR	F	29	HIV neg	P	B	PI	Clin.	liofilização	mai/95	jan/12	6
70305	501	_	LCR	M	40	HIV neg	P	B	PI	Clin.	cong. -70°C	fev/96	_	6
70462	559	_	LCR	M	39	HIV neg	P	B	PI	Clin.	cong. -70°C	fev/03	jan/12	6
70463	3	11869	LCR	M	34	HIV neg	P	B	PI	Clin.	liofilização	jun/98	jan/12	6

70339	812	_	LCR	M	38	_	P	B	PI	Clin.	cong. -70°C	mar/03	jan/12	6
70357	925	_	LCR	M	17	_	P	B	PI	Clin.	liofilização	mai/03	jan/12	6
70333	788	_		M	19	_	P	B	PI	Clin.	cong. -70°C	mar/03	jan/12	6
70332	787	_		M	_	_	P	B	PI	Clin.	cong. -70°C	jul/01	_	6
70374	1041	_	LCR	F	_	_	P	B	PI	Clin.	liofilização	out/03	jan/12	6
70377	1074	_	LCR	F	_	_	P	B	PI	Clin.	cong. -20°C	out/03	jan/12	6
70365	1007	_		F	35	_	P	B	PI	Clin.	cong. -70°C	out/03	jan/12	6
70360	942	_	LCR	M	40	_	P	B	PI	Clin.	cong. -70°C	dez/01	_	6
70335	792	_	_	F	_	_	P	B	PI	Clin.	cong. -70°C	jan/01	_	6
70464	512	_	LCR	F	24	HIV neg	P	B	PI	Clin.	cong. -70°C	mar/96	jan/12	6
70352	871	_	LCR	F	40		P	B	PI	Clin.	liofilização	jun/93	jan/12	6
70034	265	3665	LCR	M	_	HIVpos	p	B	RJ	Clin.	liofilização	jan/91	jan/12	6

Cepas de <i>Cryptococcus gattii</i> de origem ambiental, oriundas de diferentes regiões do Brasil, utilizadas no AFLP														
INCQS	LMM	ORDEM /IPEC	Material Biológico	Sexo	Idade	Patologia Associada	CGB	Sorotipo	UF	Origem	Método de preservação	Data do congelamento ou liofilização	Ativação do crescimento	Genótipo
70003	384	RJ-36	Fezes de morcego	-	-	-	P	B	RJ	Amb.	liofilização	abr/88	jan/12	4
70312	561	Cassia 97	Madeira em decomp.	-	-	-	P	B	PI	Amb.	cong. -70°C	fev/03	jan/12	6
70279	551	EC-4bç	Debrito de eucalipto	-	-	-	P	B	PI	Amb.	liofilização	jun/94	jan/12	6
70211	100	6933	Debrito de eucalipto	-	-	-	P	B	AU	Am.	liofilização	jan/96	jan/12	4

Apêndice 3

Cepas de <i>Cryptococcus neoformans</i> e <i>Cryptococcus gattii</i> isoladas do mesmo paciente									
INCQS	LMM	ORDEM /IPEC	Material biológico	CGB	Sorotipo	Faixa etária	Sexo	Idade	Patologias Associadas
70391-A	1428-A	18/11/03-23A	LCR	POS	B	Adulto	F	34 anos	HIV neg
70392-A	1429-24A	19/11/03-24A	Sangue	POS	B				
70393-A	1430-A	21/11/03-25A	LCR	D	UT	Criança	F	09 anos	HIV neg
70393-B	1430-B	21/11/03-25B	LCR	D	UT				
70399-A	1436-A	04/12/03-32A	LCR	D	B				
70399-B	1436-B	04/12/03-32B	LCR	D	B				
70389-A	1426-A	25/09/03-07A	LCR	POS	B	Adulto	F	60 anos	HIV neg
70389-B	1426-B	25/09/03-07B	LCR	NEG	-				
70401-A	1438-A	16/04/04-34A	LCR	POS	B				
70401-B	1438-B	16/04/04-34B	LCR	POS	B				
70402-A	1439-A	03/06/04- 35A	LCR	POS	B				
70402-B	1439-B	03/06/04- 35B	LCR	POS	B				

70408	1445	10/07/04-42	LCR	POS	-	Adulto	F	38 anos	HIV neg
70408-A	1445-A	10/07/04-42A	LCR	NEG	A				
70408-B	1445-B	10/07/04-42B	LCR	NEG	A				
70409-A	1446-A	17/08/04-43A	LCR	NEG	A				
70409-B	1446-B	17/08/04-43B	LCR	NEG	A				
70410-A	1447-A	17/09/04-44A	LCR	NEG	A	Adulto	F	28 anos	HIV neg
70410-B	1447-B	17/09/04-44B		NEG	A				
70411-A	1448-A	22/09/04-45A		NEG	A				
70411-B	1448-B	22/09/04-45B		NEG	A				
70415	1452	21/10/04-49	LCR	NEG	A	Adulto	M	58 anos	HIV pos
70415-A	1452-A	21/10/04-49A	LCR	NEG	A			58 anos	HIV pos
70415-B	1452-B	21/10/04-49B	LCR	NEG	A			58 anos	HIV pos
70428-A	1465-A	19/09/05-62A	LCR	NEG	A			58 anos	HIV Pos
70428-B	1465-B	19/09/05-62B	LCR	NEG	A			58 anos	HIV Pos
70436-A	1474-A	30/09/05-71A	LCR	NEG	A			58 anos	HIV Pos
70436-B	1474-B	30/09/05-71B	LCR	NEG	A			58 anos	HIV Pos

70430-A	1468-A	06/09/05-65A	LCR	NEG	A	Adulto	M	34 anos	HIV pos
70430-B	1468-B	06/09/05-65B	LCR	NEG	A			34 anos	HIV pos
70434-A	1472-A	11/09/05-69A	LCR	NEG	A			34 anos	HIV pos
70434-B	1472-B	11/09/05-69B	LCR	NEG	A			34 anos	HIV pos
70448	1489	19/03/07-86	Sangue	NEG	Sem registro	Sem registro	F	Sem registro	Sem registro
70451	1492	10/04/07-89	LCR	NEG					

Apêndice 4

Critérios para interpretação dos resultados TSA			
Antifúngicos	CLSI M27-A3 (2008)		
	S	S-DD	R
Itraconazol	$\leq 0,125 \mu\text{g/mL}$	0,25 - 0.5 $\mu\text{g/mL}$	$\geq 1 \mu\text{g/mL}$
Fluconazol	$\leq 8 \mu\text{g/mL}$	16- 32 $\mu\text{g/mL}$	$\geq 64 \mu\text{g/mL}$
Voriconazol	$\leq 1 \mu\text{g/mL}$	2 $\mu\text{g/mL}$	$\geq 4 \mu\text{g/mL}$
Antifúngico	S	I	R
Flucitosina	$\leq 4 \mu\text{g/mL}$	8 - 16 $\mu\text{g/mL}$	$\geq 32 \mu\text{g/mL}$
Antifúngico	Aller et al. 2000		
	S	R	
Fluconazol	$< 16 \mu\text{g/mL}$	$\geq 16 \mu\text{g/mL}$	
Antifúngicos	ECV- Espinel-Ingroff et al. (2012)		
	S		
Anfotericina B	≤ 1	-	
Flucitosina	≤ 16	-	
Erros	CLSI	Método Alternativo	
	Mét. de Referência		
EMi	S	I	
	I	S	
	I	R	
	R	I	
EM	S	R	
EMG	R	S	
EMi - erro leve	EM - erro grave	EMG - erro gravíssimo	