

Lidiane de Oliveira

Estudo de características dos agentes de criptococose:
genótipos, polimorfismo, melanização e suscetibilidade a
antifúngicos

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências da
Coordenadoria de Controle de Doenças
da Secretaria de Estado da Saúde de
São Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública
Orientadora: Profa. Dra. Marcia de Souza Carvalho Melhem

SÃO PAULO
2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Oliveira, Lidiane de

Estudo de características dos agentes de criptococose: genótipos, polimorfismo, melanização e suscetibilidade a antifúngicos. - São Paulo, 2015.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2015.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

Orientação: Profa. Dra. Marcia de Souza Carvalho Melhem.

1. Cryptococcus neoformans. 2. Criptococose. 3. Antifúngicos.
4. Genótipos. 5. Parede celular.

SES/CCD/CD-306/14

DEDICATÓRIA

Á minha família

Especialmente, minha querida mãe, por estar sempre ao meu lado, por ser tão dedicada e por me motivar todos os dias.

“Quando morremos, nada pode ser levado conosco, com a exceção das sementes lançadas por nosso trabalho e do nosso conhecimento.”

Dalai Lama

AGRADECIMENTOS

Sempre e em primeiro lugar, agradeço a Deus, por me dar a vida e por fazer de cada dia uma nova oportunidade. Agradeço ao Senhor por me ouvir em todas as orações, por me dar paciência, por me dar perseverança e por conduzir e iluminar meus caminhos.

À minha família, pela presença, apoio, amor e compreensão. Agradeço aos meus pais Luis e Maria, pela vida, pela dedicação e pelos valores com que me educaram, e pela pessoa que sou. Obrigada meus irmãos, Lenildo e Luciana, pelos momentos de descontração, pelo apoio e pela compreensão.

À Prof. Dra. Marcia de Souza Carvalho Melhem, pela orientação, pela paciência, atenção e carinho. Agradeço por todo aprendizado e pela confiança.

Às pesquisadoras do Núcleo de Micologia, Dulcilena M. Castro e Silva, Maria Walderez Szeszs, Marilena dos Anjos Martins e Sandra R. B. S. Pukinskas. Obrigada pela ajuda com a parte laboratorial e com as análises dos testes. Agradeço também pelo que me ensinaram nestes anos, pelas sugestões, pelos conselhos e pelo carinho.

Aos funcionários do Núcleo de Micologia Andres, Lindete e Miriam pela amizade, paciência e apoio. Obrigada pela ajuda na parte laboratorial, e pela oportunidade de conviver e de aprender.

Aos amigos pós-graduandos, Dayane, Douglas, Juliana, Larissa, Lucas e Sonia, pela amizade, pelo incentivo. Agradeço pelas sugestões, críticas e pela colaboração neste trabalho. Pelos anos de convivência, pelos conselhos e pelo incentivo, muito obrigada.

Aos aprimorandos e ex-aprimorandos do Núcleo de Micologia, Daíse, Thiago, Cirlene, Marina, Rosane e Gisele. Obrigada pelo convívio nestes anos, pelas sugestões, pela ajuda e pela amizade.

Aos funcionários do Laboratório de Líquor do Instituto de Infectologia Emilio Ribas. Em especial, agradeço a Dra. Terezinha, Vera e Jeferson pelo esforço em me notificar quanto à entrada de pacientes e por armazenar o líquido, por serem sempre prestativos e atenciosos.

À Dra. Mara Cristina S. M. Pappalardo e ao Dr. José E. Vidal, por ajudar na notificação, localização dos pacientes internados no IIER, na aplicação dos TCLE e por me ajudar com a coleta de dados dos prontuários.

Aos funcionários do laboratório de Imunopatologia de Doenças Infecciosas e Parasitárias do Instituto de Medicina Tropical, Prof. Dr. Thales de Brito e Ana Maria Gonçalves da Silva pela orientação durante a execução do preparo do material para a Microscopia Eletrônica. Agradeço a Ana Maria pela paciência, pelas sugestões e ao tempo dispensado para me ensinar as técnicas e ao Prof. Tales por me ajudar a analisar as fotos, discutir e dar sugestões valiosas para o trabalho.

Aos Funcionários do Laboratório de Patologia e do Laboratório de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Medicina da USP, Cleuza, Miriam e Adão, pelo fundamental auxílio técnico e pelas sugestões com as técnicas relacionadas ao preparo das amostras para Microscopia Eletrônica de Transmissão.

Aos funcionários do Núcleo de Microscopia Eletrônica do IAL, Dr. Jonas José Krisielius, por me ajudar com a obtenção dos cortes e das imagens por MET. Obrigada pela paciência, por me ensinar as técnicas, pelas críticas, e pelas sugestões. Agradeço também a Dra. Noemi e Gislene por ajudar com a obtenção das imagens pelo MET.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós Graduação da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde. Agradeço a disposição e aprendizado.

À CAPES pelo apoio financeiro e pela concessão de bolsa.

RESUMO

Os objetivos deste trabalho foram determinar frequência e características de polimorfismo celular em isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. e utilizar novo método de inóculo individualizado para teste de suscetibilidade a antifúngicos (TSA) utilizando isolados de pacientes hospitalizados. O estudo de polimorfismo analisou 112 isolados de *C. neoformans* (*Cn*) e 65 de *C. gattii* (*Cg*), empregando microscopia ótica e microscopia eletrônica de transmissão (MET), análise de melanização, TSA a fluconazol (FCZ) e anfotericina B (AmB) por E-test® e curvas de morte (*Time Kill Curves*, TK) para AmB, tipagem molecular e *mating-type* (MAT). O estudo do novo método empregou a carga fúngica de 6 pacientes em suas amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) no momento do diagnóstico, 7º dia e 14º dia de terapia antifúngica para CSNC. As cepas foram classificadas segundo tipo molecular e MAT, TSA com FCZ e AMB e teste de combinação por tabuleiro do xadrez. A frequência de polimorfismo celular foi baixa (4%; 7/177), mas nunca antes relatada em isolados de micoteca. Foi inédito o encontro de polimorfismo em isolados de sangue, indicando a facilidade de disseminação de células atípicas pela corrente sanguínea, assim como em isolado de LCR. Todos os fenótipos polimórficos apresentavam células titãs (100%; 7/7) e, em menor porcentagem, pseudohifas (43%; 3/7). O fenômeno de polimorfismo parece ser exclusivo de *Cn*, desde que não foi observado em *Cg*. A espessura da parede das células titãs apresentou a mesma variação (350 nm a 900 nm) em relação às células regulares. Foi observada baixa melanização em 71,4% (5/7) dos isolados polimórficos, dois isolados apresentaram padrão misto de melanização. Todos os isolados com células regulares apresentaram alta melanização. Baixa suscetibilidade (MIC \geq 8 mg/L) foi observada em quase metade dos isolados com células titãs, indicando que polimorfismo possa ter relação com resistência a FCZ. O novo método de TSA com inóculo individualizado não pode discriminar melhor a suscetibilidade a FCZ e AmB, em relação ao método tradicional de referência. Mesmo com o novo método, não foi observada relação entre valor de MIC e evolução clínica; foi possível determinar a dose *in vitro*, clinicamente, relevante de AmB. AmB foi totalmente eficaz para inibir, mas não para matar isolados clínicos polimórficos de *Cn*; TK oferece informação da dinâmica da ação da AmB sobre *Cn* e, por isso, essa técnica foi relevante, em relação a TSA por MIC. A interação *in vitro* entre 5-fluorocitosina e AmB resultou em indiferença ou antagonismo, na maioria dos isolados aumentando a controvérsia já existente sobre a correlação clínico-laboratorial do método do tabuleiro do xadrez com inóculo individualizado. O tipo molecular e MAT da maioria dos fenótipos, polimórficos e regulares, foi *Cn* VNI MATalfa, com baixa frequência de VNII MATalfa, seguindo a tendência global citada na literatura da América Latina.

ABSTRACT

Our objectives were to describe the frequency and characteristics of polymorphism among clinical isolates of *Cryptococcus* spp. and use new method of individualized inoculum for the test of susceptibility to antifungal agents (TSA) against the etiological agent of cryptococcosis of the central nervous system (CSNC) in hospitalized patients. The study of polymorphism analyzed 112 isolates of *C. neoformans* (Cn) and 65 of *C. gattii* (Cg) using optical microscopy and transmission electron microscopy (TEM), analysis of melanization, TSA for fluconazole (FCZ) by E-Test® and time kill curves method (TK) for amphotericin B (AmB), molecular typing and mating-type (MAT). The study of new method employed the fungal load of 6 patients in their cerebrospinal fluid (CSF) samples at diagnosis, 7th and 14th day of therapy for CSNC. The strains were classified according to molecular type and MAT, TSA using FCZ or AmB and drug combination using AMB and 5-flucytosine (5FC) by chequerboard, and TK. The frequency of cell polymorphism was low (4%; 7/177), but never before reported in isolates of collection. The occurrence of polymorphism in blood isolates was unprecedented, indicating the ease of dissemination of atypical cells into the bloodstream, as well as in CSF. All polymorphic phenotypes showed titan cells (100%; 7/7), and, at a lower percentage, formed pseudohyphae (43%; 3/7). The phenomenon of polymorphism seems to be unique in Cn, since it was not observed in Cg. The wall thickness of the titans cells presented the same variation (350 nm to 900 nm) compared to regular cells. Low melanization was observed in 71.4% (5/7) of polymorphic isolates, two isolates showed both patterns of melanization. All isolates with regular cells showed high level of melanization. Low susceptibility (MIC, ≥ 8 mg/L) was observed in almost half of the isolates with titan cells, indicating that polymorphism may be related to resistance to FCZ. The new method of TSA with individualized inoculum is not better discriminatory for susceptibility to FCZ and AmB, compared to Etest®. Even with the new method, no relation between the amount of MIC and clinical outcome was observed; it was possible to determine the relevant individual *in vitro* dose concentration of AmB. AmB was totally effective at inhibiting, but not killing polymorphic and regular clinical Cn isolates. TK offers information on the dynamic action of AmB on Cn and, therefore, this technique is relevant in relation to TSA by MIC. The *in vitro* interaction between AmB and 5FC resulted in indifferent or antagonistic interaction in the majority of strains, increasing the existing controversy about the clinical-laboratory correlation of the chequerboard method using individual inoculum. The molecular type and MAT of most phenotypes, polymorphic and regular, was Cn VNI MATalpha, with low frequency of VNII MATalpha, following the trend of non-polymorphic isolates reported in the literature.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFLP: *amplified fragment length polymorphism*
AFST: *Antifungal susceptibility testing*
AIDS: *Acquired Immunodeficiency Syndrome*
AMB: anfotericina B
C. gatti: *Cryptococcus gattii*
C. neoformans: *Cryptococcus neoformans*
CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*
CRT-DTS/AIDS: HIV Centro de Referência e Treinamento em Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS
DNA: *deoxyribonucleic acid*
EUCAST: *European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing*
et al.: *et aluminii*
FCZ: fluconazol
FIC: *fractional inhibitory concentration*
FICI: *fractional inhibitory concentration index*
g: grama
HAART: *Highly Active Antiretroviral Therapy*
i.e.: isto é
IIER: Instituto de Infectologia Emilio Ribas
ISC III ES: Centro de Referencia Instituto Nacional de Salud Carlos III, Espanha
L: Litro
LCR: líquido cefalorraquidiano
L-DOPA: di-hidroxi-fenilalanina
MAT: *mating type*
MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão
MFC: *Minimal Fungicidal Concentration*
MIC: *Minimal Inibitory Concentration*
mg: miligrama
mL: mililitro
mm³: milímetro cúbico
MLMT: *Multilocus Microsatellite Type*
MLST: *Multiclocus Sequence Type*
PCR: *Polymerase Chain Reaction*
RAPD: *Random Amplified Polimorfism*
RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism*
RivDC: *Relevant in vitro Drug Concentration*
RNA: *ribonucleic acid*
TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFC: unidades formadoras de colônias
WHO: *World Organization Heath*
°C: graus Celsius
µL: microlitro
5-FC: 5-fluorocitosina

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Tabela 1. Características de 7 isolados polimórficos de *C. neoformans* mantidos na micoteca do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, segundo aspecto em cultura de ágar Niger e tipo de polimorfismo.....45
- Tabela 2. Valores de concentração inibitória mínima (MIC) de fluconazol e anfotericina B por Etest® frente a morfotipos de 7 isolados polimórficos de *C. neoformans*.....51
- Tabela 3. Dados clínicos dos pacientes hospitalizados no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, do grupo de estudo de isolados recém obtidos de amostras de LCR.....57
- Tabela 4. Cultura quantitativa, teste de aglutinação em látex e contagem de blastoconídios nas amostras de LCR.....59
- Tabela 5. Valores de concentração fungicida mínima (MFC) e concentração inibitória mínima (MIC) de anfotericina B, pelo método de inóculo individualizado e MIC por Etest®63
- Tabela 6. Valores de concentração fungicida mínima (MFC) e de concentração inibitória mínima (MIC) frente fluconazol, pelo método de inóculo individualizado e MIC por Etest®63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo da infecção por <i>Cryptococcus spp.</i> . Adaptado de Lin e Heitman (2006).....	15
Figura 2. Tipos moleculares e sorotipos das espécies <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> Adaptado de Lin e Heitman (2006).....	18
Figura 3. Exemplo de teste de suscetibilidade de <i>C. neoformans</i> ao fluconazol, com inóculo individualizado, com resultado de concentração inibitória mínima de 20 mg/L.....	33
Figura 4. Exemplo de placas usadas para determinação da concentração fungicida mínima de anfotericina B e 5-fluorocitosina frente à <i>C. neoformans</i>	33
Figura 5. Esquema das 2 placas usadas no teste de tabuleiro de xadrez.....	35
Figura 6. Ilustração de colônias de isolados polimórficos de <i>C. neoformans</i> em placas com ágar Níger.....	44
Figura 7. Aspecto, em ágar níger, de colônias claras e mucóides e colônias mais escuras e menos mucóides selecionadas de um mesmo isolado de <i>C. neoformans</i> contendo células titãs.....	44
Figura 8. Exemplos de polimorfismos: gigantismo e pseudofilamentação em único isolado clínico de <i>C. neoformans</i>	46
Figura 9. Micrografias por microscopia eletrônica de transmissão da parede celular de <i>C. neoformans</i>	47-49
Figura 10. Padrões de melanização em meio de cultura com L-DOPA.....	50
Figura 11. Exemplo de resultados de testes de suscetibilidade a antifúngicos por Etest®, ilustrando elipse de inibição de isolado de <i>C. neoformans</i> frente fluconazol e anfotericina B.....	51
Figura 12. Curva de morte dos 7 isolados polimórficos de <i>C. neoformans</i> frente anfotericina B (1 mg/L).....	52
Figura 13. Padrão de bandas em eletroforese, de 7 isolados polimórficos de <i>C. neoformans</i> determinados pela técnica de PCR.....	53

Figura 14. Padrão de bandas em eletroforese, de 7 isolados polimórficos de <i>C. neoformans</i> e 4 cepas-padrão (VNI, VNII, VNIII, VNIV) determinado pela técnica de PCR-RFLP.....	54
Figura 15. Ilustração dos produtos de PCR com <i>primer</i> MATa/ MAT α para determinação do tipo conjugante de <i>C. neoformans</i>	54
Figura 16. Observação, no exame direto, de células de <i>Cryptococcus</i> spp. em filamentação.....	58
Figura 17. Produtos de PCR de 14 isolados de <i>C. neoformans</i> provenientes de LCR de 6 pacientes hospitalizados no IIER.....	60
Figura 18. Produtos de PCR-RFLP de 14 isolados de <i>C. neoformans</i> provenientes de LCR dos 6 pacientes hospitalizados no IIER.....	61
Figura 19. Produtos de PCR de 14 isolados de <i>C. neoformans</i> provenientes de LCR de 6 pacientes hospitalizados, para determinação do tipo conjugante, com a utilização de <i>primer</i> para para MAT a.....	61
Figura 20. Produtos de PCR de 14 isolados de <i>C. neoformans</i> provenientes de LCR de 6 pacientes hospitalizados, para determinação do tipo conjugante, com a utilização de <i>primer</i> para MAT <i>alfa</i>	62
Figura 21. Gráfico referente a curva concentração-reposta de anfotericina B utilizando o inóculo individualizado.....	64
Figura 22. Curva de morte dos 6 isolados de <i>C. neoformans</i> obtidos de amostras de LCR de pacientes hospitalizados, submetidos à concentração de 1mg/L de anfotericina B.....	65

Índice

1. Introdução.....	13
1.1. A doença criptococose.....	13
1.2. Tratamento e fatores de influencia na evolução clínica.....	15
1.3. Características de <i>Cryptococcus neoformans</i> e <i>C. gattii</i>	16
1.3.1. Tipos moleculares.....	16
1.3.2. Polimorfismo.....	18
1.4. Melanização e parede celular.....	19
1.5. Resistência a antifúngicos.....	20
1.6. Testes de suscetibilidade a antifúngicos.....	22
2. Objetivos.....	25
2.1. Objetivo Geral.....	25
2.2. Objetivos Específicos.....	25
3. Material e métodos.....	26
3.1. Isolados.....	26
3.2. Estudo de isolados polimórficos.....	26
3.2.1. Seleção de isolados.....	26
3.2.2. Análise da parede celular.....	27
3.2.3. Melanização em cultura.....	29
3.3. Determinação da suscetibilidade a antifúngicos por método do inóculo individualizado.....	29
3.3.1. Amostras clínicas.....	29
3.3.2. Procedimentos de cultura quantitativa e identificação dos isolados.....	30
3.3.3. Preparo de inóculo individualizado.....	31
3.3.4. Determinação do MIC e MFC com inóculo individualizado.....	32
3.3.5. Teste de tabuleiro de xadrez com inóculo individualizado.....	34
3.4. Determinação da suscetibilidade a antifúngicos por Etest®.....	36
3.5. Metodologia de curvas de morte.....	36
3.6. Determinação dos tipos moleculares e conjugantes.....	38
3.6.1. Extração de DNA genômico.....	38
3.6.2. Determinação do tipo molecular.....	39
3.6.3. Determinação de tipo conjugante.....	40
3.7. Análise dos dados.....	41
4. Resultados.....	43
4.1. Estudo de polimorfismo.....	43
4.1.1. Classificação dos isolados.....	43
4.1.2. Análise por Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	46
4.1.3. Pesquisa de melanina.....	50
4.1.4. Determinação da suscetibilidade a antifúngicos por Etest®.....	51
4.1.5. Ação fungicida de anfotericina B por curvas de morte.....	52
4.1.6. Determinação dos tipos moleculares.....	53
4.2. Estudo de isolados recém obtidos de pacientes hospitalizados.....	55

4.2.1	Amostras de LCR e pacientes.....	55
4.2.2	Aspectos clínicos e laboratoriais.....	55
4.2.3	Determinação dos tipos moleculares	60
4.2.4	Determinação da suscetibilidade a antifúngicos por Etest®	62
4.2.5	Teste de suscetibilidade com inóculo individualizado	63
4.2.6	Ação fungicida de anfotericina B por curvas de morte.....	64
5.	Discussão	66
6.	Conclusões	93
7.	Referências Bibliográficas	95
8.	ANEXOS.....	118

1. Introdução

1.1. A doença criptococose

A criptococose, micose sistêmica causada por leveduras do gênero *Cryptococcus*, é uma das principais doenças invasivas em humanos. Grande preocupação surgiu na década de 80, devido ao início de casos de síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e consequente ocorrência de infecções oportunistas associadas à síndrome. No fim da década de 90, com a introdução da terapia antirretroviral de alta potência -HAART- para os pacientes com AIDS, a criptococose, assim como as demais infecções oportunistas, tendeu a decrescer; porém, essa micose manteve-se como uma complicação neurológica frequente e uma das mais importantes causas de mortalidade nestes pacientes (Del Valle e Piña-Oviedo, 2005). Em países desenvolvidos, o óbito de pacientes com AIDS por criptococose apresenta taxas em torno de 9% a 20% (Park et al., 2009; WHO, 2011). Em países em desenvolvimento, no entanto, a criptococose pode apresentar altas taxas de mortalidade, em torno de 40% (Jarvis et al., 2013; WHO, 2011).

Duas espécies, *C. neoformans* e *C. gattii*, são atualmente reconhecidas como os agentes mais comuns da infecção e são caracterizadas por células arredondadas a ovais que se reproduzem por gemulação. As células são envolvidas por cápsula de origem mucopolissacarídica, que é a principal característica utilizada para o diagnóstico presuntivo desses agentes. Os polissacárides constituintes da cápsula são usados também para diagnóstico imunológico. As poucas variações morfológicas, como cor e textura das colônias, não ajudam na diferenciação das espécies, sendo necessária a análise bioquímica para identificação preliminar, seguida de análise molecular para a identificação definitiva (Kwon-Chung e Varma, 2006; Meyer et al., 2003).

A criptococose é adquirida pela inalação de células fúngicas de origem assexuada (blastocónidios) ou esporos sexuados. A infecção pulmonar primária é frequentemente assintomática e pode ser erradicada pela defesa celular, ou contida em granulomas. Os agentes da criptococose apresentam tropismo pelo sistema nervoso central e a forma de meningoencefalite é a mais letal da doença. No entanto, dependendo de fatores do hospedeiro, ou do patógeno, como: volume de inóculo infectante e virulência, o micro-organismo pode se disseminar, imediatamente, ou após período de latência para sítios extrapulmonares (Mitchell e Perfect, 1995; Bicanic e Harrison, 2005; Lin e Heitman, 2006). A Figura 1 ilustra uma proposta da via de infecção por agentes da criptococose.

A criptococose associada à AIDS e outras doenças imunossupressoras, assim como ao uso extensivo de corticoides e transplantes de órgãos é causada, em regra, por *C. neoformans*, que possui caráter oportunista e necessita de condições predisponentes (Mitchell e Perfect, 1995; Perfect et al., 2010).

De outra forma, os casos de infecção por *C. gattii* ocorrem geralmente em indivíduos sem imunodepressão aparente (Jenney et al., 2004; Jain et al., 2005; Lambertucci et al., 2005; Lui et al., 2006; Barbosa et al., 2006; Oliveira et al., 2007; Chen et al., 2008; Mitha et al., 2010; Junior et al., 2010, Debourgogne et al., 2012; Illnait-Zaragozí et al., 2013; Patil et al., 2013). Todos esses casos, até uma década atrás, ocorriam apenas em regiões de clima tropical e subtropical como África, Austrália, Brasil e Tailândia (Kwon-Chung e Bennett, 1984). Entretanto, a partir de 2002 foram relatados casos por *C. gattii*, na ilha de Vancouver no Canadá, cujo clima é predominantemente temperado, seguidos de casos no noroeste dos Estados Unidos (Hoang et al., 2004; Lockhart et al., 2013). Muito se especula sobre a origem e os fatores contribuintes para essa nova ocorrência geográfica, que reforçam a necessidade de maiores estudos sobre a patogênese da infecção por *C. gattii* (Park et al., 2009).

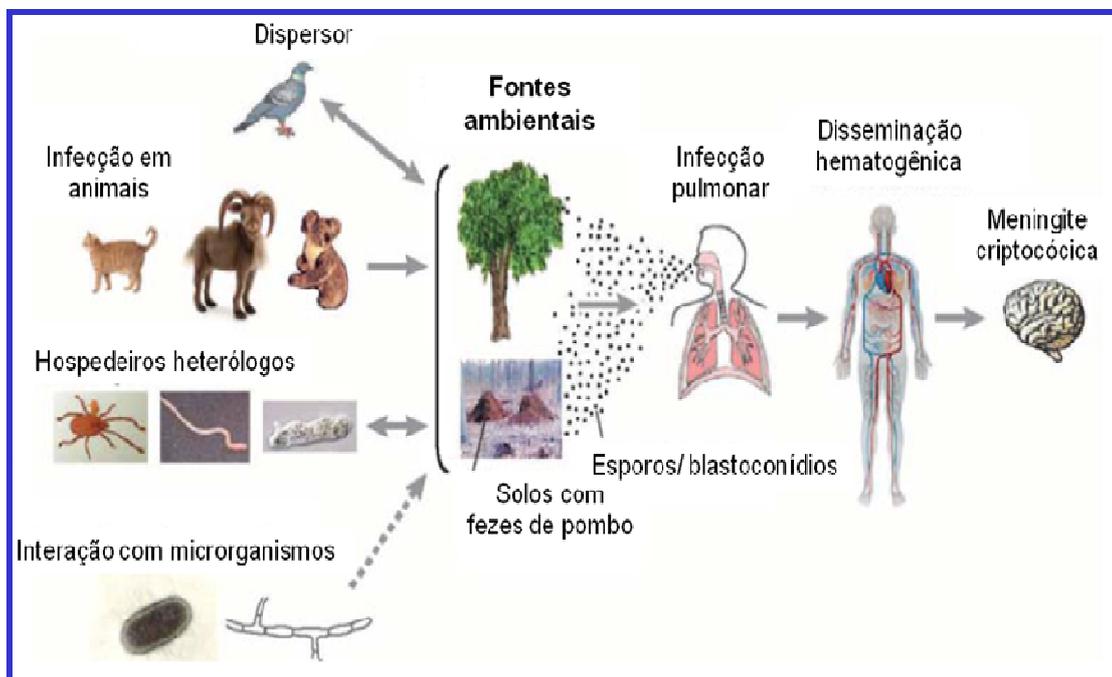


Figura 1. Ciclo da infecção por *Cryptococcus* spp. Adaptado de Lin e Heitman (2006)

1.2. Tratamento e fatores de influencia na evolução clínica

A terapia antifúngica para a criptococose deve ser iniciada o quanto antes para aumentar a chance de sobrevivência do paciente e tem como base a localização anatômica da doença, assim como o estado imunológico do paciente. A meningite criptocócica é geralmente tratada com a terapia de indução de anfotericina B, com ou sem 5-fluorocitosina, seguida por fase de consolidação e fase de manutenção, ambas com fluconazol. Para a doença apenas na forma pulmonar, o fluconazol é terapia eficaz na maioria dos pacientes. Pode ser necessária a manutenção do tratamento com fluconazol por longos períodos nos casos de pacientes infectados pelo HIV e/ou aqueles

com outros quadros de imunossupressão (Dismukes et al., 2003; Perfect et al., 2010; WHO, 2011).

Um dos fatores relacionados à evolução clínica da doença é a carga fúngica no início da doença, determinada pela contagem de unidades formadoras de colônias presente no líquido cefalorraquidiano (LCR). Este é um dos parâmetros valorizados para predição do sucesso do tratamento da forma meningeal da criptococose (Robinson et al., 1999; Brouwer et al., 2004; Larsen et al., 2007; Bicanic et al., 2009; Falci et al., 2010; Bauer et al., 2012; Loyse et al., 2012). Outro fator indicado como parâmetro positivo no prognóstico é a observação da atividade fungicida da anfotericina B, durante as duas primeiras semanas de tratamento (Robinson et al., 1999). Pacientes cuja cultura de LCR foi negativa no 14º dia de tratamento com esse fármaco, apresentaram cinco vezes mais chances de sucesso na terapia do que aqueles que apresentavam cultura positiva (Robinson et al., 1999).

1.3. Características de *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*

1.3.1. Tipos moleculares

Até o início deste milênio apenas a espécie -*C. neoformans*- era considerada patogênica ao homem, sendo dividida em duas variedades e cinco sorotipos, denominados: A, B, C, D e AD. A classificação em sorotipos tem como base, até hoje, as diferenças antigênicas dos polissacarídeos que compõem a cápsula. Os sorotipos A, D e AD referiam-se a *C. neoformans* variedade *neoformans* e os sorotipos B e C à *C. neoformans* variedade *gattii*. A diversidade do DNA levou à criação de uma terceira variedade - *C. neoformans* variedade *grubii*-, proposta para acomodar os isolados do sorotipo A (Franzot et al., 1999; Kwon-Chung e Varma, 2006). Devido às diferenças epidemiológicas, ecológicas e bioquímicas, Kwon-Chung e Varma (2006) propuseram uma nova

classificação desses dois agentes em duas espécies. Assim, *Filobasidiella neoformans* e *F. bacillispora* são atualmente reconhecidas como fases teleomorfas que apresentam características distintas para as respectivas espécies: *C. neoformans* e *C. gattii*. Apenas em condições especiais, como no cultivo em meios de cultura específicos, ocorre a fase sexuada em que há filamentação, produção de basídios e basidiósporos (Lin et al., 2006). Descrito por Kwon-Chung em 1975, *Filobasidiella* spp. é observada por meio do cultivo de isolados contendo tipos sexuais distintos, denominados *mating a* (MAT-a) e MAT-alfa, em condições de baixa quantidade de nutrientes.

Dentro de cada espécie de *Cryptococcus* spp. observam-se diferenças genéticas que são utilizadas para agrupar os diversos tipos moleculares. Estes tipos recebem uma denominação, de acordo com a técnica molecular realizada. Os métodos comumente realizados para determinação dos tipos moleculares são: DNA *fingerprinting*, *Polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism* (PCR-RFLP), *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP), *Multilocus sequence typing* (MLST) e *Multilocus microsatellite typing* (MLMT) (Ruma et al, 1996; Boekhout et al., 1997; Meyer et al., 1999; Meyer et al., 2009). De modo consensual, são aceitos até o momento oito tipos moleculares, determinados pela técnica de PCR-RFLP, para as duas espécies, sendo: VNI, VNII, VNB, VNIII e VNIV em *C. neoformans* e VGI, VGII, VGIII e VGIV em *C. gattii*, conforme Figura 2 (Lin e Heitman, 2006, Meyer et al., 1999; Meyer et al., 2003). Um novo tipo foi descrito em Botswana, recebendo por este motivo denominação VNB, mas posteriormente foi descrita sua ocorrência em outras cidades da África (Litvintseva et al., 2011).

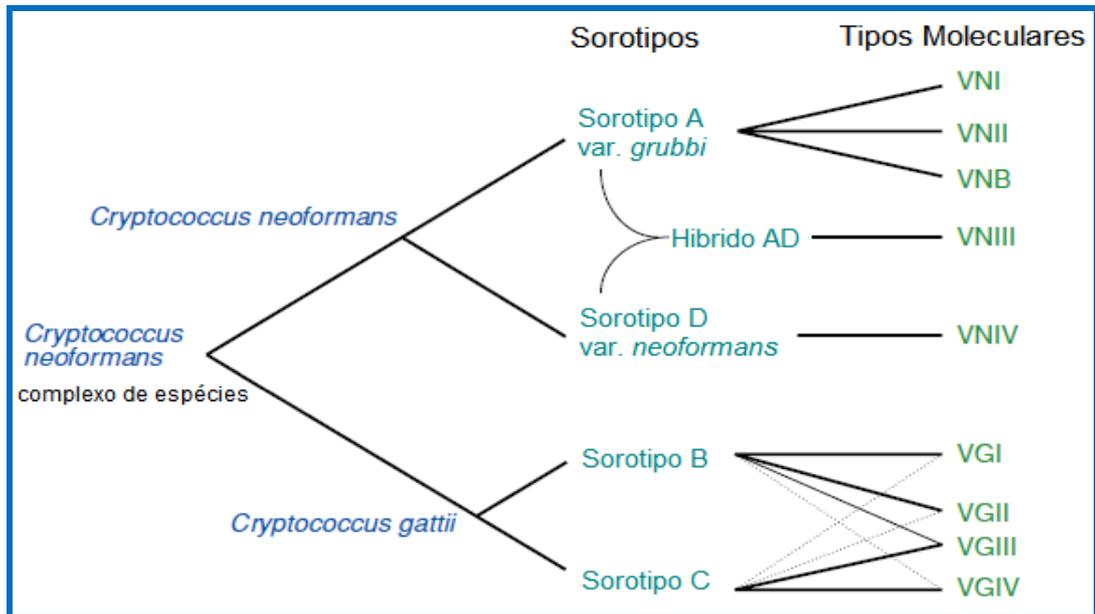


Figura 2. Tipos moleculares e sorotipos das espécies *C. neoformans* e *C. gattii*. Adaptado de Lin e Heitman (2006)

1.3.2. Polimorfismo

Membros do gênero *Cryptococcus* spp. podem apresentar alterações em seu aspecto morfológico como um mecanismo que o torna capaz de resistir às pressões do ambiente (Neilson et al., 1978; Wickes et al., 1996; Fries et al., 2001; Feldmesser et al., 2001; Zaragoza et al., 2010). Uma alteração morfológica que pode ocorrer durante a infecção, é a formação de células gigantes, ou “*titan cells*” (titãs) e micro formas, ou “anãs”. Células de *C. neoformans* apresentam, *in vitro*, diâmetros regulares entre 5 e 10 μm . Enquanto as células titãs podem apresentar até 100 μm de diâmetro, as microformas possuem diâmetro <1 μm (Feldmesser et al., 2001, Zaragoza et al., 2010). Ainda que, há muito seja reconhecido que a infecção induz à alterações morfológicas, como aumento celular, capsular e da espessura da parede, a ocorrência de células anãs e titãs, não havia sido estudada em

profundidade até a publicação de Feldmesser et al. em 2001. Os autores analisaram o fenômeno em modelo murino e mostraram que tais alterações morfológicas estão relacionadas com o estágio da infecção (Feldmesser et al., 2001). Durante a infecção experimental os autores verificaram que uma proporção significativa de células fúngicas no pulmão aumentou de volume, em até 900 vezes em relação ao seu cultivo *in vitro* (Feldmesser et al., 2001).

Atipia como formação de pseudohifas, ainda que mais raramente, também pode ocorrer em amostras biológicas, como LCR, tecidos, urina, líquidos e secreções corporais (Paschoal et al., 1997; Kimura et al., 1998; Bava et al., 1998; Gazzoni et al., 2010) e em meio de cultura (Neilson et al., 1978; Fries et al., 1999).

1.4. Melanização e parede celular

A melanina é componente da parede celular de *Cryptococcus* spp. que há muito vem sendo estudado, desde que representa um dos mais importantes componentes do arsenal de virulência e integridade celular (Wang et al., 1995; Casadevall e Perfect, 1998; Kwon-Chung e Rodes, 1986; Gilbert et al., 2010).

Em *Cryptococcus* spp., a parede também é composta de glucanas, quitina, quitosana e manoproteínas (Gilbert et al., 2010). Diferente de outros gêneros, como *Candida* spp., que contem maior proporção de β -1,3-glucana, em *Cryptococcus* spp. a β -1,6-glucana prevalece (James et al., 1990). No entanto, assim como em outros fungos, a parede celular de *Cryptococcus* spp. é complexa e de natureza dinâmica. Por exemplo, mutantes de *Cryptococcus* spp., com ausência de β -1,6-glucana, apresentam menor retenção de proteínas da parede e têm alteração da localização da quitosana (Gilbert et al., 2010). Da mesma forma, o bloqueio da produção de quitosana resulta em diminuição dos níveis de quitina, afetando a melanização e a conjugação sexual. Interessante

notar que, em ambos os casos, as células continuam viáveis (Gilbert et al., 2010).

A produção de melanina é interpretada como um mecanismo de proteção celular de *Cryptococcus* spp. contra predadores ambientais, como amebas e contra a fagocitose por macrófagos, durante a invasão e colonização do tecido do hospedeiro. A melanização confere também proteção contra radiação ultravioleta, agentes antifúngicos e temperaturas elevadas (Wang et al., 1995; Steenbergen e Casadevall, 2001; Casadevall e Perfect, 1998; Nosanchuk e Casadevall, 2003).

1.5. Resistência a antifúngicos

A anfotericina B é o fármaco preconizado para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas, devido à sua ação fungicida. Como integrante do grupo dos polienos, liga-se diretamente ao ergosterol gerando poros na membrana celular. Estes poros aumentam a permeabilidade da membrana levando à perda de importantes componentes intracelulares, como água e íons (Odds et al., 2003a). O medicamento pode ser encontrado nas formas de deoxicolato ou forma lipossomal, o que diminui os efeitos colaterais de hepatotoxicidade e nefrotoxicidade. Raros são os casos de isolados tolerantes a anfotericina B e sua associação com outros fármacos, como fluconazol, constitui importante fator para o tratamento da criptococose (Odds et al., 2003a).

Em locais onde a disponibilidade de anfotericina B é baixa, como no continente africano, são administradas altas doses de fluconazol, com ou sem 5-fluoritosina (Longley et al., 2008; Nussbaum et al., 2010; Sudan et al., 2013; Rajasingham et al., 2012). Na fase de indução da doença, recomenda-se a administração de fluconazol de 800 a 1200 mg por dia por pelo menos 10

semanas, resultando em uma ação fungicida, seguido da fase de manutenção com fluconazol (Perfect et al., 2010).

O fluconazol pertence à classe dos compostos azólicos, que são substâncias químicas usadas tanto na medicina (fluconazol, itraconazol, voriconazol), quanto na agricultura (difenoconazol, propiconazol, ciproconazol). Atuam inibindo a enzima lanosterol-14 α -demetilase, interrompendo a biossíntese do ergosterol, componente essencial à formação da membrana plasmática da célula fúngica (Trosken et al., 2006). Até os anos 90, a resistência adquirida aos antifúngicos azólicos era incomum, porém, recentemente emergiram distintos padrões da mesma, provavelmente devido ao uso clínico frequente do fluconazol (Maertens, 2004).

A 5- fluorcitosina age por meio da ligação ao RNA do fungo, inibindo assim a síntese de DNA. Para que este mecanismo ocorra deve ser utilizado em associação, geralmente com a anfotericina B, que irá facilitar a entrada do fármaco por meio da formação dos poros. Entretanto, sua utilização é restrita devido a efeitos colaterais causados pelo medicamento como supressão da medula óssea, hepatotoxicidade e distúrbios gastrointestinais, além de apresentar custo elevado (Odds et al., 2013a, Loyse et al., 2013).

A concentração inibitória mínima (MIC) de drogas antifúngicas contra isolados de *C. neoformans* tem sido estudada em maior frequência, em relação a *C. gattii*, para o qual há poucos dados (Aller et al., 2000; Pfaller et al., 2004). A resistência ao fluconazol e a outros compostos azólicos não é um motivo de preocupação no continente americano, onde apenas 3% a 10% dos isolados apresentam valores altos de MIC (Brandt et al., 2001, Pfaller et al., 2013). Entretanto, dados da África, Camboja e Espanha mostraram taxas em torno de 15% a 53% de isolados de *C. neoformans* pouco sensíveis ao fluconazol (Bicanic et al., 2006; Perkins et al., 2005; Pfaller et al., 2004; Sar et al., 2004).

Estudos demonstram que isolados *C. gattii*, tanto ambientais quanto clínicos, são menos sensíveis *in vitro* aos antifúngicos em comparação a isolados de *C. neoformans* (Gomez-Lopez et al., 2008; Rodero et al., 2000a,

Calvo et al., 2001, Pfaller et al., 2005; Silva et al., 2008; Gomez-Lopez et al., 2008; Arechavala et al. 2009). A importância clínica dessa ocorrência, assim como a interpretação dos achados *in vitro* obtidos por distintos métodos laboratoriais, merecem estudos mais detalhados.

1.6. Testes de suscetibilidade a antifúngicos

Os testes de suscetibilidade a antifúngicos para isolados de *Cryptococcus* spp. têm como objetivo monitorar a resistência desses agentes. No entanto, a determinação da resistência obtida pelos métodos considerados de referência para *Candida* spp., apresentam ainda alguns problemas técnicos. Os métodos-padrão desenvolvidos para isolados de *Candida* spp. não são sempre adequadas para avaliar isolados de *Cryptococcus* spp. e esforços têm sido feitos visando a sua padronização, para este e outros gêneros de leveduras não fermentadoras da glicose (Zaragoza et al., 2011). O mais relevante é o baixo crescimento de isolados de *Cryptococcus* spp., devido a fatores ainda não completamente definidos como baixo teor de oxigênio e temperatura (Zaragoza et al., 2011).

Os dois métodos de referência para determinação de MIC, M27A-3 (2008) e E.Def.7.2 (2012), foram publicados pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) e sub-comite *Antifungal Susceptibility Testing do European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing* (AFST-EUCAST). Ambos têm atualizações de periódicas, com a finalidade de melhorar a acurácia da identificação de isolados resistentes aos antifúngicos. Os métodos de referência, norte-americano e europeu, empregam diluição em caldo que têm acurácia para determinar fenótipos de resistência ao fluconazol e outros fármacos fungistáticos, mas para fármacos de ação fungicida, como anfotericina

B, outras técnicas devem ser empregadas para melhorar a acurácia do resultado (CLSI, 2008).

O método denominado de curvas de morte foi indicado como uma ferramenta que oferece dados mais fidedignos para demonstrar fenótipos de resistência à anfotericina B. Esta metodologia já foi empregada para isolados de *Candida* spp., *Cryptococcus* spp. e *Trichosporon* spp. (Klepser et al., 1998; Rodero et al., 2000b; Pappalardo et al., 2009; Ernst e Rogers, 2005; Córdoba et al., 2011; Silva et al., 2012; Hazirolan et al., 2013). Esta metodologia estima o número de microrganismos sobreviventes em função do tempo de contato entre o fungo e um antifúngico. Desta forma, o teste fornece a informação da ação fungicida de forma dinâmica e não de forma estática, como nos testes clássicos para determinação da concentração mínima fungicida (MFC) na microdiluição (Klepser et al., 1997, Pappalardo et al., 2009; Silva et al., 2012. A análise, no teste de curvas de morte, é baseada na contagem de células viáveis em intervalos periódicos de incubação e são feitos gráficos tipo dose-resposta, na base \log_{10} , para ilustrar a contagem decrescente de colônias viáveis. O ponto final da reação ou *endpoint*, é definido quando a taxa de morte é maior ou igual a 99,9%, em relação à contagem inicial de colônias, ou seja, tempo zero de incubação como antifúngico (Klepser et al., 1997-b, Klepser et al., 1998-a).

Testes comerciais, desenvolvidos com base nos métodos de referência, são práticos e rápidos. Dentre os testes mais utilizados estão os de difusão em ágar e aqueles com fitas impregnadas de fármacos, por exemplo, Etest®. Nesta técnica, a fita é embebida com o antifúngico em concentrações crescentes, de forma que ao ser colocada sobre o ágar, a formação de uma elipse de inibição do crescimento fúngico é observada, após incubação. O MIC é considerado quando é possível distinguir o fim desta inibição e o início do desenvolvimento do agente, na área próxima à fita (Ernst e Rogers, 2005).

É importante ressaltar que todos os métodos até agora citados (microdiluição, Etest® e curvas de morte) utilizam um inóculo fixo do fungo para testar ação de determinado fármaco. Desde que a carga fúngica inicial na

criptococose é um preditor de evolução clínica, pode-se prever que um método laboratorial que utilize esse parâmetro em testes de suscetibilidade *in vitro* pode ser promissor (Bicanic et al., 2009).

Um método *in vitro* foi desenvolvido para isolados clínicos de *C. neoformans* com o objetivo de prever a resposta *in vivo* (Larsen et al., 2004 ; Larsen et al., 2005). Este teste é determinado como um método de suscetibilidade a antifúngicos com inóculo fúngico “individualizado” para cada paciente, também denominado como método de suscetibilidade quantitativo (Larsen et al., 2011; Sanchez et al., 2011, Bauer et al., 2012).

Este método fundamenta-se na modificação da técnica de diluição em caldo, com a diferença que o inóculo empregado considera o número de micro-organismos presente no LCR de cada paciente, no momento do diagnóstico, denominada carga fúngica inicial (Larsen et al., 2007). Quando determinada concentração de um fármaco provocar a morte celular (ufc/mL) correspondente àquela observada no 14º dia do tratamento com o medicamento, esse valor é expresso como RivDC – Concentração Relevante *in vitro*. O método prevê, ainda, um experimento com base no “teste do xadrez”, usado para análise de interação de fármacos para determinar se a associação pode influenciar a RivDC. Em caso positivo, a combinação *in vivo* poderia ser vantajosa para tratamento (Bauer et al., 2012).

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Estudar isolados biológicos de origem humana de *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*, quanto à presença e características de polimorfismo celular e suscetibilidade a antifúngicos.

2.2. Objetivos Específicos

- Determinar frequência de polimorfismo celular (gigantismo, nanismo e pseudofilamentação) em isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* de uma coleção de referência.
- Estudar os isolados polimórficos quanto à: espessura da parede celular, melanização em cultura, tipo molecular, tipo conjugante e suscetibilidade a antifúngicos;
- Avaliar, *in vitro*, cepas de *C. neoformans* recém isoladas de pacientes com seguimento clínico, quanto à: i) suscetibilidade a fluconazol e à anfotericina, segundo método de inóculo individualizado, e ii) à interação entre 5-fluorocitosina e anfotericina B, e
- Determinar o efeito fungicida de anfotericina B em *C. neoformans* por meio de curvas de morte.

3. Material e métodos

3.1. Isolados

Para este estudo foram criados 2 grupos de isolados de *Cryptococcus* spp. : um formado por isolados clínicos mantidos em micoteca e outro constituído de isolados clínicos recém obtidos de pacientes hospitalizados. Para o primeiro grupo de isolados de micoteca foi realizado estudo de polimorfismo, melanização e parede celular. Para o segundo grupo de isolados, recém obtidos de amostras de pacientes hospitalizados, foram realizados testes de inóculo individualizado. Para ambos os grupos de isolados foram realizados testes de: tipagem molecular, determinação de MIC para fármacos antifúngicos e curvas de morte.

3.2. Estudo de isolados polimórficos

3.2.1. Seleção de isolados

Foram analisados 177 isolados clínicos humanos de *Cryptococcus* spp., sendo: 112 de *C. neoformans* e 65 isolados de *C. gattii* para determinar a freqüência de polimorfismo celular. Os isolados de *C. neoformans* foram recebidos no período de janeiro de 2010 a dezembro de 2011. Os isolados de *C. gattii* foram obtidos no período de 1998 a dezembro de 2011.

Os isolados foram provenientes de LCR e sangue de casos atendidos em hospitais do Estado de São Paulo e estavam mantidos em solução de glicerol 15%, sob temperatura de -20°C na Micoteca do Núcleo de Micologia do

Instituto Adolfo Lutz de São Paulo (IAL). Foi descongelado apenas um isolado de *Cryptococcus* spp. de cada paciente, o qual foi plaqueado em ágar cromogênico (CHROMagar *Candida*®) para confirmação de pureza. A seguir, todos os isolados foram submetidos à pesquisa de células polimórficas.

Para triagem de isolados polimórficos, os isolados foram semeados em placas de Petri contendo ágar Niger. Colônias distintas em relação a morfotipo de melanização e mucosidade foram separadas e, assim mantidas, recebendo identificação em morfotipo A e B. A seguir, as colônias de cada morfotipo foram analisadas sob microscópio ótico (400x) com uma gota de tinta da China. Os isolados foram classificados em polimórficos, desde que, apresentasse alteração celular, segundo descrito por Okagaki et al. (2010), quanto à ocorrência de pseudofilamentação e diâmetro celular (pequeno se $<5 \mu\text{m}$) e titãs (se $>10 \mu\text{m}$). Células sem filamentação ou com diâmetro entre $5\mu\text{m}$ a $10 \mu\text{m}$ de diâmetro foram consideradas regulares.

Os isolados com células polimórficas foram enviadas para centro de referência Instituto Nacional de Salud Carlos III, Majadahonda, Espanha, sob os cuidados do pesquisador Dr. Oscar Zaragoza, para confirmação dessa ocorrência.

3.2.2. Análise da parede celular

Os isolados com polimorfismo comprovado foram observados por microscopia ótica e submetidos a análise da parede celular por Microscopia Eletrônica de Transmissão. A espessura da parede de células titãs foi comparada com aquela das células regulares. A presença de melanina na parede das células titãs foi também avaliada. Para tanto, as células foram cultivadas em meio mínimo constituído por glicose (15 mM), MgSO_4 (10 mM), KH_2PO_4 (29,4 mM), glicina (13 mM), vitamina B1 ($3\mu\text{M}$) e 1 mM de di-hidroxi-

fenilalanina (L-DOPA) e foram incubadas a 30°C, sob agitação de 150 RPM por 7 dias (Wang et al., 1994).

A seguir, esse material foi armazenado por, no mínimo, 2 horas sob refrigeração e em solução fixadora de Karnovsky modificada, constituída de aldeído glutárico 3%, paraformaldeído 3% e cacodilato de sódio 0,1M em pH 4. Após esse período, o material foi então centrifugado a 1500 rpm por 5 minutos e, em seguida, após retirada da solução fixadora, foi adicionada solução fisiológica 0,9%. Após 15 minutos, as amostras foram lavadas 4 vezes em solução salina fosfatada tamponada pH 7,4 [tampão PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 8,5 mM Na₂HPO₄] com centrifugações sucessivas.

As amostras foram acondicionadas em tubos de vidro e cobertas por uma hora com solução de tetróxido de ósmio 1% diluído em tampão fosfato de Sorensen 0,1M pH 7.4. Seguiram-se três lavagens em água destilada, com centrifugações e foi adicionado acetato de uranila a 1% por uma noite. As células foram lavadas em água destilada, centrifugadas e submetidas à desidratação seriada com concentrações sucessivamente maiores de etanol: duas vezes a 70%, duas vezes a 95% e 4 vezes a 100%. Após esse processo, as células foram tratadas duas vezes com solução de óxido de propileno por 15 minutos e mantidas em solução composta por partes iguais de óxido de propileno e resina *Spurr* por 3 horas. Finalmente, as amostras foram embebidas em resina *Spurr* pura por 30 minutos, com duas trocas e emblocadas em resina *Spurr* em moldes de borracha, sendo mantidas em estufa a 70°C por, no mínimo 10 horas para polimerização.

Os blocos foram trimados e submetidos a cortes ultrafinos em aparelho ultramicrótomo (Servall modelo MT2-B, Estados Unidos) com navalha de vidro. Os cortes foram coletados em grades de cobre recobertas por película *formvar* e, contrastados com acetato de uranila por 15 minutos e citrato de chumbo por 10 minutos. Os cortes foram observados em microscópio eletrônico de transmissão (MET) sob voltagem de 60 V (JEOL modelo JEM-1011, Japão) no Núcleo de Microscopia Eletrônica do Instituto Adolfo Lutz.

3.2.3. Melanização em cultura

Os isolados com polimorfismo celular confirmado foram submetidos a ensaios para pesquisa de melanina, segundo a cor expressa nas colônias em meio de cultura com L-DOPA. Foi transferido 1 mL de cada suspensão de células para placas de Petri contendo meio de cultura Agar L-DOPA e foram incubadas a 30°C por 7 a 10 dias. Os critérios de avaliação da melanização tiveram como base os trabalhos de Van-Dui et al. (2004) e Walton et al. (2005). Os isolados foram caracterizados por: i) baixa produção de melanina, quando a colônia apresentou cor parda ou marrom claro e ii) alta produção de melanina, quando a cor da colônia for marrom escuro ou negra.

Todos os testes foram realizados em duplicata. Nos ensaios de melanização foi empregada, também, a cepa-padrão *C. neoformans* H99, como controle positivo e cepa-padrão *C. albicans* ATCC 90028, como controle negativo.

3.3. Determinação da suscetibilidade a antifúngicos por método do inóculo individualizado

3.3.1. Amostras clínicas

Para este teste foram utilizados isolados de *Cryptococcus* recém obtidos de amostras de LCR. As amostras de pacientes com meningite criptocócica e ainda sem tratamento para a doença foram selecionadas para o estudo. Para tal, familiares de/ou pacientes recém-hospitalizados no Instituto de Infectologia Emilio Ribas (IIER), São Paulo (SP), no período de janeiro a junho de 2013 foram convidados para participação neste estudo. Os critérios de inclusão dos

casos foram: 1) assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO 1), 2) diagnóstico de criptococose por exame direto de LCR positivo para células de leveduras (exame quimicitológico) ou capsuladas (tinta da China) ou presença de antígeno polissacarídico de *Cryptococcus* spp., 3) 3 amostras de LCR, 4) amostra de LCR inicial sem tratamento, 5) amostras de LCR encaminhadas ao Núcleo de Micologia do Instituto Adolfo Lutz de SP (IAL) dentro de 4 h após a coleta, e 6) amostra de LCR sem centrifugação prévia. Os critérios de exclusão foram: 1) ausência de TCLE, 2) amostra de LCR negativa para cultura, 3) menos de 3 amostras, 4) tratamento recente para criptococose, 4) amostra de LCR centrifugada, e 5) casos de recidiva.

Foram utilizadas 3 amostras de LCR, sendo a 1ª a do momento do diagnóstico e antes do tratamento com antifúngicos, a 2ª segunda amostra refere-se a do 7º dia de tratamento e a 3ª amostra a do 14º dia de tratamento. As 2ª e 3ª amostras de LCR foram referentes às punções realizadas para controle da pressão intracraniana e, desta forma, algumas incluídas no estudo foram provenientes de 6º, 8º, 13º ou 15º de tratamento. Para efeito do estudo, todas foram consideradas como de 7º dia e 14º dia de tratamento. As amostras de LCR foram transportadas sob refrigeração (caixa contendo gelo), por no máximo 4 h após coleta, ao Núcleo de Micologia do Instituto Adolfo Lutz

Deste grupo foram compilados os dados de sexo, idade, forma clínica, sinais e sintomas da criptococose, infecção por HIV ou outra doença de base, valores de CD4 e CD8, carga viral, uso de antifúngicos e evolução clínica da criptococose.

3.3.2. Procedimentos de cultura quantitativa e identificação dos isolados

As amostras de LCR foram semeadas para a cultura quantitativa segundo protocolo descrito por Larsen et al. (2007). As amostras foram

submetidas, após homogeneização, à quantificação das células de leveduras em hemocitômetro e, em seguida, foram plaqueadas *pour plate* para contagem de unidades formadoras de colônias (ufc/mL). Para tanto, foram realizadas 10 diluições seriadas (1:10) das amostras de LCR e 0,1 mL de LCR e dessas suspensões foram adicionados a 24 mL de ágar Sabouraud, fundido à temperatura de aproximadamente 40°C. Estas placas foram, cuidadosamente, submetidas à homogeneização e após solidificação foram incubadas em estufa a 30°C por até 10 dias. Após este período a contagem de ufc/mL foi executada e registrada para cada amostra de LCR.

As colônias da placa onde foram realizadas as contagens foram analisadas pela técnica de Tinta da China e, a seguir, semeadas em ágar cromogênico (ChromAgar *Candida*®), para confirmação de pureza. Confirmada sua pureza, uma colônia foi selecionada para identificação presuntiva de espécie por métodos bioquímicos, produção de urease e crescimento em meio CGB (agar canavanina, glicina e azul de bromotimol). Após a identificação presuntiva de espécie, cada isolado foi submetido à identificação do tipo molecular e confirmação da espécie, como descrito à frente, e ao método de inóculo individualizado.

Todos os testes foram realizados em duplicata. Para os testes de suscetibilidade a antifúngicos foram usadas as cepas-padrão *Candida krusei* ATCC 6258 e *C. parapsilosis* ATCC 22019.

3.3.3. Preparo de inóculo individualizado

A contagem de ufc/mL de leveduras da primeira amostra de LCR foi a base para confecção do inóculo. Assim, para cada paciente foi preparado um inóculo na concentração de células de leveduras similar à encontrada na primeira amostra de LCR. Deste modo, o inóculo é denominado “inóculo

paciente-específico” ou “inóculo individualizado” (Larsen et al., 2007). Solução salina (0,85%) foi usada para suspensão inicial das células e a seguir, foi usado meio de cultura líquido RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute 1640*, Cultilab, Brasil) tamponado com ácido morfolinopropano-sulfônico (MOPS), pH 7,2 e com acréscimo de 2% de glicose. A concentração do inóculo foi confirmada através de plaqueamento em ágar Sabouraud e contagem de ufc/mL. Em caso de variação de 10% ou mais, em relação à concentração preconizada no método, o preparo do inóculo era repetido, até acerto do mesmo.

3.3.4. Determinação do MIC e MFC com inóculo individualizado

Os testes de suscetibilidade com inóculo individualizado foram realizados com fluconazol e anfotericina B e a base metodológica foi a macrodiluição segundo documento M27A3 e suplemento M27S4 (CLSI, 2008; CLSI 2012). A modificação foi quanto à gama de concentrações dos fármacos, realizada em DMSO ou água e, em seguida em RPMI-1640. As concentrações ensaiadas para anfotericina B foram de: 0,12 mg/L; 0,25 mg/L; 0,5 mg/L; 1,0 mg/L; 1,5 mg/L; 2 mg/L; 2,5 mg/L; 3 mg/L e 3,5 mg/L e para fluconazol foram de: 10 mg/L; 20 mg/L; 40 mg/L; 60 mg/L; 100 mg/L; 250 mg/L e 500mg/L (Figura 3).

Para determinação do MFC, uma alíquota de cada tubo foi submetida a contagem de ufc/mL em ágar Sabouraud (Figura 4).

Todos os testes foram realizados em duplicata. Para os testes de suscetibilidade a antifúngicos foram usadas as cepas-padrão *Candida krusei* ATCC 6258 e *C. parapsilosis* ATCC 22019.

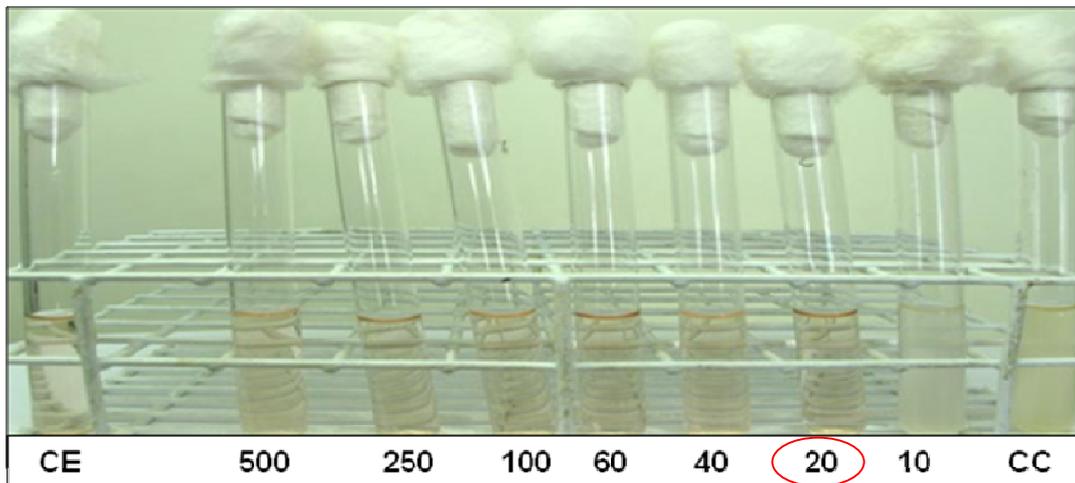


Figura 3. Exemplo de teste de suscetibilidade de *C. neoformans* ao fluconazol, com inóculo individualizado, com resultado de concentração inibitória mínima de 20 mg/L (em vermelho). Tubos 500, 250, 100, 60, 40, 20, 10: concentrações (mg/L) decrescentes do fármaco, com crescimento apenas no tubo 10; CC, controle positivo de crescimento; CE, controle de esterilidade.

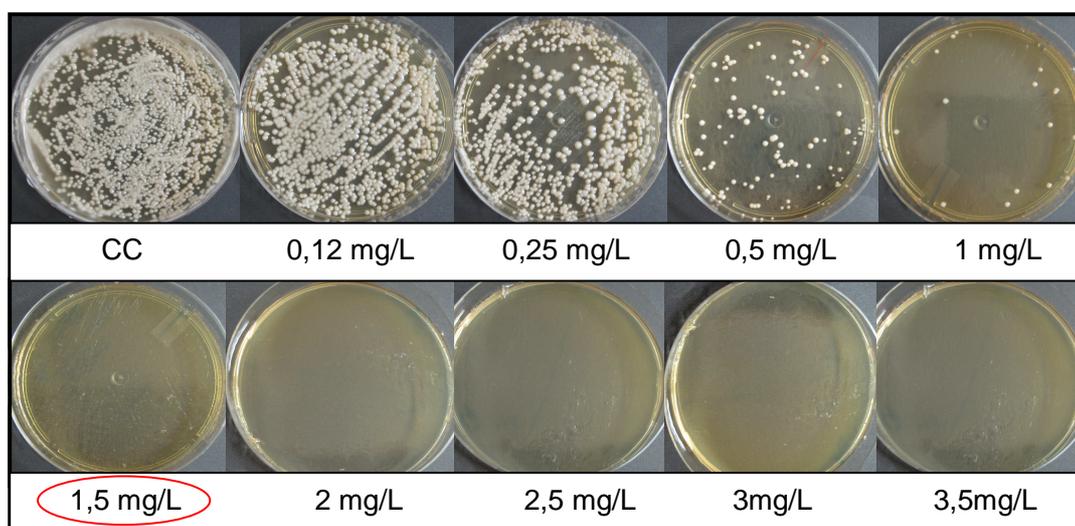


Figura 4. Exemplo de placas usadas para determinação da concentração fungicida mínima (em vermelho) de anfotericina B frente à *C. neoformans*. Os números referem-se às concentrações usadas do fármaco. CC, controle positivo de crescimento.

3.3.5. Teste de tabuleiro de xadrez com inóculo individualizado

Foi realizado o teste de tabuleiro de xadrez utilizando inóculo individualizado segundo metodologia descrita por Bauer et al., 2012. Os antifúngicos foram distribuídos em placas de 96 poços, conforme demonstrado na Figura 3. Para cada isolado foram organizadas duas placas de microdiluição, com distintas combinações de concentrações de antifúngicos. As concentrações avaliadas foram de: 0,25 mg/L; 0,5 mg/L; 0,75 mg/L; 1 mg/L; 1,25 mg/L; 1,5 mg/L; 1,75 mg/L; 2 mg/L e 2,5mg/L para anfotericina B e para 5-fluorocitosina, foram de: 100 mg/L; 200 mg/L; 300 mg/L; 400 mg/L; 500 mg/L; 600 mg/L; 700 mg/L; 800 mg/L e 1000mg/L, conforme esquema da Figura 5.

As placas foram incubadas em estufa a 30°C por até 72 horas. A leitura e a determinação do MIC foram feitas em espectrofotômetro, a 492nm e, também, a “olho-nú” (CLSI,2008).

Os resultados obtidos neste método foram cotejados frente aos dados demográficos, clínicos e terapêuticos dos pacientes.

Todos os testes foram realizados em duplicata. Para os testes de suscetibilidade a antifúngicos foram usadas as cepas-padrão *Candida krusei* ATCC 6258 e *C. parapsilosis* ATCC 22019.

		PLACA 1					
		AMB (mg/L)					
5-FC(mg/L)	CC	0,5	1	1,5	2	2,5	CE
	200	200	200	200	200	200	
		0,5	1	1,5	2	2,5	
	400	400	400	400	400	400	
		0,5	1	1,5	2	2,5	
	600	600	600	600	600	600	
		0,5	1	1,5	2	2,5	
800	800	800	800	800	800		
	0,5	1	1,5	2	2,5		
1000	1000	1000	1000	1000	1000		
	0,5	1	1,5	2	2,5		

		PLACA 2					
		AMB (mg/L)					
5-FC(mg/L)	CC	0,25	0,75	1,25	1,75	2,5	CE
	100	100	100	100	100	100	
		0,25	0,75	1,25	1,75	2,5	
	300	300	300	300	300	300	
		0,25	0,75	1,25	1,75	2,5	
	500	500	500	500	500	500	
	0,25	0,75	1,25	1,75	2,5		
700	700	700	700	700	700		
	0,25	0,75	1,25	1,75	2,5		
1000	1000	1000	1000	1000	1000		
	0,25	0,75	1,25	1,75	2,5		

Figura 5. Esquema das 2 placas usadas no teste de tabuleiro de xadrez. AMB, anfotericina B (concentrações em preto); 5-FC, 5-fluorocitosina (concentrações em vermelho); CC, poço do controle positivo de crescimento; CE, coluna do controle negativo de esterilidade.

3.4. Determinação da suscetibilidade a antifúngicos por Etest®

Todos os isolados, incluindo os de micoteca e os recém obtidos de amostras de LCR foram avaliados para determinação de MIC. O sistema Etest®, composto de fita impregnada com antifúngicos, foi utilizado para determinação da suscetibilidade de todos os isolados. Os testes foram realizados com fluconazol e anfotericina B, segundo orientação do fabricante. Os isolados foram semeados e agar Sabouraud sem cloranfenicol por 24 horas e os inóculos foram semeados em placas de Petri com ágar Mueller-Hinton, acrescido de azul de metileno. Após a adição das fitas Etest®, as placas foram incubadas em estufa a 30°C por 48 a 72 horas.

Para a interpretação dos resultados utilizados pontos de corte (*breakpoints*) não padronizados, mas considerados relevantes e adotados em estudos prévios para fluconazol: sensível MIC < 8 mg L⁻¹ e resistente MIC ≥ 16 mg L⁻¹; e para anfotericina B: sensível MIC <1 mg L⁻¹ e resistente MIC ≥2 mg/L (Aller et al., 2000; Pfaller et al 2005; Dannaoui et al., 2005).

Para os testes de suscetibilidade a antifúngicos foram usadas as cepas-padrão *Candida krusei* ATCC 6258 e *C. parapsilosis* ATCC 22019.

3.5. Metodologia de curvas de morte

Todos os isolados, incluindo os de micoteca e os recém obtidos de amostras de LCR, foram submetidos ao método de curvas de morte para avaliação da eficácia da anfotericina B segundo Klepser et al. (1998). Todos os testes foram realizados em duplicata.

Os isolados foram repicados em tubos contendo meio ágar Sabouraud e incubados a 30°C por 24 a 48 horas. Em seguida, foram submetidos a crescimento em meio RPMI-1640 tamponado com MOPS até pH 7,2 acrescido

de 2% de glicose, por 18h à 35°C em agitação constante. O inóculo inicial foi ajustado em 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente 1.10^6 a 5.10^6 ufc/mL) e 1 mL deste inóculo foi diluído em 9 mL de meio RPMI com 1mg/L de anfotericina B.

Do mesmo modo foi preparado um tubo de controle positivo de crescimento (*C. neoformans* ATCC 90112) em tubo contendo o inóculo sem adição do fármaco. Os procedimentos com este tubo foram idênticos aqueles dos tubos com o fármaco.

Todos os tubos foram incubados à 35°C sob agitação, junto com um tubo controle-positivo de crescimento, ou seja, sem adição da droga e um controle de esterilidade. Alíquotas de 500 µL desta suspensão foram diluídas em 4,5 mL de solução salina estéril e, destas, 30 µL foram retiradas e plaqueadas em meio ágar batata e incubadas a 35°C por aproximadamente 72 horas. A partir desse momento, denominado tempo zero (T0) de incubação, foi iniciada contagem de tempo. Às 6h, 12h, 24h, 48h e 72 h de incubação, foram removidas alíquotas de 500 µL de cada cultura para quantificação de ufc/mL. Para tanto, cada alíquota foi diluída em 4,5 mL de solução salina estéril e, 30 µL foram plaqueados em meio ágar batata, seguido de incubação a 30°C por até 72 h. Após este período, as colonias foram enumeradas e anotadas em gráfico de curvas de morte.

A atividade fungicida (*end point*) da anfotericina B para cada isolado foi determinada pela contagem de ufc/mL equivalente a 0,01 % da contagem obtida no tempo zero de cada isolado.

Para analisar a atividade fungicida pelo método de curvas de morte, foi desenvolvido um gráfico referente a contagem de colonias de todos os isolados *versus* tempo de incubação com fármaco, permitindo observar a diminuição do número de unidades formadoras de colonias viáveis ao longo do tempo. Uma linha de controle de crescimento positivo foi também obtida no gráfico.

Todos os testes foram realizados em duplicata.

3.6. Determinação dos tipos moleculares e conjugantes

Todos os isolados, incluindo os de micoteca e os recém obtidos de amostras de LCR foram analisados quanto ao tipo molecular.

Para os isolados polimórficos de micoteca o procedimento foi realizado com apenas uma colônia representativa de cada isolado. Quanto aos isolados destinados ao método de inóculo individualizado, recém obtidos de pacientes, foi utilizada uma colônia referente a cada dia de coleta, de modo a avaliar possível diversidade de tipos moleculares infectando um único paciente.

Para os ensaios moleculares foram utilizadas cepas-padrão correspondentes aos quatro genótipos de *C. neoformans*: VNI - WM 148, VNII- WM 626, VNIII- WM 628 e VNIV- WM 629 e 4 genótipos de *C. gattii*: WM 179 (sorotipo B, VGI), WM 178 (sorotipo B, VGII), WM 161 (sorotipo B, VGIII) e WM 779 (sorotipo C, VGIV) cedidas pela referência internacional, para a este trabalho, Prof. Dr. Wieland Meyer (Universidade de Sydney, Austrália).

3.6.1. Extração de DNA genômico

A extração de DNA genômico de cada isolado foi realizada em 2 etapas:

i) Obtenção de protoplasto (Perfect et al., 1989; Polachek et al., 1989)

Algumas colonias de leveduras, com crescimento de até 48h foram removidas para um microtubo tipo Eppendorf contendo 1ml de EDTA 50mM. Cada um dos microtubos foi centrifugado em microcentrífuga a 10.000 rpm por 15'. O sobrenadante de cada microtubo foi desprezado e, ao sedimento, foi adicionado 1mL de EDTA 50 mM. Este processo de lavagem foi repetido até que o sobrenadante ficasse límpido e fosse desprezado. Para a digestão da cápsula e parede, as células do sedimento foram ressuspensas em 200µL de tampão CES (20mM de tampão citrato, pH 5,6; 50mM de EDTA; pH 8,0; 0,9M

de sorbitol), contendo 2mg de enzima lítica obtida de *Trichoderma harzianum* (Sigma). A suspensão foi incubada a 37°C por 2h a 3h, sob agitação constante. A seguir, os microtubos contendo os protoplastos, comprovados por observação sob microscopia ótica, foram centrifugados a 5000 rpm por 10 minutos sob 4°C. Foram feitas, a seguir, três lavagens do sedimento com 1mL de tampão CES e, então, o sedimento foi ressuspensão em 200µL de tampão CES.

ii) Lise Celular (segundo Sambrook et al., 1989)

Ao protoplasto obtido como acima descrito, foram adicionados 200µL a 300µL de tampão de lise. Após homogeneização, o material foi incubado em banho-maria, a 50°C por 2h, agitando em *vortex* a cada 30 minutos. O material foi, então, centrifugado por 5 minutos e o sobrenadante retirado para outro microtubo. Ao sobrenadante foram adicionados de 200µL a 400µL de clorofórmio (24:1 clorofórmio/ isopropanol) para promover a precipitação das proteínas e após centrifugação por 15 minutos, houve a formação de três fases. A fase aquosa (parte superior) foi retirada para outro microtubo. Para promover a precipitação do DNA, foram adicionados 300µL de isopropanol. O material foi centrifugado por 10 minutos a 10.000 rpm e o sobrenadante desprezado. Ao sedimento foram adicionados 200µL a 500µL de etanol 70%. Após centrifugação, por 10 minutos a 10000 rpm, o sobrenadante foi desprezado. Após secagem do sedimento constituído de DNA, este foi ressuspensão em 50µL de solução aquosa de RNase e, então, mantido sob -20°C até sua utilização.

3.6.2. Determinação do tipo molecular

A tipagem foi realizada por PCR-RFLP segundo Meyer et al. (2003). Para a amplificação, da seqüência alvo do DNA, foi utilizada a solução pronta para

uso Go Taq® Green Master Mix (Promega). Esta solução contém Taq DNA polimerase, dNTPs, MgCl₂ e tampões em concentrações ótimas para amplificação do DNA por PCR. A solução contém dois corantes que permitem monitorar o curso da eletroforese e possui densidade suficiente para que o produto da PCR seja aplicado diretamente no gel. Foi amplificado o fragmento *URA5* utilizando par de primers *URA5*: 5'-ATGTCCTCCCAAGCCCTCGACTCCG-3'; Sj01: 5'-TTAAGACCTCTCTGAACACCGTACTC-3' nas seguintes condições: desnaturação inicial de 94°C por 5', 35 ciclos de 94°C por 45"; 63°C por 1'; 72°C por 2' e extensão final de 10' a 72°C. Os produtos do PCR foram digeridos duplamente com *Sal* 96I (10U/uL) e *Hha*I (20 U/uL) por 3 h. Os produtos de amplificação foram submetidas à eletroforese em sistema horizontal contendo TBE durante 50 minutos a 100V e 400mA. Os géis foram visualizados em transiluminador ultravioleta com longitude de onda de 302 nm (Syngene). Os perfis de bandas dos isolados foram assinalados, visualmente, por comparação com os perfis obtidos com as isolados de referência VNI-VNIV e VGI-VGIV.

3.6.3. Determinação de tipo conjugante

A determinação do tipo conjugante (*mating type*, MAT) foi desenvolvida por PCR utilizando solução pronta para uso Go Taq® Green Master Mix (Promega) descrita previamente. Foi utilizado primer específico para mating alfa *Mata*alphaF: 5' CTTCAGTCCATCTTCACCA 3'; *Mata*alphaR 5' GACACAAAGGGTCATGCCA 3'. Para o mating a foi utilizado o par de primer *MFa*2U: 5' ACACCGCCTGTTACAATGGAC 3'; *MFa*2L:5' CAGCGTTTGAAGATGGACTTT 3', nas seguintes condições: desnaturação inicial: 95°C por 5', 30 ciclos de 94°C por 1', 57,5 °C por 1', 72°C por 1' e extensão final de 72°C por 10', conforme descrição de Chaturvedi et al.,(2000).

Os produtos foram submetidos à eletroforese em sistema horizontal contendo TBE durante 50 minutos a 100V e 400mA. Os géis foram visualizados em transiluminador ultravioleta com longitude de onda de 302 nm (Syngene). Os perfis de bandas dos isolados foram analisados visualmente, por comparação com os perfis obtidos com as cepas de referência MAT-alfa e MATa.

Na determinação do tipo conjugante foram, também, empregadas cepas *Filobasidiella neoformans* ATCC 28957 (MAT-alfa) e *Filobasidiella neoformans* ATCC 28958 (MATa).

3.7. Análise dos dados

As análises das atividades dos antifúngicos fluconazol e anfotericina B foram realizadas tendo como base a comparação entre resultados de: i) isolados com fraca produção de melanina e forte produção de melanina; ii) espécie-*C. neoformans* e *C. gattii*- e MIC; iii) isolados com células anãs, isolados com células titãs e isolados com pseudofilamentação e iv) efeito fungicida de anfotericina B.

A dose relevante de fármaco necessária, *in vitro*, para se obter a quantidade de ufc/mL similar à obtida na amostra de LCR do 14º dia foi considerada a RivDC (*Relevant in vitro Drug Concentration*) para cada paciente (Bauer et al.,2012).

Para determinar o efeito combinatório da anfotericina B e 5-fluorocitosina foi utilizado o índice de concentração inibitória fracionada (FICI). Para isto, calcula-se a concentração inibitória fracionada (FIC), que é a divisão do MIC do fármaco A em combinação com o fármaco B, pelo MIC do fármaco A sozinho. O mesmo calculo é realizado com o fármaco B (Odds et al., 2003-b) .

O FIC foi calculado de acordo com a fórmula:

$$\mathbf{FIC} = \frac{\mathbf{MIC \acute{a}rmaco \ em \ combina\c{c}\tilde{a}\tilde{o}}}{\mathbf{MIC \acute{a}rmaco \ sozinho}}$$

O FICI é a soma do FIC dos dois fármacos:

$$\mathbf{FICI} = \mathbf{FIC}_{\text{AmB}} + \mathbf{FIC}_{\text{5-FC}}$$

Onde:

$\mathbf{FIC}_{\text{AmB}}$ = a concentração inibitória fracionada de anfotericina B

$\mathbf{FIC}_{\text{5-FC}}$ = a concentração inibitória fracionada de 5-fluorocitosina

A interação é definida conforme proposto por Odds et al. (2003-b) onde a interação é considerada sinérgica se $\mathbf{FICI} \leq 0,5$; indiferente se $\mathbf{FICI} > 0,5$ e ≤ 4 e antagônica se $\mathbf{FICI} > 4$.

4. Resultados

4.1. Estudo de polimorfismo

4.1.1. Classificação dos isolados

Neste estudo, foram analisados 177 isolados de micoteca, para investigação da ocorrência de polimorfismo, sendo: *C. neoformas* (112) e *C. gattii* (65). Apenas 10 (5,7%) isolados de *C. neoformans* apresentaram os critérios estabelecidos para características polimórficas e, destes, 7 (4%) foram confirmados como polimórficos pelo Centro de Referencia Instituto Nacional de Salud Carlos III em Majadahonda, Espanha. Dentre estes isolados polimórficos, 6 foram obtidos de amostras de LCR e 1 de amostra de sangue, sendo 7 de pacientes do gênero masculino e 3 do feminino (Tabela 1).

Todos os 7 isolados polimórficos, quando plaqueados em ágar Níger, apresentaram 2 morfotipos de colônias: i) coloração mais clara e aparência mucóide, e ii) colônias castanhas escuras e aspecto menos mucóide. Estes morfotipos coloniais foram replaqueados várias vezes, de forma a se obter cultivos puros de cada um sendo, então, identificados como A e B, respectivamente, para os de cor mais clara e para os de cor mais escura. Aspectos morfológicos das colônias dos isolados polimórficos constam das Figuras 6 e 7.

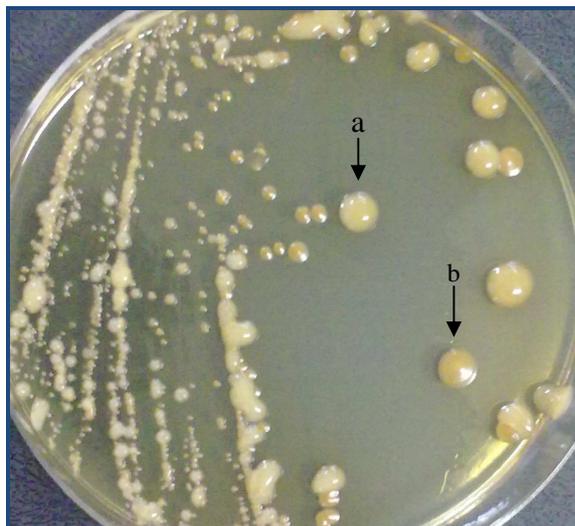


Figura 6. Ilustração de colônias de isolados polimórficos de *C. neoformans* em placas com ágar Níger, onde: (a) colônia castanha clara e de aspecto mucóide, (b) colônia castanha escura e de aspecto menos mucóide.

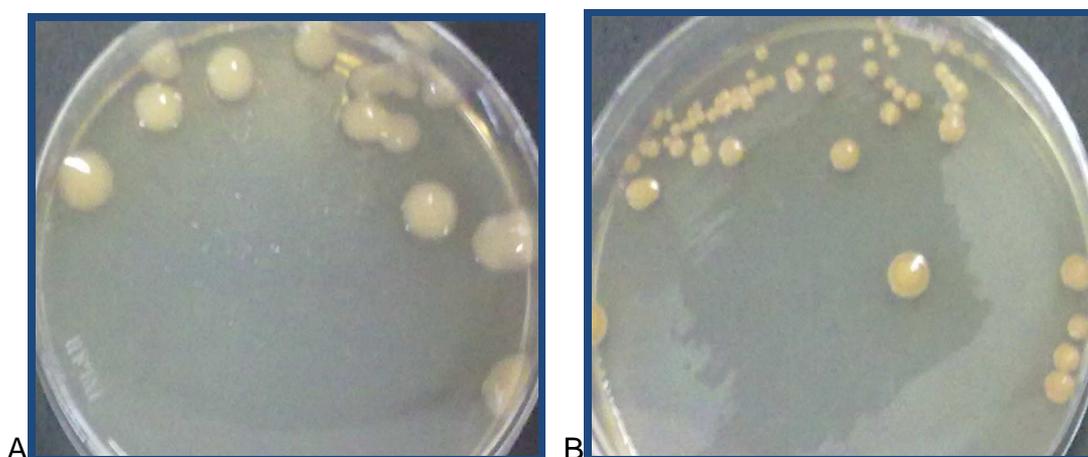


Figura 7. Aspecto, em ágar Níger, de colônias claras e mucóides (A) e colônias mais escuras e menos mucóides (B) selecionadas de um mesmo isolado de *C. neoformans* contendo células titãs.

Tabela 1. Características de 7 isolados polimórficos de *C. neoformans* mantidos na micoteca do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, segundo aspecto em cultura de ágar Niger e tipo de polimorfismo.

Amostra	Origem	Sexo	Aparência das colônias	Polimorfismo observado
1	LCR	♂	A	Titãs e pseudofilamentação
			B	Titãs
2	LCR	♀	A	Titãs
			B	N
3	LCR	♂	A	Titãs
			B	Pseudofilamentação
4	LCR	♂	A	Titãs
			B	N
5	Sangue	♀	A	Titãs
			B	N
6	LCR	♀	A	Titãs
			B	N
7	LCR	♂	A	Titãs e pseudofilamentação
			B	Pseudofilamentação

LCR, líquido cefaloraquidiano; ♀, feminino; ♂, masculino; N, nenhuma característica polimórfica observada; A, predomínio de colônias de coloração castanha clara e aspecto mucóide; B, predomínio de colônias de coloração castanha escura e menos mucóide

Os 7 isolados polimórficos, com predominância nas colônias tipo A, apresentaram células titãs cujo diâmetro variou entre 8 e 13 μm e 3 (3/7; 42,9%) deles também apresentaram pseudofilamentação (Figura 8).

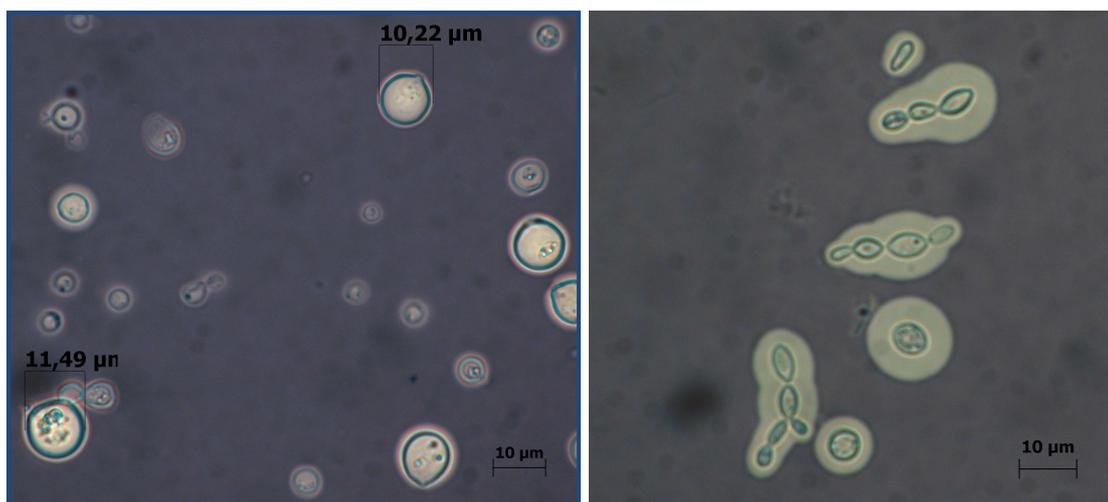


Figura 8. Exemplos de polimorfismos: gigantismo (esquerda) e pseudofilamentação (direita) em único isolado clínico de *C. neoformans*. Coloração de Tinta da China, 100 x

4.1.2. Análise por Microscopia Eletrônica de Transmissão

A análise da parede celular dos isolados polimórficos foi feita através da Microscopia Eletrônica de Transmissão. A espessura da parede das células titãs apresentou a mesma variação (350 nm a 900 nm) em relação às células regulares. Foram observadas camadas mais e menos eletrodensas, independente do polimorfismo. A distribuição de melanina na parede celular não foi homogênea e, tanto células regulares quanto titãs, apresentaram melanização em distintos graus. A Figura 9 ilustra a parede de todos os 7 isolados polimórficos, tanto de células titãs quanto de células regulares.

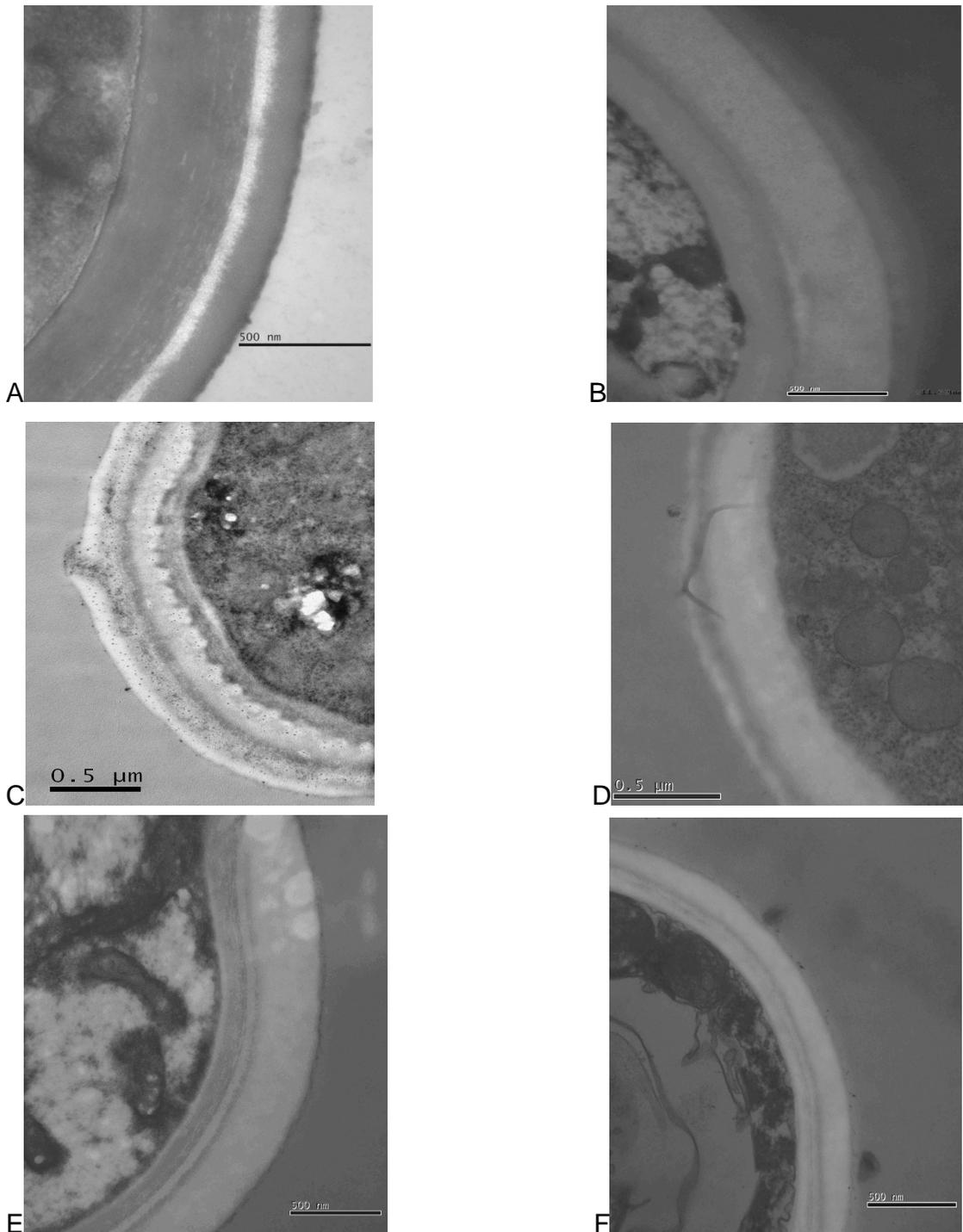
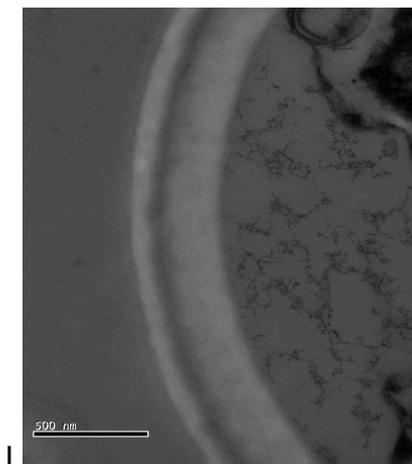
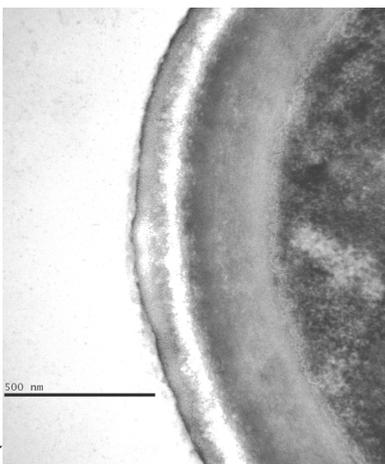
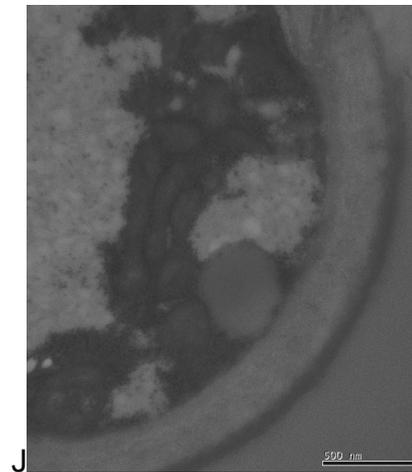
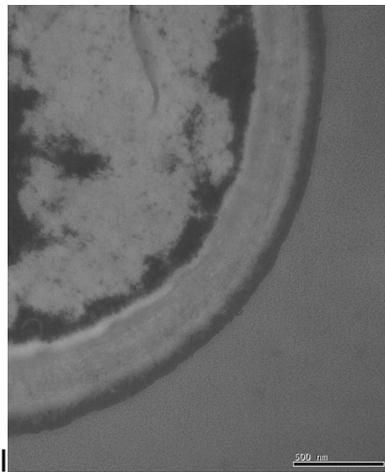
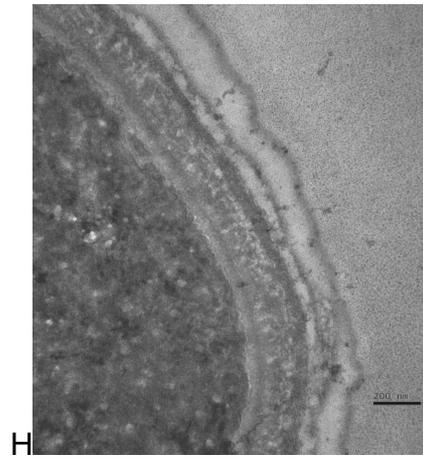
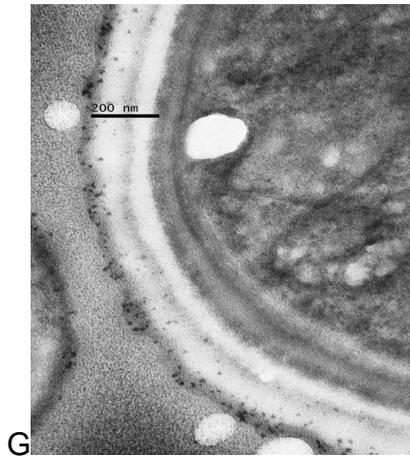
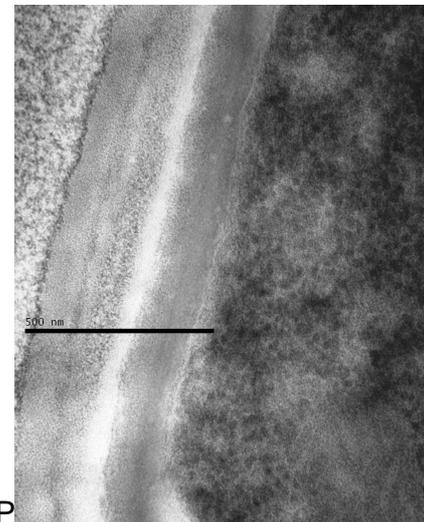
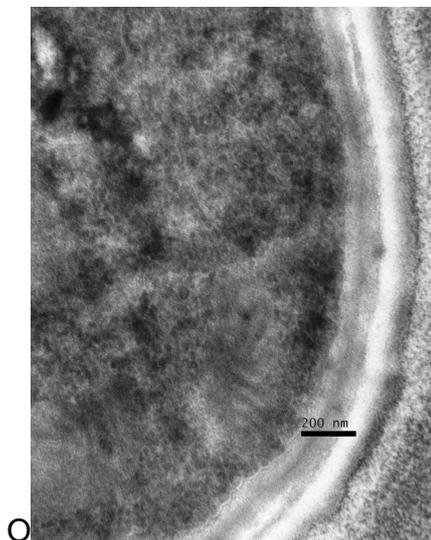
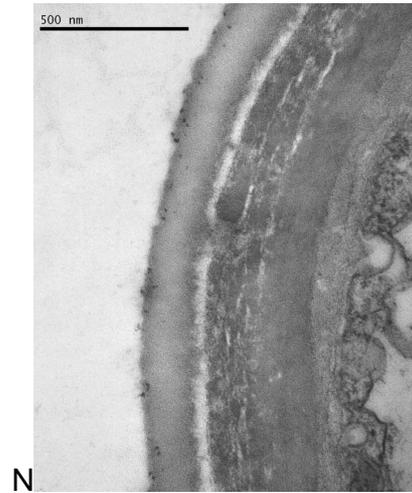
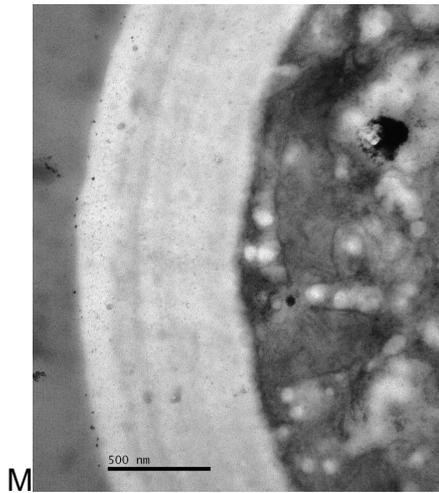


Figura 9. Micrografias por microscopia eletrônica de transmissão da parede celular de *C. neoformans*. A) isolado 1A; B) isolado 1B; C) isolado 2A; D) isolado 2B; E) isolado 3A; F) isolado 3B. Aumento de 100.000x.



Continuação da Figura 9. Micrografias por microscopia eletrônica de transmissão da parede celular de *C. neoformans*. G) isolado 4A; H) isolado 4B; I) isolado 5A; J) isolado 5B; K) isolado 6A; L) isolado 6B. Aumento de 100.000x.



Continuação da Figura 9. Micrografias por microscopia eletrônica de transmissão da parede celular de *C. neoformans*. M) isolado 7A; N) isolado 7B; O) e P) cepa-padrão H9.9 Aumento de 100.000x.

4.1.3. Pesquisa de melanina

Colônias com alta e/ou baixa melanização foram observadas nos 7 isolados polimórficos. Colônias apenas com baixa melanização foram observadas em 5 (71,4%) morfotipos (2A, 3A, 5A, 6A e 7A), colônias com padrão misto foram observadas em outros 2 (1A e 4A) morfotipos. Os demais morfotipos (1B, 2B, 3B, 4B, 5B, 6B, 7B), assim como a cepa-padrão, apresentaram alta produção de melanina. A Figura 10 ilustra os padrões de melanização.

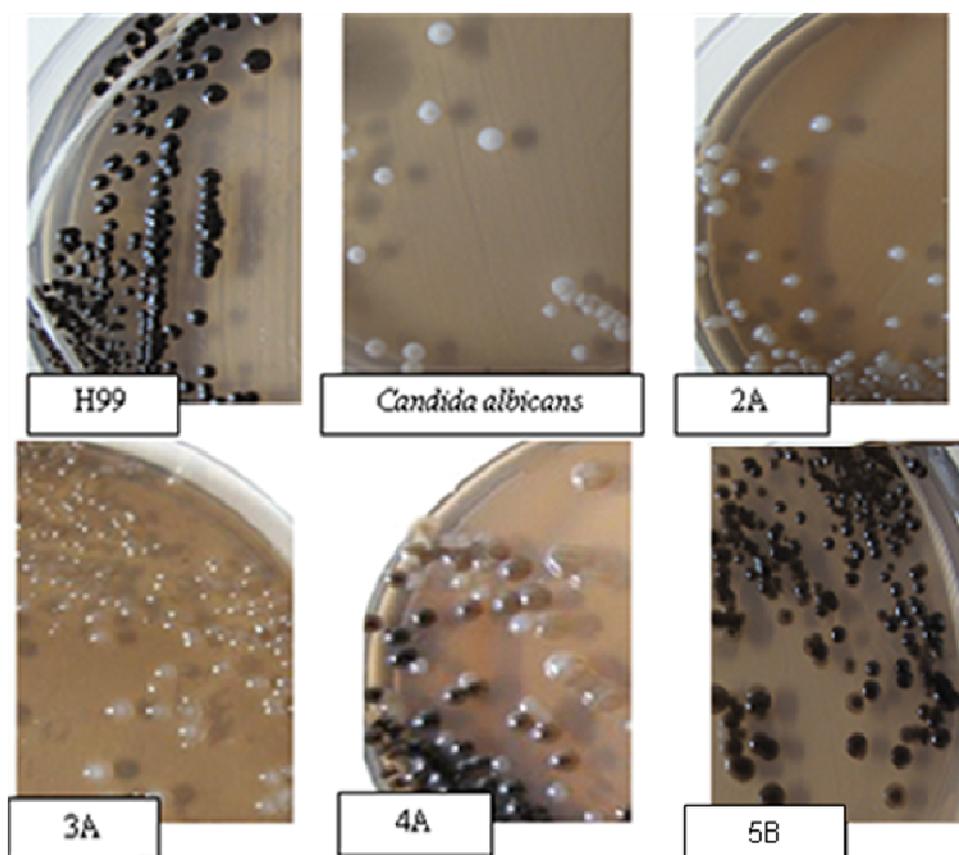


Figura 10. Padrões de melanização em meio de cultura com L-DOPA. H99, cepa-padrão *C. neoformans* com alta produção de melanina; *C. albicans*, melanização ausente; 2A e 3A: isolado de *C. neoformans* com baixa melanização; 4A: isolado de *C. neoformans* com alta e baixa melanização; 5B: isolado de *C. neoformans* com alta melanização.

4.1.4. Determinação da suscetibilidade a antifúngicos por Etest®

Os halos de inibição observados pelo método de Etest®, como ilustrado na Figura 11, permitiram determinar MIC em intervalos de 0,032 mg/L a 12mg/L para fluconazol e de 0.02 a 0.25 mg/L para anfotericina B. Altos valores de MIC para fluconazol (8mg/L e 12 mg/L) foram observados nos isolados 1, 2 e 7 (3/7; 42,9%). Para o isolado 7 foram encontrados dois valores de MIC referentes a cada morfotipo (0,032 mg/L e 8 mg/L). A Tabela 2 mostra os valores de MIC.

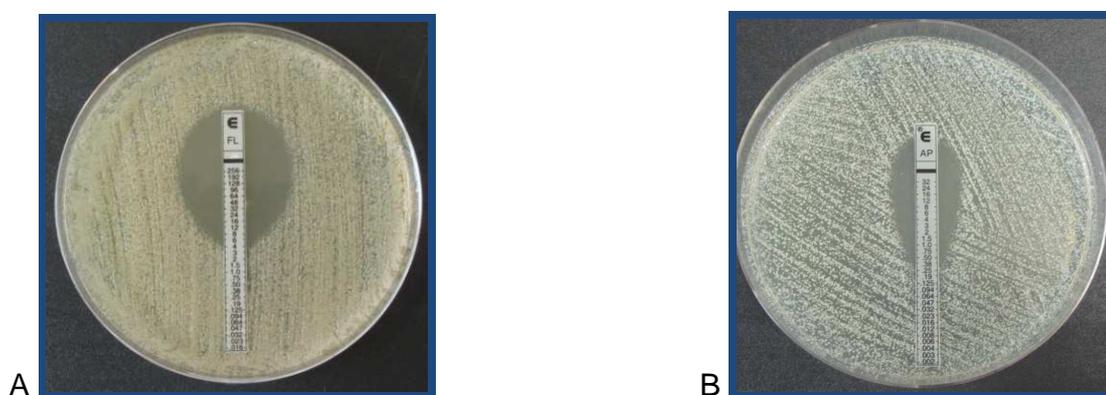


Figura 11. Exemplo de resultados de testes de suscetibilidade a antifúngicos por Etest®, ilustrando elipse de inibição de isolado de *C. neoformans* frente fluconazol (A) e anfotericina B (B).

Tabela 2. Valores de concentração inibitória mínima (MIC) de fluconazol e anfotericina B por Etest® frente a morfotipos de 7 isolados polimórficos de *C. neoformans*

Morfotipos	MIC (mg/L)	
	Fluconazol	Anfotericina
1A e 1B	8	0,125
2A e 2B	12	0,125
3A e 3B	1,5	0,25
4A e 4B	3	0,125
5A e 5B	4	0,125
6A e 6B	0,25	0,25
7A	8	0,023
7B	0,032	0,023

4.1.5 Ação fungicida de anfotericina B por curvas de morte

Dentre os 7 isolados com características polimórficas, a atividade fungicida ocorreu já nas primeiras 6h de exposição com morte de 57,1% dos isolados (isolados 1, 2, 4, 7). Dos demais isolados, 2 (29%) (isolados 3, 5) morreram às 12h e 1 (14%) (isolado 6) morreu após 24h de exposição. Crescimento após o *endpoint* foi observado em 1 isolado (isolado 6) conforme Figura 12.

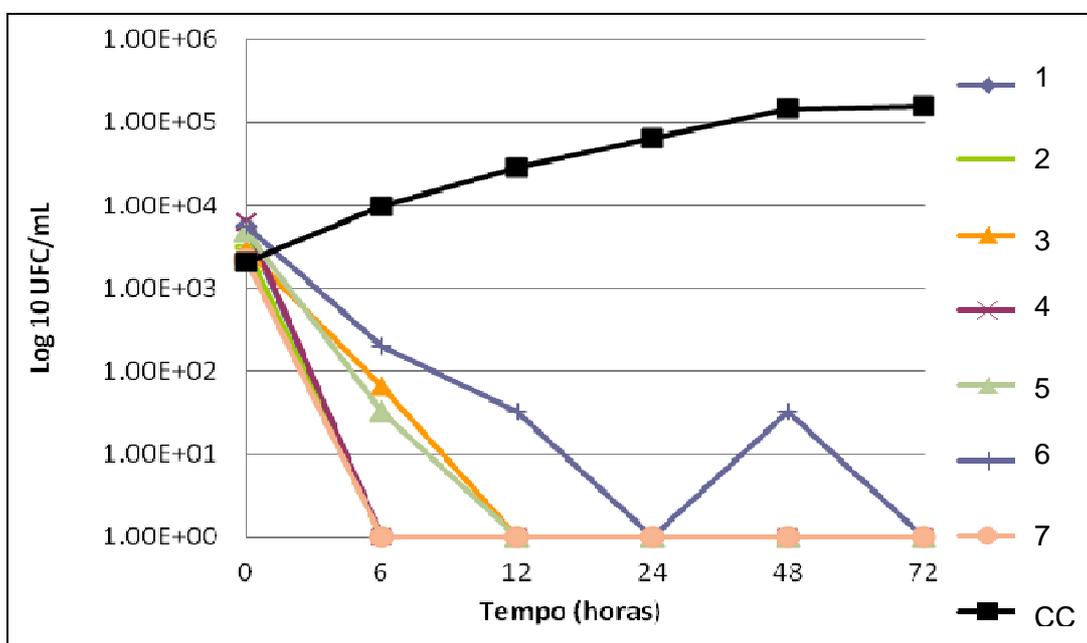


Figura 12. Curvas de morte dos 7 isolados polimórficos de *C. neoformans* frente a anfotericina B (1 mg/L). CC: Controle de crescimento sem o fármaco (■). Linha azul: crescimento de 1 isolado após *endpoint*

4.1.6 Determinação dos tipos moleculares

Foi realizada a tipagem molecular pela técnica de PCR-RFLP de morfotipos A e B dos 7 isolados. Na Figura 13 observa-se padrão único para todas as culturas desse grupo. A tipagem molecular (Figura 14) desses isolados mostrou que apenas 6A e 6B foram identificados como genótipos VNII, os demais foram confirmados como genótipo VNI.

Todos os isolados apresentaram tipo conjugante (*mating type*-MAT) alfa. O padrão de banda está ilustrado na Figura 15.

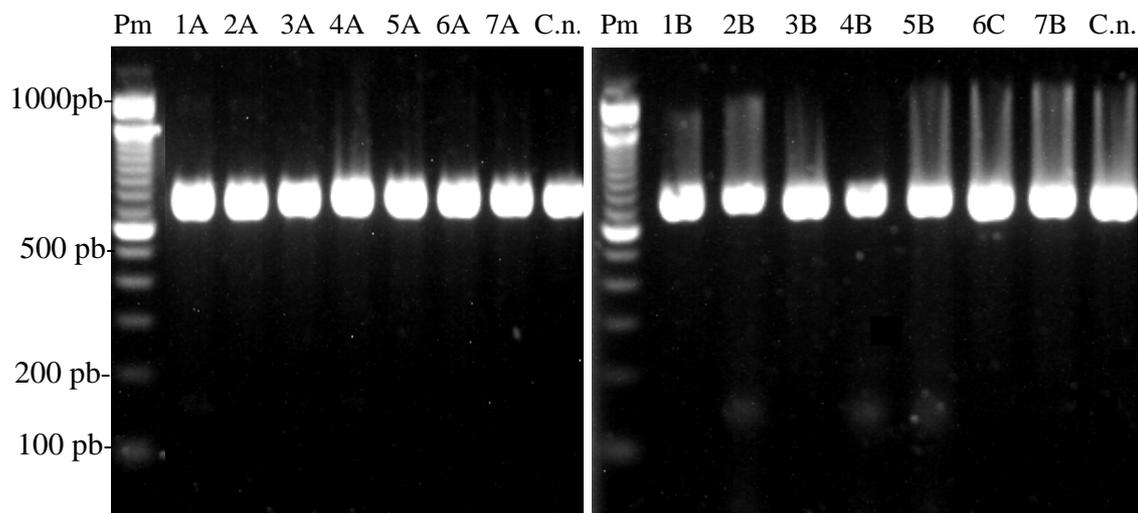


Figura 13. Padrão de bandas em eletroforese, de 7 (números de 1 a 7) isolados polimórficos de *C. neoformans* determinados pela técnica de PCR. Letra A, morfotipo claro e mais mucoide, com predomínio de células titãs; Letra B, morfotipo escuro e menos mucoide; C.n., cepa-padrão *C. neoformans* VNI; Pm, Peso Molecular 100pb.

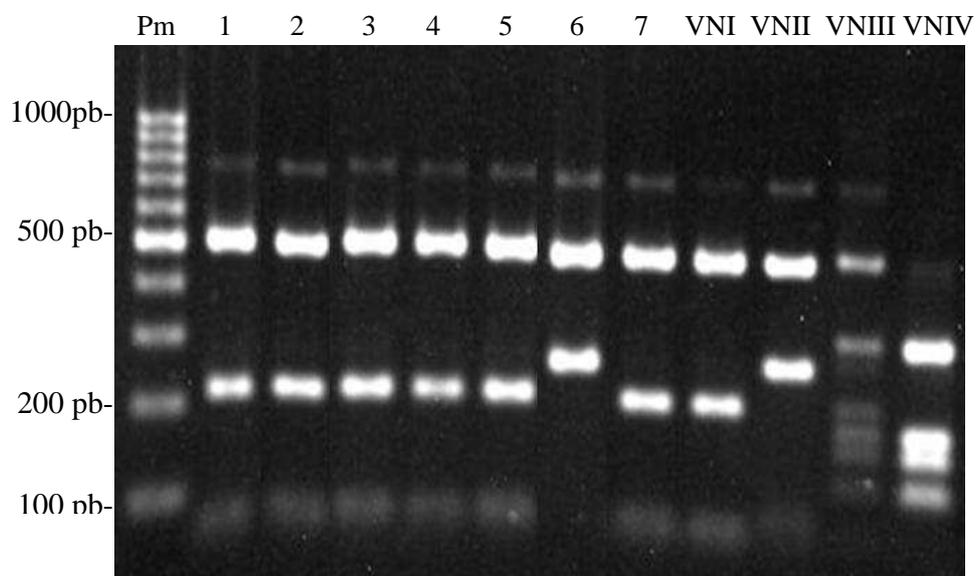


Figura 14. Padrão de bandas em eletroforese, de 7 (1-7) isolados polimórficos de *C. neoformans* e 4 cepas-padrão (VNI,VNII,VNIII, VNIV) determinado pela técnica de PCR-RFLP. PM: Peso Molecular 100pb.

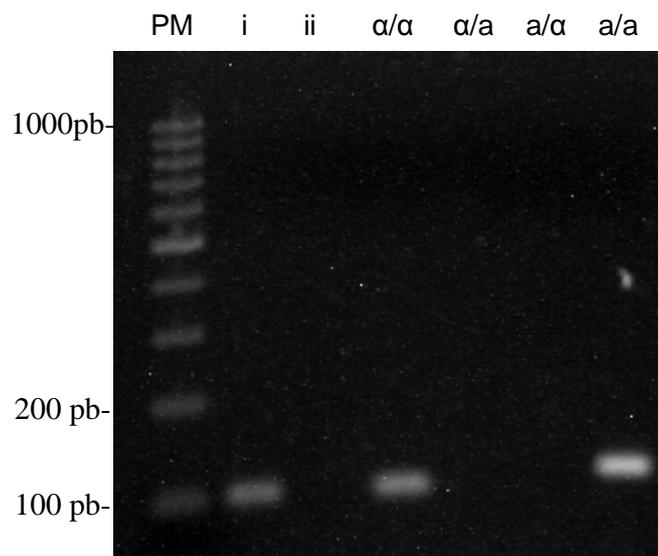


Figura 15. Ilustração dos produtos de PCR com *primer* MAT α / MAT α para determinação do tipo conjugante de *C. neoformans*; i: cepa 3070 MAT α ; ii: cepa 3070 não amplificada com *primer* MAT α ; α/α : cepa ATCC 28957/*primer* α ; α/a : cepa ATCC 28957/ *primer* a ; a/α : cepa ATCC 28958/*primer* α ; a/a cepa ATCC 28958/*primer* a ; Pm: Peso molecular 100pb

4.2 Estudo de isolados recém obtidos de pacientes hospitalizados

4.2.1 Amostras de LCR e pacientes

O estudo iniciou com amostras de LCR de 15 pacientes, admitidos no IIER no período de março a junho de 2012, com resultado positivo para *Cryptococcus* spp no LCR pela primeira vez. Após o diagnóstico laboratorial, realizado pelo exame direto e/ou pelo teste de aglutinação em látex, uma alíquota de 2mL de LCR de cada paciente foi encaminhada ao Núcleo de Micologia do Instituto Adolfo Lutz para cultura quantitativa.

Dentre as 15 amostras de LCR, cinco apresentaram cultura negativa e foram excluídas do estudo. Dos 10 pacientes restantes, dois saíram do hospital e 2 dois foram a óbito antes do 14^o dia de tratamento. Desta forma, seis pacientes participaram do estudo.

Após resultado positivo para cultura de *Cryptococcus* spp., os pacientes ou familiares dos mesmos foram convidados a participar do estudo por meio do esclarecimento da pesquisa, concordância e participação e assinatura do TCLE.

O grupo de pacientes desde estudo foi composto de 5 homens e uma mulher com idade entre 21 e 59 anos. Todos os pacientes foram internados no IIER com quadro clínico sugestivo de meningite, apresentando sintomas de cefaleia e náuseas na maioria dos casos.

4.2.2 Aspectos clínicos e laboratoriais

Todos os pacientes eram portadores do vírus HIV e, apresentaram valores de carga viral entre 213 a 339.615 cópias por mL. Um paciente (paciente 6) apresentou carga viral indetectável. Os valores de CD4 variaram

entre 6 a 151 células/mm³ e de CD8 apresentou valores entre 270 a 230 células/mm³.

A pesquisa de *Cryptococcus* spp. em sítio extraneural foi citada no prontuário de quatro pacientes (4/6;67%).

Dois pacientes foram submetidos a pesquisa do fungo em urina (pacientes 1 e 3), cujo resultado foi negativo.

Hemocultura foi solicitada para quatro pacientes e dois apresentaram resultado positivo. Estes dois pacientes foram submetidos a biopsia de pele para cultura que foi novamente positiva (paciente 2 e 5), indicando disseminação.

Não foi observada solicitação de pesquisa de *Cryptococcus* spp. em foco extraneural para os pacientes 4 e 6.

Todos pacientes receberam tratamento com antifúngicos por até quatro semanas. No geral, foram tratados com anfotericina B (1mg/k/dia) e fluconazol (400mg 12/12h). O paciente 3 teve seu tratamento alterado após 5 dias, sendo administrado anfotericina B lipossomal (165mg/dia) e fluconazol (400mg 12/12h) por duas semanas. O tratamento do paciente 6 foi complementado com 5- fluorcitosina. Esses dados estão demonstrados na Tabela 3 e Apêndice 2.

Tabela 3. Dados clínicos dos pacientes hospitalizados no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, do grupo de estudo de isolados recém obtidos de amostras de LCR.

P	Idade (anos)	Sexo	Amostra	Cultura urina	Carga Viral *	CD4 e CD8 **	Tratamento Dose (antifúngicos)
1	21	♂	Sangue: Neg	Neg	339615	CD4: 47 CD8: 672	AMB 1mg/k/dia + FCZ 400mg 12/12h (4 semanas)
2	43	♂	Sangue: Pos Biópsia de pele: Pos	NR	107125	CD4: 43 CD8: 930	AMB 1mg/k/dia + FCZ 400 mg 12/12 hrs (4 semanas)
3	45	♂	Neg	Neg	213	CD4: 102 CD8: 576	AMB 1mg/k/dia + FCZ 400mg 12/12 por 5 dias. Modificado por AmB lipossomal 165mg 1/dia e FCZ 400mg 12/12h (2 semanas)
4	59	♂	NR	NR	1935	CD4: 33 CD: 837	AMB 1mg/k/dia + FCZ 400mg 12/12 (4 semanas)
5	23	♂	Sangue: Pos Biópsia de pele: Pos	NR	11061	CD4: 6 CD8: 270	AMB 1mg/k/dia + FCZ 400mg12/12 (4 semanas)
6	40	♀	NR	NR	Ind.	CD4: 151 CD8: -	AMB 1mg/k/dia + FCZ 400mg 12/12 + 5FC (100mg/Kg/dia) 6/6h (4 semanas)

P., Paciente; ♀, feminino; ♂, masculino, *cópias por mL; ** células/mm³; Pos, positivo; Neg, negativo; NR, Não realizado; Ind, indetectável; AMB, anfotericina B; FCZ, fluconazol; 5-FC, 5- fluorcitosina

A cultura quantitativa e a contagem de leveduras em hemocitômetro foram realizadas em todas as amostras de LCR. Os resultados podem ser observados na Tabela 4.

A contagem de células referente ao 1º dia de tratamento variou entre 6 e 1048 blastoconídios/mm³. O paciente 1 e 3 não apresentaram blastoconídios a partir do 7º dia de tratamento.

A quantidade de colônias referente a 1ª coleta variou entre 2.500 a 880.000 ufc/mL de LCR. Dois pacientes apresentaram cultura quantitativa sem crescimento de *Cryptococcus* spp. a partir do 7º dia (paciente 1 e 3) e o paciente 4 apresentou ausência de crescimento a partir do 14º de tratamento.

Uma colônia de cada cultura quantitativa foi utilizada na identificação. No total foram utilizados 13 isolados, todos identificados como *Cryptococcus neoformans*.

Dentre as amostras de LCR, uma (paciente 2) apresentou blastoconídios de *Cryptococcus* spp. em pseudofilamentação ao exame direto (Figura 16).



Figura 16. Observação, no exame direto, de células de *Cryptococcus* spp. em filamentação. (A) Tinta da China, (B) Hemocitômetro. Aumento de 100x.

Tabela 4. Cultura quantitativa, teste de aglutinação em látex e contagem de blastoconídios nas amostras de LCR

P	Dia de tratamento	Aglutinação em látex	Contagem (blastoconídios/mm³)	Cultura quantitativa (ufc/mL)
1	1 ^o		495	57332
	7 ^o	Reagente	0	0
	14 ^o		0	0
2	1 ^o		618	880000
	7 ^o	Reagente	128	270
	14 ^o		75	180
3	1 ^o		6	10050
	7 ^o	Reagente	0	0
	14 ^o		0	0
4	1 ^o		1048	21600
	7 ^o	Não realizado	625	1300
	14 ^o		5	0
5	1 ^o		246	2500
	7 ^o	Não Reagente	1310	4134
	14 ^o		86	230
6	1 ^o	Não realizado	470	92500
	7 ^o		220	5607
	14 ^o		33	1427

P, paciente; ufc/mL, unidades formadoras de colônias por ml de LCR

4.2.3 Determinação dos tipos moleculares

Foi realizada a tipagem molecular dos isolados provenientes das amostras de LCR dos pacientes do IIER. Um paciente apresentou tipo molecular VNII (paciente 5) e os cinco demais apresentaram o tipo VNI.

Os padrões de banda referentes a técnica de PCR e PCR-RFLP podem ser observados nas Figuras 17 e 18 respectivamente.

Todos os pacientes apresentaram isolados do tipo conjugante MAT alfa (Figura 19 e 20).

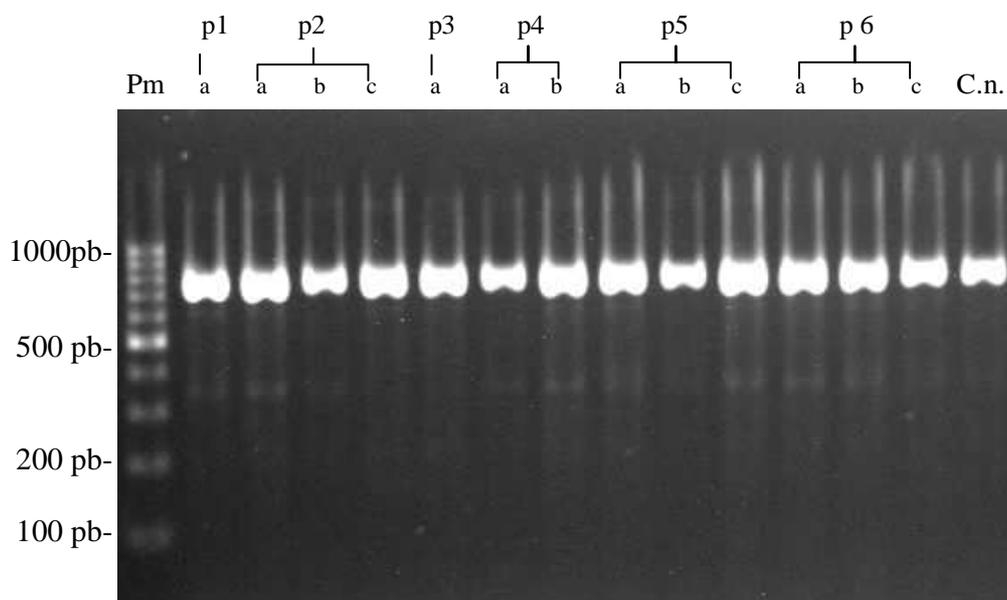


Figura 17. Produtos de PCR de 14 isolados de *C. neoformans* provenientes de LCR de 6 pacientes (p) hospitalizados no IIER. Linha a, isolado da 1ª amostra de LCR; linha b, isolado da 2ª amostra LCR; linha c, isolado da 3ª amostra LCR; C.n., cepa-padrão *C. neoformans* VNI; Pm, Peso Molecular 100pb.

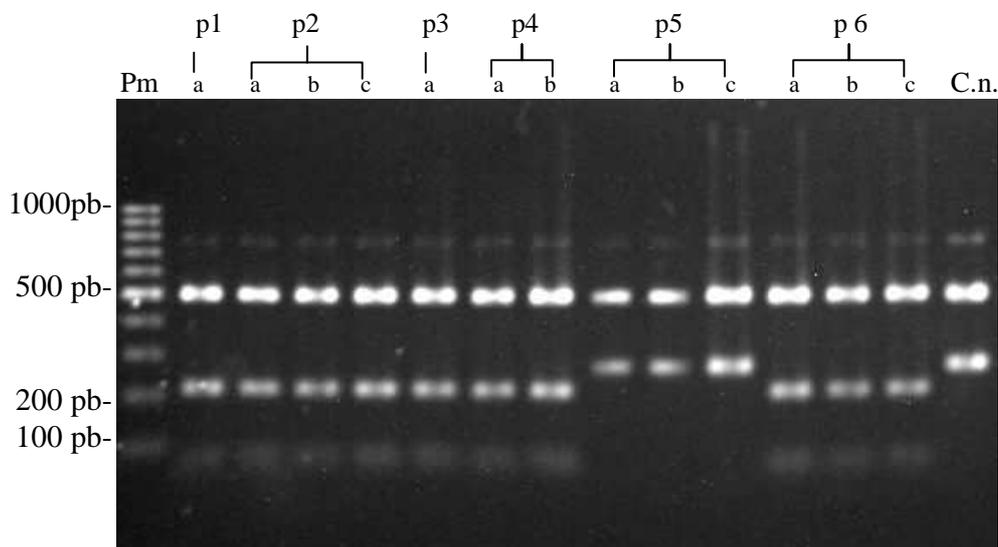


Figura 18. Produtos de PCR-RFLP de 14 isolados de *C. neoformans* provenientes de LCR dos 6 pacientes hospitalizados no IIER. Linha *a*, isolado da 1ª amostra de LCR; linha *b*, isolado da 2ª amostra LCR; linha *c*, isolado da 3ª amostra LCR; C.n., cepa-padrão *C. neoformans* VNI; Pm, Peso Molecular 100pb.

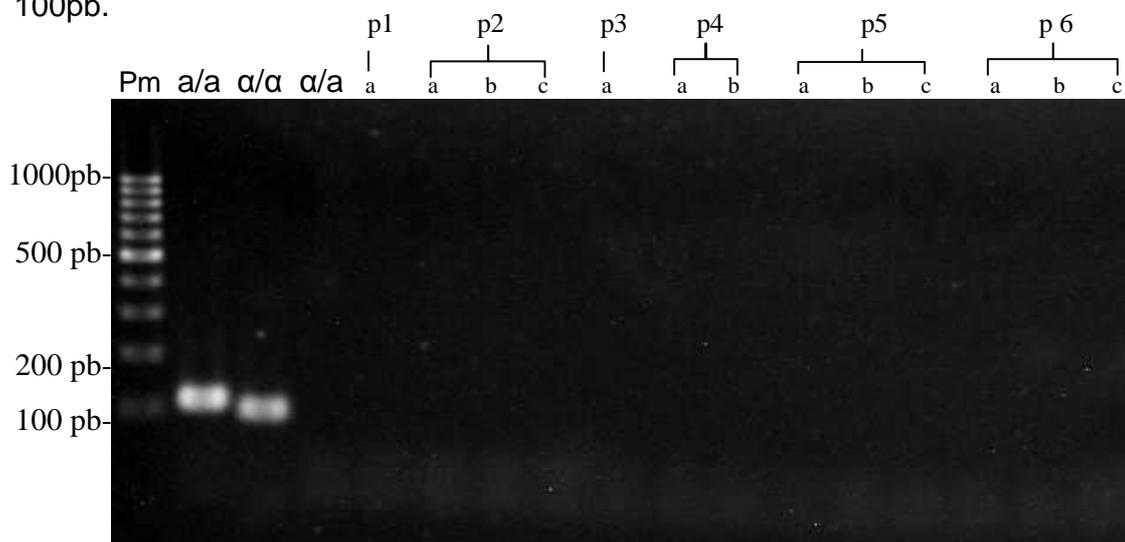


Figura 19. Produtos de PCR de 14 isolados de *C. neoformans* provenientes de LCR de 6 pacientes hospitalizados, para determinação do tipo conjugante, com a utilização de *primer* para para MAT *a*. *a/a*, cepa ATCC 28958/*primer a*; *a/a*: cepa ATCC 28957/*primer a*; *a/a*: cepa ATCC 28957/ *primer a*; Linha *a*, isolado da 1ª amostra de LCR; linha *b*, isolado da 2ª amostra LCR; linha *c*, isolado da 3ª amostra LCR; Pm, Peso Molecular 100pb.

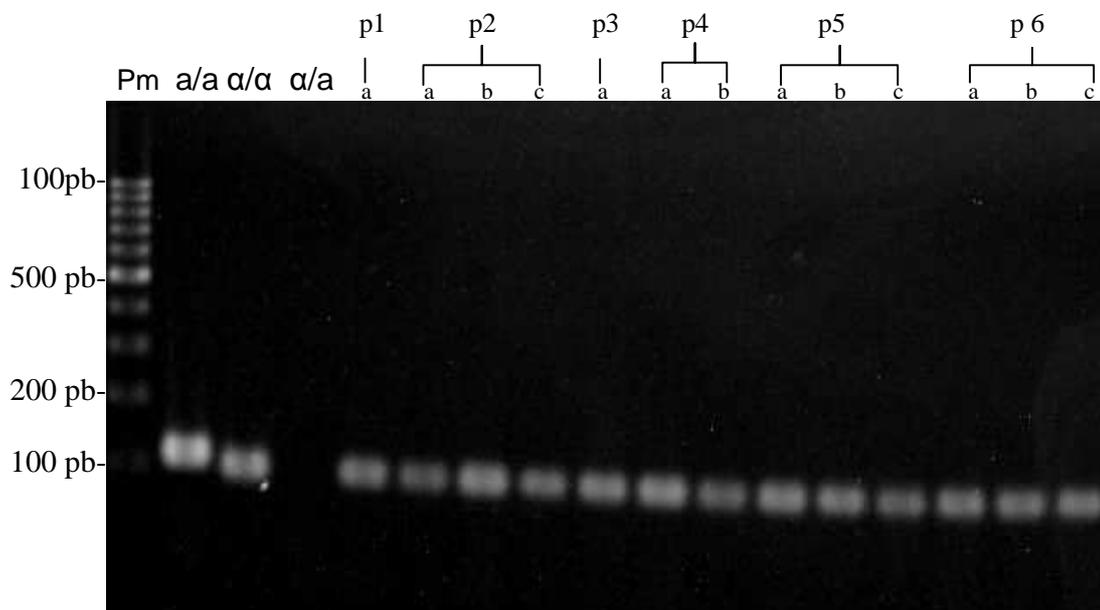


Figura 20. Produtos de PCR de 14 isolados de *C. neoformans* provenientes de LCR de 6 pacientes hospitalizados, para determinação do tipo conjugante, com a utilização de *primer* para MAT *alfa*. a/a, cepa ATCC 28958 com *primer* a; α/α: cepa ATCC 28957 com *primer* α; a/α: cepa ATCC 28958 com *primer* α; Linha a, isolado da 1ª amostra de LCR; linha b, isolado da 2ª amostra LCR; linha c, isolado da 3ª amostra LCR; Pm, Peso Molecular 100pb.

4.2.4 Determinação da suscetibilidade a antifúngicos por Etest®

Dentre os isolados provenientes dos pacientes hospitalizados no IIER, o intervalo de MIC variou de 6 mg/L a 64 g/L para fluconazol e 0,002mg/L a 0,032mg/L para anfotericina B. Este resultados podem ser observados nas Tabelas 4 e 5. Os valores de MIC frente a isolados seqüenciais de mesmo paciente não mostraram variação significativa (± 1 diluição).

4.2.5 Teste de suscetibilidade com inóculo individualizado

Anfotericina B apresentou MIC de 0,5 mg/L frente a todos os 6 isolados enquanto para fluconazol o MIC variou de 20 mg/L a 100 mg/L (Tabela 5). Os valores de MFC para anfotericina B foram de 0,5 mg/L e 1,5 mg/L e os de fluconazol foram de 100 mg/L a maior do que 500 mg/L (Tabela 6).

Tabela 5. Valores de concentração fungicida mínima (MFC) e concentração inibitória mínima (MIC) de anfotericina B, pelo método de inóculo individualizado e MIC por Etest®

Paciente	MFC (mg/L)	MIC(mg/L)	MIC Etest® (mg/L)
1	0,5	0,5	0,012
2	1,5	0,5	0,032
3	0,5	0,5	0,016
4	1,5	0,5	0,032
5	0,5	0,5	0,023
6	0,5	0,5	0,002

Tabela 6. Valores de concentração fungicida mínima (MFC) e de concentração inibitória mínima (MIC) frente fluconazol, pelo método de inóculo individualizado e MIC por Etest®

Paciente	MFC (mg/L)	MIC(mg/L)	MIC Etest® (mg/L)
1	100	10	32
2	>500 mg/L	40	8
3	>500 mg/L	20	16
4	>500 mg/L	20	16
5	>500 mg/L	100	16
6	>500 mg/L	60	64

A concentração relevante *in Vitro* (RivDC) de anfotericina B foi de 0,5 mg/L para 4 pacientes. Para os demais, o RivDC foi de 1mg/L (Figura 21).

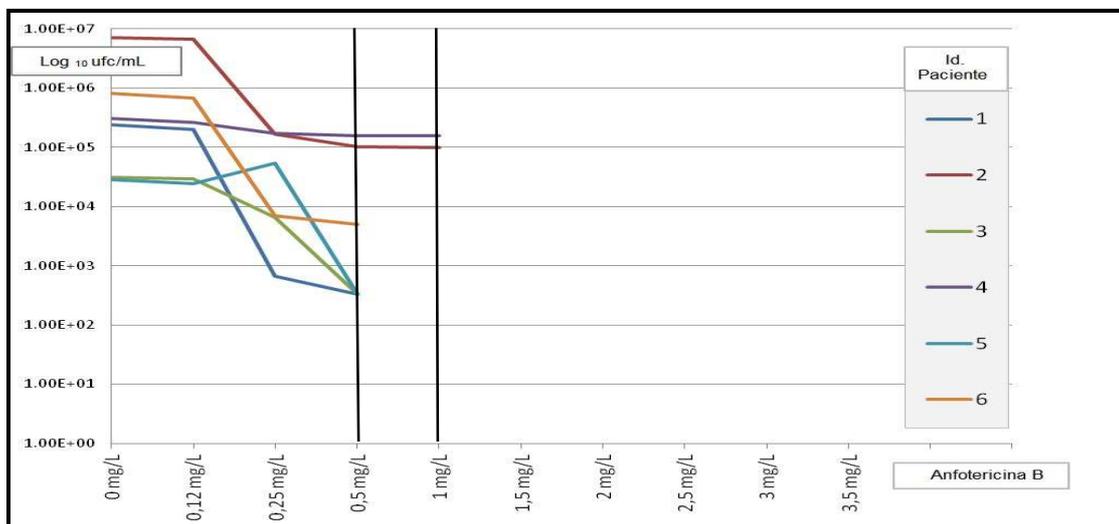


Figura 21. Gráfico referente a curva concentração-reposta de anfotericina B utilizando o inóculo individualizado. As duas linhas horizontais mostram a resposta *in vitro* de 0,5 mg/L e 1,0 mg/L de anfotericina B, correspondente a resposta do paciente observada no 14º dia de tratamento.

O método de tabuleiro de xadrez apresentou interação indiferente entre a anfotericina B e 5-fluorocitosina em três isolados (paciente 2, paciente 4 e paciente 5; FICI: >0,64 e <3,57) e apresentou antagonismo nos demais isolados (FICI >4).

4.2.6 Ação fungicida de anfotericina B por curvas de morte

No teste de curvas de morte realizado com isolados das amostras de LCR dos pacientes hospitalizados no IIER, foi verificada que a atividade fungicida ocorreu já nas primeiras 6h de exposição à anfotericina B, com morte de 83% (5/6) dos isolados. Apenas o isolado do paciente 5 (16,7%;1/6) morreu

às 12h de exposição com o fármaco. O isolado referente ao paciente 4 apresentou crescimento após o *endpoint* (Figura 22).

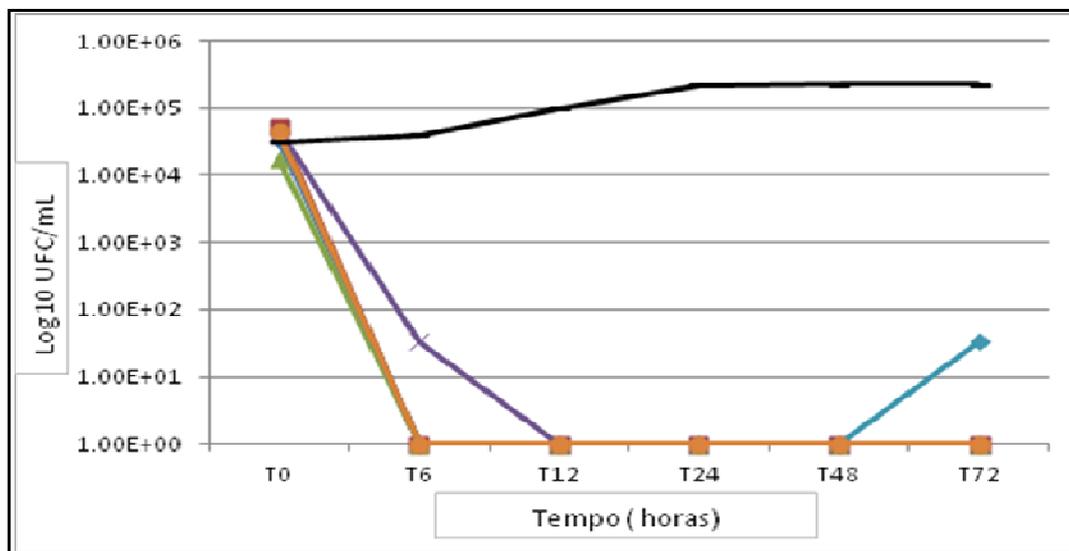


Figura 22. Curvas de morte dos 6 isolados de *C. neoformans* obtidos de amostras de LCR de pacientes hospitalizados, submetidos à concentração de 1mg/L de anfotericina B. Controle (—). Linha azul: isolado com crescimento após *endpoint*.

5. Discussão

Estima-se que mais de 600 mil pessoas morram, anualmente, no mundo todo pela meningite criptocócica, sendo 500 mil desses casos, provenientes da África Subsaariana, onde a epidemia de AIDS é muito grave (Park et al., 2009). A criptococose é considerada uma das doenças definidoras de AIDS pelo Ministério da Saúde e um problema de saúde pública em nosso país. Estima-se que, aproximadamente, 718 mil indivíduos vivam com HIV/AIDS no Brasil, dos quais, cerca de 80% (574 mil) tenham sido diagnosticados (WHO, 2011). Devido ao fato da criptococose não ser uma doença de notificação compulsória, é difícil definir o número de casos e de óbitos relacionados à essa grave micose, contudo, as taxas de mortalidade por criptococose em pacientes com AIDS variam entre 45% e 65% (Pappalardo e Melhem, 2003). No estado de São Paulo, dados do Centro de Referência em Treinamento em Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS (CRT-DTS/AIDS) e Fundação SEADE, registram que até junho de 2013, mais de 110 mil pessoas viviam com AIDS e mais de 2.700 morreram em 2012 pela doença. Entretanto dados do CRT-DTS/AIDS mostram um declínio no número de casos fatais de criptococose meningeal nos últimos anos, apresentando taxas em torno de 40% (Vidal et al, 2013).

C. neoformans sempre é a espécie prevalente na criptococose e, portanto a mais estudada. No início deste trabalho, atribui-se a isso o fato de que todos os relatos de polimorfismo celular tivessem sido descritos em infecções por essa espécie. No entanto, quando analisada uma coleção de micoteca de isolados de *C. gattii* não foi observado o fenômeno. Isso vem de encontro à ausência de relatos de polimorfismo em *C. gattii* na literatura. Em vista do conhecimento de várias diferenças existentes entre essas duas espécies, é importante ressaltar que essa pode ser mais uma delas.

Nenhum estudo prévio destinou-se a avaliar, de modo sistemático como feito neste trabalho, uma coleção de isolados de ambas as espécies para consolidar a hipótese de que apenas *C. neoformans* lance mão da estratégia de polimorfismo. Por sua vez, *C. gattii* possui muitos atributos de virulência que são suficientemente potentes para desenvolver doença em indivíduos sem imunodepressão aparente (Jenney et al., 2004; Jain et al., 2005). O polimorfismo nessa espécie pode ser, sob ponto de vista desse patógeno primário, de menor importância dentro do seu forte arsenal de virulência. Muitos fatores relacionados aos agentes etiológicos, ainda não completamente elucidados, podem contribuir para a evolução clínica, pois as duas espécies apresentam diferenças na apresentação da forma clínica. Criptococose em pacientes sem imunodeficiência aparente é causada, em geral por *C. gattii* sendo frequente, nesses casos, os criptococomas e formas pulmonares graves (Chen et al., 2000; Sorrel, 2001; Ngamskulrunroj et al., 2012). Estudos indicam que *C. gattii* é menos sensível a fluconazol e outros antifúngicos empregados para tratamento da criptococose em relação a *C. neoformans*, porém, a extensão desse fato, bem como o mecanismo e a origem da resistência, ainda estão por ser esclarecidos (Gomez-López et al., 2005). Esta espécie, além de apresentar características epidemiológicas distintas de *C. neoformans*, desenvolve formas clínicas que podem necessitar de abordagem terapêutica mais agressiva (Heitman e Casadevall, 2012).

Alguns estudos demonstram que alterações morfológicas são mecanismos utilizados para o sucesso da infecção por isolados polimórficos de *C. neoformans*. A ocorrência de alterações morfológicas nessa espécie dá-se pelo aumento de tamanho celular ou pela formação de pseudofilamentação. O aumento do tamanho celular de *C. neoformans* dificulta a fagocitose e pode estar relacionada à virulência e cronicidade da infecção (Feldmesser et al., 2001, Zaragoza et al., 2010, Magditch et al., 2012; Okagaki et al., 2010; Okagaki et al., 2012; Bouklas et al., 2013). As células titãs formam blastoconídios de tamanho normal e apresentam velocidade alta (20 a 50 m/h)

de formação e expulsão. Supõe-se que o desenvolvimento de células titãs possa estar relacionado ao ciclo celular, desde que, por algum motivo não ocorre fissão, fazendo com que essas células apresentem tamanho maior e produzam células-filhas normais (Zaragoza et al., 2010). Embora estas células já tenham sido descritas como tetraploides e octoploides e tenham maior quantidade de DNA em sua formação, se comparada às células normais, os mecanismos moleculares envolvidos permanecem desconhecidos (Okagaki et al., 2010).

A presença de polimorfismo, em particular, a formação de células titãs está relacionada à cronicidade da infecção criptocócica e, portanto, uma ferramenta de virulência em *C. neoformans*. Essas células possuem múltiplos vacúolos e maior resistência quando submetidas a stress oxidativo e nitrosativo (Okagaki et al., 2010). As células titãs nunca são observadas dentro de fagócitos, presumidamente, devido ao seu tamanho, por outro lado, as células anãs são encontradas com frequência nessa situação (Okagaki et al., 2010). Cruickshank e colaboradores (1973) observaram, pela primeira vez, células titãs (~50 µm) em amostra de um paciente, para o qual o diagnóstico etiológico foi difícil devido à ocorrência de morfologia atípica. A partir desse relato, alguns trabalhos indicaram presença de tais formas em amostras clínicas (Cruickshank et al., 1973; Love et al., 1985; Wang et al., 2014).

O polimorfismo encontrado neste estudo foi o de formação de células titãs e, mesmo frente à escassez de relatos de frequência de polimorfismo, pode-se supor que esta seja a forma de atipia mais, comumente, encontrada. A distribuição de isolados polimórficos segundo gênero dos pacientes seguiu a mesma distribuição da micoteca, em que a maioria dos pacientes é do gênero masculino (dados não mostrados).

A frequência de polimorfismo foi considerada baixa (4%) ainda que não haja, na literatura consultada, informações sobre ocorrência em isolados de coleções. Desse modo, não é possível comparar os resultados obtidos com os de outros autores. Os 3 isolados não confirmados como polimórficos pelo

Centro de Referencia Instituto Nacional de Salud Carlos III deve-se à questão metodológica. O centro em questão executa distintos testes para confirmar o polimorfismo, como inoculação *in vivo*, conferindo maior confiabilidade aos resultados.

Neste estudo, foi descrita, pela primeira vez a presença de células titãs em isolados provenientes de sangue, indicando que essa estratégia de virulência do agente etiológico da criptococose manifesta-se no sistema circulatório que possui condições de estimular e manter desenvolvimento de polimorfismo.

Do mesmo modo, foi inédito o encontro de gigantismo em isolados provenientes de LCR. Grande atenção deve ser dada a este achado, desde que um estudo experimental *in vivo* indicou que, se por um lado células titãs eram menos fagocitadas pelos macrófagos pulmonares no processo inicial da infecção levando à maior sobrevivência de *Cryptococcus* spp. em pulmões, por outro lado, seu tamanho impedia disseminação para o sítio principal da doença, o sistema nervoso central (Zaragoza et al., 2010). Contrapondo a esse achado experimental, dos sete isolados polimórficos por gigantismo, seis deles foram provenientes de LCR. Outros estudos experimentais deverão contribuir para desvendar a patogênese relacionada à presença de células titãs.

A ferramenta de microscopia eletrônica permitiu verificar diferenças na espessura da parede celular, conforme descrito em trabalhos anteriores (Zaragoza et al., 2013). As células titãs haviam sido caracterizadas como tendo parede celular medindo de 2 a 3 μm de espessura, ou seja, 20 a 30 vezes maior do que as células normais (Zaragoza et al. 2010). No entanto, não foi constatado, no presente estudo, relação direta entre presença de gigantismo e espessamento da parede, indicando que esse processo nem sempre ocorre. No entanto foi possível perceber variação de densidade da cápsula mucopolissacarídica (dados não mostrados) nos isolados provenientes das células polimórficas, quando comparados as células com características normais. As paredes celulares das células polimórficas não parecem ser mais

espesas do que as células de tamanho regular, pois não foi observada diferença na conformação da parede celular dos isolados polimórficos, quando comparados com os demais isolados. Esta observação em desacordo com a literatura pode estar relacionada com a origem das células. Neste estudo a observação foi feita em células oriundas de amostras de LCR, distinta daquela feita a partir da análise de tecido pulmonar ou cerebral (Love et al., 1985; Wang et al, 2014). No entanto, como o achado de titãs em LCR e sangue é, segundo literatura consultada, um dado inédito, outros futuros estudos são necessários para confirmar essa suposição.

A espessura da parede celular não depende apenas do volume celular, mas também é proporcional ao tempo de infecção, desde que, após a inoculação em animais a razão parede/célula aumenta já nos primeiros 5 minutos (Feldmesser et al., 2001). Uma das hipóteses para o espessamento da parede celular pode ser a formação de melanina, que pode ser verificada durante o curso infeccioso em modelo animal (Nosanchuk et al.,1999).

A distribuição de melanina na parede celular não se relacionou, diretamente, com a espessura da mesma e, também, não foi mais intensa nas células titãs estudadas, em relação às células regulares do mesmo isolado. A produção de melanina em células titãs ainda não foi averiguada, anteriormente, com metodologia e número adequado de isolados de modo a se ter um dado conclusivo e, portanto, merece maior investigação para certificação de que a melanização é, ou não, incrementada durante o processo de gigantismo.

A melanização tem a função de escudo, protegendo a célula de substâncias antimicrobianas e da ação do sistema imunológico (Wang e Casadevall, 1994; Wang et al.,1994; Wang et al., 1995; Rosas e Casadevall., 1997; Feldmesser et al., 2001). Além da ação da anfotericina B sobre o ergosterol da membrana fúngica, outro modo de ação do fármaco foi demonstrado em 1994 por Martin et al. que mostraram que monócitos e macrófagos pulmonares humanos, quando pré-incubados com doses baixas de anfotericina B, têm capacidade de fagocitose aumentada para *Candida*

albicans. Desse modo, anfotericina B parece ter efeito imunoestimulante, aumentando a agregação e aderência dos leucócitos polimorfonucleares (Brajtburg e Bolard,1996). Os isolados melanizadas são menos suscetíveis à atividade antifúngica de fármacos como anfotericina B e caspofungina, peptídios microbicidas, radiação ultravioleta e são termotolerantes (Wang e Casadevall, 1994; van Duin et al., 2002; Doering et al., 1999; Rosas e Casadevall, 1997; Nosanchuck et al, 2003).

A importância da melanina como fator de virulência é enfatizada na maioria dos estudos sobre a biologia do agente da criptococose (Reolon et al., 2004). O surto que ocorreu na ilha de Vancouver, Canadá, no início desta década, mostrou a necessidade estudos detalhados para melhor compreensão da patobiologia de *C. gattii*, como importante patógeno emergente. Um dos vários estudos sobre o evento revelou que a cepa predominante era de um subtipo molecular com maior virulência e formação de melanina, do que a provável cepa parental (Fraser et al., 2005; Ngamskulrungrroj et al., 2009, Byrnes et al., 2010).

A produção de melanina em *Cryptococcus* spp. usa catecolaminas como substratos exógenos, como os neurotransmissores dopamina, epinefrina e norepinefrina e, portanto, a produção desse fator de virulência pode explicar o tropismo desse agente pelo sistema nervoso central, onde existe alta concentração dessas substâncias (Polacheck et al., 1982, Casadevall et al., 2000). Em *C. neoformans* e em outros organismos, a via alternativa de degradação pelo precursor di-hidroxi-fenilalanina (L-DOPA) ocorre por uma enzima lacase e outras proteínas acessórias, das quais os componentes genéticos ainda não foram totalmente elucidados e, por isso, têm sido alvo de diversos estudos (Lee et al., 1996; Walton et al., 2005).

A análise por MET permitiu a observação de duas ou mais camadas de aparências distintas distribuídas de forma concêntrica. As camadas mais eletrodensas parecem compactas e organizadas em fibras, paralelamente alinhadas, em relação à membrana plasmática, enquanto as camadas menos

eletrodensas se encontram mais externamente, relacionada com a cápsula (Doering et al., 2005, Mandal et al., 2007, Doering et al., 2009). Esta organização parece estar relacionada a concentração dos compostos da parede celular como alfa 1-3 glucana que estaria localizada na camada menos eletrodensa, ou mais externa. Já os demais componentes como a quitina, quitosana e manoproteínas estão distribuídos em toda parede celular, desde as camadas mais próximas a membrana celular (Reese et al., 2007; Doering et al., 2009). Quando cultivados em meio de cultura com compostos fenólicos, é possível observar ainda, as camadas concêntricas e pigmentadas, que estão associadas a presença e distribuição da melanina (Chasakes et al., 1975, Willianson et al. 1997; Wang et al., 1995; Walton et al., 2007).

Isolados de *C. neoformans* com mutações genéticas relacionadas ao gene *CNLAC1*, apresentam células desprovidas de pigmentação, devido ausência de produção de lacase e, ainda, com parede celular menos espessa mesmo quando expostas a compostos fenólicos, como L-DOPA (Wang et al., 1995; Willianson, 1997; Mandal et al., 2007). A parede celular tem alta estabilidade, dinâmica e capacidade de remodelamento e, por isso, as células-mãe de *C. neoformans* possuem parede celular maior e com camadas mais espessas de melanina, em relação às células filhas (Eisenman, et al., 2005).

Alterações morfológicas de *C. neoformans* em meio contendo compostos fenólicos, caracterizadas pela ocorrência de colônias lisas brilhantes ao lado de outras mais secas foi sistematicamente notado neste estudo. Constatou-se que as colônias com grande quantidade de células titãs tinham aspecto mais mucóide, assim como eram mais melanizadas, do que aquelas com células de tamanho normal. A aparência mais mucóide pode ser relacionada ao tamanho da cápsula que, em células titãs, foi relatada como maior em relação às células de diâmetro regular. As células titãs apresentam cápsula densa na região mais próxima à parede (Okagaki et al., 2010). A coloração mais clara pode ter a mesma explicação, desde que a cápsula mucopolissacarídica é incolor e sobrepõe-se à camada de melanina presente na parede celular, esmaecendo a

cor acastanhada conferida pela mesma. Por outro lado, a formação de pseudofilamentação não parece influenciar o aspecto das colônias, desde que, estas formas foram encontradas em colônias mais claras (mais mucoides) e escuras (menos mucoides). Esta informação pode ser útil na triagem de colônias de células titãs, em culturas após plaqueamento em ágar, com vistas a maiores estudos dessa população.

A maioria dos isolados polimórficos exibiu baixa melanização quando semeados em ágar L-DOPA e foi notável a ocorrência simultânea de dois padrões de melanização (alta e baixa) em colônias de 2 isolados. A melanização é uma arma de virulência contra ação oxidativa do hospedeiro. A ocorrência de tais alterações fenotípicas em *C. neoformans*, colônias lisas brilhantes ao lado de secas, foram associadas a distintos perfis de virulência que podem ter implicação clínica, confirmando a relevância desse achado (Fries et al., 1999). Desde que, todos os isolados polimórficos estavam conservados há anos em coleção de cultura e mantidos em meios abióticos, não foi surpreendente a pouca produção de melanina.

Do mesmo modo, neste trabalho foi possível observar distintos perfis de distribuição de camadas e, conseqüentemente, diferentes aspectos de melanização dos isolados de *C. neoformans* crescidos no meio de cultura com L-DOPA. Os isolados polimórficos, quando comparados aqueles contendo apenas células de tamanho regular, não foram diferentes quanto à distribuição de melanina, assim como, em relação à espessura da parede celular. No entanto, futuros estudos dirigidos à determinação da composição bioquímica e estrutural da parede celular e, sobretudo, sua relação com a cápsula mucopolissacarídica, podem auxiliar na compreensão da associação entre melanização e aspecto mucóide, observado nos distintos morfotipos.

Foi verificada também ocorrência de pseudofilamentação, ainda que em menor frequência em relação ao polimorfismo por gigantismo. A formação de pseudohifas, muito bem estudada em membros do gênero *Candida*, faz parte da patogênese da infecção por *Cryptococcus* spp. e a presença de

pseudofilamentação, curiosamente, sempre estiveram associadas à presença de células titãs nos isolados estudados neste trabalho. Estudos prévios não indicaram presença desse fenômeno em cultura, mas apenas *in vivo*, em amostras clínicas, incluindo as de urina, tecido de pele, fígado, cérebro e pulmão foram descritas (Kimura et al., 1998; Gazzoni et al., 2010). Interessante que somente 2 estudos prévios, sendo um de nosso grupo, indicam a formação *in vivo* de pseudofilamentação em amostras de LCR (Paschoal et al., 1997; Bava et al., 1998).

Em 1975 foi relatada a interação de formas em filamentação de *C. neoformans* com ameba *Acanthamoeba polyphaga*, um dos predadores naturais da levedura. Foi comprovado que células de *C. neoformans* na forma de pseudofilamentação são menos fagocitadas por outras amebas (*Acanthamoeba castellanii*) do que as formas leveduriformes convencionais. Nesse estudo, a pseudofilamentação foi a única estrutura fúngica que não pode ser fagocitada e digerida pelas amebas. Desse fato, conclui-se que essa é uma forma desenvolvida pelo fungo para assegurar sua maior sobrevivência no meio ambiente e dentro do hospedeiro (Neilson et al., 1978). Entretanto, baixa virulência destas formas em filamentação foi observada quando as mesmas foram submetidas a testes *in vivo* (Fries et al., 1999). O mesmo grupo publicou um estudo com animais de experimentação inoculados com isolados contendo apenas de blastoconídios. Estes animais adoeceram dentro das duas primeiras semanas, enquanto que a maioria dos animais inoculados com isolados contendo pseudofilamentação permaneceu saudável durante o mesmo período, adoecendo apenas alguns animais após esse período (Fries et al., 2001).

A caracterização molecular dos isolados polimórficos indicou concordância na distribuição de isolados com células regulares, desde que, a prevalência de VNI é maior, em regra, ao redor do mundo (Meyer et al., 2003; Trilles et al., 2008; Cogliati et al 2013). Uma publicação recente, revisando mais de 68 mil isolados de *Cryptococcus* spp., permitiu constatar que VNI é o subtipo molecular mais frequente em todo o mundo; a exceção é representada pela

Austrália e Papua Nova Guiné cuja frequência maior é de VGI. O subtipo VNII, bem como híbridos *C. neoformans/C. gattii*, foram considerados raros, porém, são descritos em todos os continentes. Nos Estados Unidos e Europa, os subtipos VNIII e VNIV apresentam frequência maior do que aquelas observadas em outras partes do mundo, enquanto o subtipo VNB, até então considerado endêmico do Sul da África, foi isolado também no Brasil e Colômbia. O tipo VGI foi encontrado em menor porcentagem na Ásia, Américas, Europa e África. Dentre *C. gattii*, o subtipo VGII, apresenta alta frequência em isolados da Austrália, Brasil, Colômbia, e Porto Rico, enquanto o subtipo VGIII tem sido detectado com alta frequência no Sul da Califórnia (Estados Unidos), além ser encontrado no México, Guatemala, Colômbia, Argentina e Brasil (Cogliati et al., 2013). A maioria das cepas isoladas no Brasil pertencem aos genótipos VNI e VGII e, este último, se encontra em maior concentração na região norte e nordeste do país (Meyer et al., 2003).

A relação entre ocorrência de polimorfismo e tipo molecular, do mesmo modo, ainda não foi registrada na literatura, sendo este estudo o primeiro a descrever essas duas características no agente etiológico da criptococose. Do mesmo modo, não há relato prévio da descrição de polimorfismo e tipo conjugante.

MAT alfa como identificado em todos os isolados polimórficos é mais, frequentemente, descrito na literatura mundial. Sob condições ambientais adequadas, a reprodução sexuada ocorre pela conjugação das células e consequente formação de hifas dicarióticas com grampos de conexão. Os basidiósporos são formados, sobretudo, na porção terminal das hifas e produzem longas cadeias de esporos MAT-a e MAT-alfa (Kwon-Chung, 1976). Interessante observar que a reprodução sexuada pode ser observada também entre isolados de mesmo tipo conjugante e ocorre, predominantemente, em isolados MAT-alfa (Wickes et al., 1986). Supõe-se que a conjugação entre mesmos tipos sexuais ocorra na natureza, o que pode explicar a maior proporção de frequência de MAT-alfa em isolados clínicos tanto de *C.*

neoformans quanto de *C. gattii* (Oliveira et al., 2004; Fraser et al., 2005, Trilles et al., 2008).

Alguns estudos, realizados com métodos moleculares de análise do agente etiológico, evidenciam que as recidivas ocorrem pela cepa inicial e não por uma nova cepa (Casadevall e Perfect, 1998; Brandt et al., 1996). Questiona-se se a cepa infectante desenvolveu resistência após a exposição prolongada à fármaco (resistência adquirida) ou se houve seleção de células resistentes, presentes na amostra inicial. A recidiva em criptococose, observada na fase de manutenção, é um desafio para o controle da doença e pode ser interpretada como resistência clínica ao fluconazol (Alves et al., 1997; Datta et al., 2003; Rodrigues-Tudela et al., 2007; Rodrigues-Tudela et al., 2008). De modo geral, a baixa suscetibilidade ao fluconazol, ou outro antifúngico, em amostras clínicas iniciais de *Cryptococcus* spp. não foi, amplamente, investigada, se comparada aos estudos em *Candida*, mas de modo geral, são relatados baixos valores de MIC de fluconazol (Brandt et al., 2001; Casadevall e Perfect, 2002).

Dado um determinado resultado de sensibilidade a antifúngico em cepas clínicas, expresso em valores de MIC, busca-se a interpretação desse dado para uso na terapia. A classificação dos valores de MIC de determinado fármaco frente a um agente etiológico é feita por *breakpoint* e, para o gênero *Cryptococcus* spp. ainda não foi determinado. Em 1997, o subcomitê de testes antifúngicos do CSLI propôs *breakpoints* para interpretar MICs de fluconazol apenas contra isolados de *Candida* spp. e, desde então, esses valores vêm sendo atualizados e incorporados aos documentos da série M27. Ainda que não indicados, os valores recomendados para *Candida* spp. têm sido aplicados para *Cryptococcus* spp. (Rex et al., 2001). De outra forma, MIC ≥ 16 mg/L, como indicado por Aller et al. (2000), sugerem resistência de *Cryptococcus* spp. ao fluconazol, desde que, os autores verificaram certa correlação desses valores com falência clínica.

A emergência de resistência em pacientes com AIDS e CSNC (criptococose em sistema nervoso central), submetidos à terapêutica com fluconazol por longos períodos, é relatada em poucos trabalhos (Paugam et al., 1993; Birley et al., 1995; Armengou et al., 1996; Berg et al., 1998). Outros estudos não evidenciaram o mesmo fato em amostras seriadas, descrevendo, claramente, o surgimento de resistência ao azol (Casadevall et al., 1993; Brandt et al., 1996; Witt et al., 1996). Coutinho (2006) estudando amostras brasileiras de *C. neoformans*, verificou que a exposição *in vitro* à dose de 8 µg de fluconazol induz aparecimento de colônias com MIC superior ao da colônia inicial. Essa resistência, no entanto, foi transitória, desde que, após remoção do fármaco, a grande maioria dos isolados (89%) voltou a apresentar o perfil de sensibilidade da amostra original. Isolados analisados por Mondon *et al.* (1999) e Yamazumi *et al.* (2003) também reverteram ao fenótipo sensível inicial, após passagem em meio de cultura sem fluconazol. Hsueh et al. (2005) descreveram apenas 3 (4%) isolados de *C. neoformans* com MICs de fluconazol > 16 mg/L. Yildiran *et al.* (2002) estudaram 213 isolados de *C. neoformans* de LCR frente a fluconazol, em período de dez anos, e encontraram MIC₅₀ e MIC₉₀ de 2 mg/L a 8 mg/L.

Em relação à suscetibilidade de isolados polimórficos, com amplo intervalo para fluconazol e menor para anfotericina B, é impossível ser feita qualquer comparação com dados de literatura, pela razão de que esses são os primeiros relatos sobre esse grupo de cepas, segundo revisão bibliográfica realizada. Os valores de MIC de fluconazol foram altos (≥8mg/L) frente a quase metade (42,8%) dos isolados polimórficos. Deve ser lembrado, no entanto, que ainda não há qualquer correlação entre dados *in vitro* de MIC e falha clínica (Dannaoui et al., 2006). Portanto, a interpretação desses valores é bastante difícil, pois não há *breakpoints*, ou pontos de corte para sua aplicação clínica que possam distinguir isolados resistentes e isolados sensíveis relacionados, respectivamente, à falha ou sucesso clínico com tratamento com fluconazol.

A resistência primária de leveduras ao fluconazol pode ser um fenômeno emergente e menor sensibilidade de *Cryptococcus* spp. ao fluconazol pode ser devida a: efluxo de fármaco mediado por proteínas de membrana; permeabilidade reduzida da membrana resultando em alterações na composição do esterol, com conseqüente menor captura da fármaco pelos fungos; mutação na enzima alvo-14 alfa demetilase-do citocromo P 450, resultando em diminuição da ligação com azóis; superprodução da enzima-alvo através da ação do gene ERG-11, entre outros responsáveis pela produção da enzima-alvo (Odds, 1993; Vanden Bossche et al., 1994; Rodero et al., 2001; Posteraro et al., 2003; Rodero et al., 2003).

Sobre anfotericina B, sabe-se que o método de referência, com base em microdiluição, não é ideal para detectar a resistência ao polieno (CLSI, 2008). O método comercial Etest® tem a vantagem de identificar isolados resistentes à anfotericina B, com maior precisão do que os métodos de diluição e, por isso, foi utilizado neste estudo (Pfaller et al. 1998; Vandebossche et al., 2002). Verificou-se que os isolados polimórficos de *C. neoformans* foram inibidos entre 0,023 e 0,25 mg/L de anfotericina B, indicando alta suscetibilidade dos isolados aos polienos. Interessante ressaltar que a alta suscetibilidade desse grupo foi, neste estudo, pela primeira vez documentada e que esse perfil não parece ser diferente daquele relatado em estudos com outros isolados de *C. neoformans*.

Há grande dificuldade de se estabelecer *breakpoints* para anfotericina B por vários motivos: 1) o paciente que necessita dessa medicação, em regra, está em estado grave pela condição de base, contagem de CD4/ CD8 e pelo sitio acometido (por exemplo, sistema nervoso central, sistema circulatório); 2) os resultados de MIC pelos métodos de referência são homogêneos em distintos grupos de isolados, agrupados nos valores entre 0,25 mg/L e 1 mg/L; 3) o teste de MIC avalia a inibição e anfotericina B é fungicida; 4) a mortalidade é alta na população sob uso do fármaco. A interpretação, frente à ausência de *breakpoints*, é difícil, mas sabendo-se que a maioria dos patógenos fúngicos (*Blastomyces dermatidis*, *Coccidioides immitis* e *Histoplasma capsulatum*) é

inibida *in vitro* a concentrações de anfotericina B até 1,0 µg/mL, este valor pode ser considerado como ponto de corte epidemiológico para diversas espécies (Bennett, 1967; Shadomy et al., 1975). Segundo Park et al (2009) valor de 2 mg/L pode ser considerado como proposta de ponto de corte, até que sejam definidos *breakpoints* para cepas de *Cryptococcus* spp. Cepas para as quais os MICs situam-se abaixo de 1mg/L, pode ser consideradas sensíveis. Essa concentração corresponde ao nível sanguíneo obtido durante o tratamento parenteral com o fármaco e, portanto, MICs acima desse valor indicam que as isolados não seriam, em teoria, inibidas pela anfotericina B. Além disso, níveis séricos de anfotericina B, raramente, ultrapassam 2 mg/L, independentemente da dose ou da velocidade de infusão do fármaco (Drutz, 1987).

O maior estudo, envolvendo 1811 isolados de *Cryptococcus* spp. dos cinco continentes, mostrou o MIC de 2 mg/L de anfotericina B em apenas 1% das amostras (Pfaller et al., 2006). Bii et al. (2006) estudando suscetibilidade antifúngica no Kenia, relatou que todos os isolados clínicos de *C. neoformans* eram sensíveis à anfotericina B (MIC₉₀ de 0,5 µg/mL), confirmado achados anteriores da literatura internacional e nacional (Brandt et al., 2001; Hsueh et al., 2005; Pedroso, 2006; Dias, 2006). É notável um trabalho espanhol, realizado com 317 isolados, encontrou MIC de 2 mg/L para 5,3% dos isolados (Perkins et al., 2005). Com exceção destes, há poucos trabalhos citando MICs altos de anfotericina B e, ainda mais raros são aqueles que avaliaram grande número de isolados ao longo de um período de tempo para análise temporal. No Brasil, apenas Strob (2007) fez tal análise, não encontrando nenhum valor de MIC acima de 1 mg/L para 242 amostras do estado de São Paulo no período de 1995 a 1999. Estudos de tendência internacionais foram realizados por Pfaller et al. (2006) que também mostraram que a sensibilidade à anfotericina B permaneceu inalterada dentre os isolados obtidos entre 1990 e 2004. Brandt et al. (2001) analisaram 732 amostras norte-americanas coletadas em dois períodos (1992 a 1994 e de 1996 a 1998) e confirmaram taxas estáveis de MIC, sendo valor de 2 mg/L encontrado em apenas 0,6% das amostras.

Resistência natural à anfotericina B não é observada em *C. neoformans* e a resistência adquirida é fenômeno muito raro (Powderly et al., 1992). Em amostras isoladas de material biológico, alguns mutantes de *C. neoformans* mostraram resistência à anfotericina B. Esses mutantes, geralmente, apresentam alterações na composição dos esteróis nas membranas, com diminuição ou ausência de ergosterol, ou ainda, presença de esteróis modificados, com menor afinidade pelos polienos (Dick et al., 1980; Hadfield et al., 1987; Walsh e Pizzo, 1988; White et al. 1998; Kontoyiannis, 2002). Pierce et al. (1978) encontraram que, quanto maior a concentração de anfotericina B necessária para inibir o crescimento de cepas de *C. albicans*, maior a alteração na concentração de ergosterol e 4 e 14- esteróis metilados. Sokol-Anderson, em 1988, encontrou níveis elevados de catalase em cepas de *C. albicans* resistentes à anfotericina B, o que diminuiria o efeito oxidativo do polieno.

A predição de falha clínica no tratamento da criptococose deveria se apoiar, entre outros parâmetros, na determinação da resistência antifúngica *in vitro* à anfotericina B. No entanto, o exame laboratorial mais usado em microbiologia, o MIC para isolados de *C. neoformans* não permite, ainda, fazer essa correlação. Valores de MIC de anfotericina B para *C. neoformans* necessitam de profunda avaliação e questionamento. Talvez, em breve, possa se decidir pelo abandono desta técnica laboratorial como arma isolada para acompanhar casos de criptococose.

Outras ferramentas foram propostas para verificar a real atividade da anfotericina B sobre *Cryptococcus* spp., entre elas, as curvas de morte, já que a metodologia de referência por microdiluição é reconhecidamente pouco sensível para detecção da resistência (Canton et al., 2004; Arechavala et al., 2009). O teste de curvas de morte expressa a porcentagem de microorganismos mortos produzida por uma concentração fixa do antifúngico em condições pré-estabelecidas, contando-se o número de células viáveis a intervalos periódicos de incubação. Uma vantagem deste teste é que ele

oferece informação da dinâmica no tempo da ação de um antifúngico sobre o agente etiológico. Os gráficos do tipo dose (tempo)-resposta são construídos para ilustrar a diferença entre as contagens das amostras segundo os distintos períodos de incubação. Por outro lado, como o método de curvas de morte requer muito trabalho laboratorial, o número de concentrações antifúngicas avaliadas e o número de amostras para os ensaios devem ser otimizados.

A escolha da concentração da anfotericina B, para os testes de curvas de morte, é primordial já que deve ser representativa daquela alcançada em doses terapêuticas nos locais de infecção (Turnidge et al., 1994; Klepser et al., 1997a; Klepser et al., 1997b; Klepser et al., 1998a; Klepser et al., 1998b). Podem, ainda, ser realizados ensaios com várias concentrações do fármaco, como fizeram Klepser et al. (1997b;1998b) que estudaram a atividade de anfotericina B contra isolados de *C. neoformans* usando essa variação no método. A concentração do inóculo é outro parâmetro de reação que, em testes de eficácia de fármaco, tem grande influência nos resultados. Burgess e Hastings (2000) comparando dois tipos de inóculos: 10^3 ufc/mL e 10^5 ufc/mL, demonstraram que o efeito fungicida foi maior em concentrações quatro vezes maiores que o MIC para o inóculo menor e oito vezes maior que o MIC para o inóculo maior. A concentração de anfotericina B, assim como o do inóculo, é importante para os testes de curvas de morte, comprovado inicialmente por Klepser et al. (1997b) que relataram atividade fungistática de anfotericina B contra *Candida albicans*, em concentrações equivalentes à metade do valor do MIC, e efeito fungicida, em concentrações ao dobro do MIC. Burgess e Hastings (2000) e Keele et al. (2001) confirmaram que anfotericina B é fungistática para *C. neoformans* em concentrações, menores ou igual ao MIC, enquanto as concentrações superiores às do MIC tornam o polieno fungicida para isolados clínicos de *C. neoformans*.

Neste estudo, foi usada concentração de anfotericina B de 1 mg/L que superou muitas o MIC dos isolados. Mesmo com esta concentração não foi observada relação com MIC, i.e., o efeito fungicida não foi maior em isolados

com menor MIC ou menor em isolados com maior MIC. E para isolados com mesmo valor de MIC, o tempo para efeito fungicida foi distinto. Isto indica, novamente, que o MIC, obtido pelo método de microdiluição, não é útil para separar isolados com sensibilidades distintas à anfotericina B em concordância a outros autores (Rex et al., 1995; Ernst et al., 2000). A maioria (>80%) dos isolados polimórficos morreram até 12 h de exposição frente à 1 µg/mL de anfotericina B e essa dinâmica parece ser similar à descrita para outros grupos de isolados (Klepser et al., 1998b; Nooney et al., 2005; Pappalardo et al., 2009).

Entretanto, até o momento, não existe significado clínico para achados de curvas de morte, devendo-se investigar se os isolados que permaneceram vivos após esse período podem produzir infecção mais refratária ao tratamento do que aqueles que aqueles com morte às 6 h ou 12 h.

O grupo argentino contribuiu bastante para a compreensão dos testes de curvas de morte. Rodero et al. (2000a; 2000b) já indicavam as curvas de morte como melhores do que MIC para prever resposta clínica ao tratamento com o polieno. De modo interessante, os autores verificaram isolados que morreram apenas frente a 2 mg/L, e não frente a 1 mg/L em período que variou de 1h a 6 h (Rodero et al., 2000b). Os autores consideraram que esses isolados não poderiam ser enquadrados como resistentes, mas pelos resultados dos testes de concentração fungicida mínima (MFC), alguns deveriam ser classificados como tolerantes. Concluíram, então, que o uso de testes fungicidas permite detectar outras formas de resistência, como tolerância ou persistência e, por isso, sugeriram que essas técnicas são melhores preditores de eficácia de fármacos contra *Cryptococcus* spp. do que MIC.

A característica de tolerância foi aplicada, também, para isolados que apresentaram crescimento após o *endpoint* do teste de curvas de morte. Burgess e Hastings (2000) relataram *regrowth* de colônias, definido como crescimento após tempo necessário para efeito fungicida (*endpoint*), quando a

concentração de anfotericina B usada nos testes de curvas de morte era de até quatro vezes mais o valor de MIC para o isolado. Esse perfil de tolerância foi também descrito por Rodero et al. (2000a), em testes de curvas de morte, com um isolado de 1 paciente (1/5; 20%), assim como verificado por Pappalardo et al., (2009) em 7 isolados (7/35; 20%) de *C. neoformans* obtidos de pacientes com AIDS. Os autores levantaram a possibilidade da ocorrência desse fenômeno devido a vários fatores, entre eles, a degradação do fármaco ou desenvolvimento de resistência *in vitro*. Dado que testes com isolados tolerantes e não tolerantes foram repetidos, com resultados idênticos, afasta-se a hipótese de degradação do fármaco, optando-se pela possibilidade de resistência, a ser confirmada em estudos experimentais com animais murinos. No caso de anfotericina B, as curvas de morte podem indicar isolados com maior poder de resistência à processos oxidativos, visto que a ação fungicida é relacionada a processo de oxidação celular, além da perda de ergosterol da membrana. De encontro à essa informação, sabe-se que isolados polimórficos contendo células titãs podem tolerar danos oxidativos e nitrosativos do hospedeiro (Okagaki et al., 2012). Assim, justifica-se o encontro, neste estudo, de isolado polimórfico tolerante à anfotericina B, supondo-se que tais células possam ser menos sensíveis à ação desse fármaco. No entanto, essa hipótese está por ser avaliada e comprovada *in vitro* em estudos com maior número de isolados tolerantes polimórficos (Okagaki et al., 2012).

A ocorrência de tolerância à anfotericina B também foi verificada, neste estudo, em cepa da primeira amostra de LCR de 1 (1/7; 14,3%) paciente hospitalizado. Com a exposição de 1 mg/L de anfotericina B, o *endpoint* foi às 6 h, mas o isolado apresentou crescimento após 72 h de incubação. Frente a esse resultado, os testes de curvas de morte foram realizados também com os isolados obtidos da 2^a e 3^a amostra de LCR desse paciente (resultados não mostrados), observando-se que a cepa isolada da 3^a amostra sofreu ação fungicida apenas após 48 h. Esse padrão comportamental não foi observado em isolados de nenhum outro paciente. Importante ressaltar que esse paciente,

após o término desta fase do estudo, foi a óbito. Alguns estudos mostraram boa correlação dos resultados das curvas de morte com a evolução clínica, auxiliando na supervisão da terapia (Rodero et al., 2000b; Keele et al., 2001; Ernst et al., 2002, Pappalardo et al., 2009).

Ainda que outros fatores devam ser levados em conta, a relevância do fenômeno de tolerância *in vitro* verificada neste caso, não pode ser subestimada. Alguns parâmetros de mau prognóstico em CSNC são conhecidos antes da era AIDS e, ainda estão sob estudo (Diamond e Bennett, 1974; Bauer et al., 2012). Outros fatores que determinam a falha terapêutica incluem a farmacocinética do antifúngico usado, fatores individuais do hospedeiro, doença de base e sítio de infecção; a baixa ou ausente suscetibilidade do agente etiológico à medicação é um dos elementos que contribuem para a resistência clínica (Perea e Patterson, 2002). Quando a micose é associada à AIDS, por exemplo, outros fatores tendem a piorar ainda mais a evolução clínica do paciente e, entre estes, a suscetibilidade da cepa infectante pode ser preponderante. Esses dados sugerem que pesquisas com anfotericina B em curvas de morte devem ser mais bem exploradas no tratamento e seguimento de infecções causadas pelo *C. neoformans*, tanto em estudos animais quanto em humanos.

Em relação à criptococose, grupos norte-americanos e europeus têm se empenhado em melhorar a sensibilidade dos testes *in vitro*, são somente para anfotericina B mas, também, para outros fármacos no intuito de conhecer o perfil de sensibilidade de seu principal agente, *C. neoformans*, para guiar o tratamento clínico (Cuenca-Estrela et al., 2001; CLSI , 2008). O número de estudos que têm estabelecido o valor da sensibilidade antifúngica como preditor de resposta clínica em pacientes com infecção por *C. neoformans*, como já mencionado, ainda é limitado e, portanto, não é recomendado, rotineiramente, na prática clínica de acompanhamento de pacientes com criptococose associada à AIDS. (Casadevall et al., 1993; Paugam et al., 1993; Birley et al., 1995; Armengou et al., 1996; Rex et al., 2001; Groll e Kolve, 2004). Apesar do

MIC ser uma ferramenta amplamente utilizada para avaliar a eficácia de um determinado antifúngico frente a um isolado clínico, índices que a associam a outros parâmetros são atualmente usados para melhorar a acurácia da resposta clínica. Embora MIC expresse a eficácia de um antimicrobiano sob certas condições *in vitro*, ele não leva em conta outros fatores que contribuem para a evolução clínica *in vivo*, como concentrações séricas e tissulares do antimicrobiano, além da carga fúngica que infecta o paciente. Estudos prévios relatam que a utilização do método que emprega um inóculo “paciente específico” permite forte associação entre a resposta *in vitro* e a resposta dos pacientes frente aos fármacos (anfotericina B e fluconazol) utilizados no tratamento da criptococose (Larsen et al., 2007, Larsen et al., 2011). O resultado do teste de inóculo individualizado revela o MIC do fármaco frente a cada cepa isolada ao longo da infecção e, ainda, informa sobre sua viabilidade frente a distintas concentrações de fármaco (MFC).

Este estudo com teste de suscetibilidade com inóculo individualizado iniciou com 15 pacientes, porém, devido a distintos fatores, técnicos ou ligados aos pacientes, apenas 6 casos fizeram parte do trabalho. A logística para este estudo foi, extremamente, difícil. O IAL, onde foram realizados os testes, situa-se ao lado do IIER, mas era necessário que a equipe do laboratório do IIER notificasse, imediatamente, a equipe do IAL para que fossem retirar as amostras de LCR. Uma questão técnica refere-se ao manuseio do LCR, o qual é centrifugado de rotina no laboratório do IIER. Este procedimento é feito para os exames micológicos, e outros inespecíficos, para fins diagnósticos em casos de suspeita de meningite. Para este estudo foi necessária alteração da conduta hospitalar, com a inclusão de um procedimento de repartição da amostra de LCR para envio ao IAL, antes da centrifugação da amostra.

Desde que, o planejamento para o teste de suscetibilidade com inóculo individualizado incluiu amostra de paciente sem tratamento prévio, esta foi mais uma questão a ser resolvida, pois alguns casos eram de recidiva e não podiam ser incluídos neste estudo. Amostras de alguns pacientes tiveram a cultura

quantitativa realizada, mas também tiveram que ser excluídos do estudo, pois foi verificado, posteriormente, que se tratava de casos de recidiva.

Dentre os 15 pacientes, originalmente, convidados para este estudo, 5 apresentaram amostras de LCR com resultado de cultura negativa, impossibilitando a realização do teste e levando a exclusão desses casos.

Todos os pacientes tinham diagnóstico de meningoencefalite por *Cryptococcus* spp. por aglutinação em látex para antígeno polissacarídico ou pela presença de leveduras no LCR. Sabe-se que o teste que detecta antígeno polissacarídico tem maior sensibilidade para diagnosticar a doença e, por isso, a cultura pode dar resultado negativo (Bicanic et al., 2005). De modo similar, o exame direto de LCR é um método com maior sensibilidade do que a cultura, o que pode justificar a ocorrência de cultura negativa em amostra positiva por tinta da China (Bicanic et al., 2005). A sensibilidade do exame direto com tinta da China é maior do que a obtida no método de isolamento em cultura, desde que podem ser vistas células inviáveis que não crescem em cultura e, além disso, a alíquota do LCR semeado pode não ser representativa deste material, desde que o número de células pode ser extremamente baixo.

Outros 4 pacientes foram eliminados do estudo devido à falha no seguimento clínico ou óbito antes do 14º dia de tratamento. O óbito precoce, descrito em taxa de 17%, pode ser atribuído à criptococose ou outras doenças associadas ao vírus HIV que realça a importância dessa grave micose em pacientes com AIDS (Jarvis et al., 2013). Se a ocorrência de óbito ou recidiva são devidos a fatores inerentes ligados diretamente ao hospedeiro com AIDS ou às características de virulência das amostras de *C. neoformans*, é um dos grandes questionamentos da prática médica, ainda sem resposta.

Outra questão que demandou atenção no planejamento deste estudo foi o tempo decorrido entre a coleta de LCR e o processamento no IAL. A cultura quantitativa deve ser realizada o mais rápido possível, de modo, a revelar a carga fúngica real existente no LCR, antes que o agente etiológico se multiplique, alterando esse parâmetro. Algumas amostras não puderam ser

transferidas entre os institutos imediatamente e os respectivos pacientes foram excluídos do estudo, por esta razão.

A carga fúngica determinada pela cultura quantitativa (procedida no IAL) e a contagem de blastoconídios no quimiocitológico (realizada no hospital) não são correlacionadas e, portanto, a utilidade do exame da rotina hospitalar é limitada. Essa observação motiva a futuros estudos com controle de variáveis (p.ex. centrifugação da amostra, tempo para início do exame quimio-citológico, analista, calibração de equipamento e acessório) para melhor determinação do valor da contagem de blastoconídios no LCR como ferramenta de prognóstico clínico. No estudo de Vidal et al. (2013) foi ressaltada a importância deste exame na rotina clínica de pacientes com CSNC.

Os dados clínicos e laboratoriais dos casos dos quais foram avaliados os agentes da criptococose foram compilados e mostrados para melhor caracterização da população, de forma descritiva. Todos os pacientes eram portadores do vírus HIV, em acordo ao fato desta micose ser altamente prevalente em imunocomprometidos (Loyse et al., 2012) com carga viral variável de dezenas de milhares de cópias virais até indetectável. Todos estavam infectados, com exceção de um caso, com o genótipo VNI *mating type alfa* como é descrito na maioria dos pacientes com AIDS no Brasil (Trilles et al., 2008).

Os casos deste estudo apresentavam, como descrito na literatura, celularidade baixa, para linfócitos CD4/CD8 pela infecção por HIV e pressão intracraniana alta (Apêndice 2), pela criptococose. Tão importante quanto o tratamento antifúngico, é o tratamento da hipertensão intracraniana (pressão intracraniana >250 mm H₂O). Quanto mais cedo ela for descoberta e tratada, melhor é o prognóstico do paciente (Vidal et al., 2012; Carlson et al., 2014).

A ocorrência em sítio extraneural foi notória, ocorrendo na maioria dos pacientes, critério de mau prognóstico na criptococose (Jarvis et al., 2013). Entretanto, esse parâmetro de indiscutível valor clínico não aparece ser tão utilizado pelo corpo clínico, desde que, menos da metade dos casos foi

submetida à pesquisa do fungo em urina e apenas 4 dos 6 casos tiveram procedimentos para hemocultura para fungos. As culturas positivas de sangue indicando disseminação pela corrente sanguínea do agente da criptococose foram associadas à lesão de pele resultante desse processo, ressaltando a gravidade do quadro nesses pacientes. Fungemia é, provavelmente, um importante degrau no desenvolvimento e na persistência da meningoencefalite. Sua ocorrência sugere que *C. neoformans* no sangue pode contribuir para reinfecção subsequente do sistema nervoso central, uma hipótese defendida por dados obtidos no estágio inicial da infecção em modelo de criptococose murina (Lortholary *et al.*, 1999).

Todos pacientes deste estudo receberam tratamento com antifúngicos, segundo *guidelines* internacional e nacional, com exceção de um sob uso concomitante de anfotericina B e 5-fluorocitosina (Perfect *et al.*, 2010). As diretrizes norte-americanas para o manejo de criptococose também endossam terapia combinada de anfotericina B com 5-fluorocitosina, visando a rápida esterilização do LCR (Saag *et al.*, 2000; Bicanic e Harrison, 2004; Dromer *et al.*, 2007). Porém, a inexistência de anfotericina B lipossomal, forma menos tóxica do que a de desoxicolato, na rotina do sistema único de saúde (SUS), assim como a indisponibilidade de 5-fluorocitosina no Brasil levou, provavelmente, à busca de condutas terapêuticas alternativas e associações de medicamentos mais adequados à realidade de hospital público.

O acompanhamento da eficácia do tratamento antifúngico e a vigilância da resistência em isolados clínicos podem ser acessados por testes de suscetibilidade e a determinação do MIC é, ainda, a ferramenta mais usada para tal. A realização de testes de suscetibilidade antifúngica contra isolados sequenciais, obtidos de pacientes de criptococose sob terapia antifúngica, pode ser útil. O aumento nos valores de MIC, verificada no monitoramento de pacientes pode indicar o desenvolvimento da resistência na cepa original, sugerindo prognóstico ruim se mantida a mesma conduta terapêutica (Rodero *et al.*, 2000a). Não foi verificado aumento significativo no valor de MIC de

fluconazol ou anfotericina B, por método de Etest®, em amostras sequenciais de mesmo paciente, ainda que sob tratamento com essas medicações.

Embora pontos de corte ainda não estejam definidos para os fármacos frente a isolados de *Cryptococcus* spp., foram observados valores altos para fluconazol (≥ 16 mg/L), tanto por Etest® quanto por método do inóculo individualizado (≥ 20 mg/L) na maior parte (4/6; 66,7%) dos casos. Os isolados referentes aos dois pacientes que apresentaram maior e menor carga fúngica inicial foram o que apresentaram valores diferentes de MIC entre as duas metodologias o que pode mostrar baixa linearidade do método de inóculo individualizado nas faixas extremas de valores. Para o método de macrodiluição, a concentração de inóculo recomendada é de 10^3 ufc/mL (CLSI, M27-A3, 2012). No caso do paciente 2, o inóculo utilizado na macrodiluição foi muito mais alto do que este valor ($8,8 \times 10^5$ ufc/mL). Este, portanto, pode ter sido a causa de discrepância de resultados, desde que, o teste pode ter sido realizado fora da faixa de linearidade. Trabalhos mais antigos de Rodriguez-Tudela et al. (1995) indicaram que concentrações acima de 10^5 cél./mL podem influenciar, significativamente, no resultado de MIC; em tempo, esse foi o estudo base para o desenvolvimento do método AFST- EUCAST.

Quanto à anfotericina B, os MICs por Etest® apresentaram maior intervalo de valores (0,002 a 0,032), ainda que valores baixos, em relação à metodologia de inóculo individualizado, na qual os valores foram mais homogêneos e superiores ao Etest®.

Os procedimentos para determinação de MFC produziram resultados previstos para anfotericina B. Sendo este um fármaco fungicida, não foi surpreendente que os resultados de MIC e MFC fossem equivalentes para a maioria dos casos (66,7%). Para isolados de apenas 2 pacientes, o MFC foi de 1,5 mg/L e MIC foi de 0,5, diferença esta irrelevante.

Do mesmo modo, os procedimentos para determinação de MFC de fluconazol resultaram em dados esperados, sendo encontrados valores altos (100 mg/L a > 500 mg/L) e muito acima do MIC, para todos os isolados. Sabe-

se que fluconazol, assim como os outros azóis, tem ação inicial fungistática e, secundariamente, fungicida. A atividade fungistática ocorre devido a inibição da enzima 14 α -dimetilase, impedindo a conversão de lanosterol em ergosterol, importante esterol presente na membrana celular. A ausência deste componente, conseqüentemente, gera células fúngicas com desenvolvimento ruim (Odds et al., 2003, Perfect et al., 2010; Sudan et al., 2013). Porém o acúmulo de esteróis tóxicos precursores de ergosterol, decorrentes da ação fungistática do fluconazol, leva à morte celular depois de determinado tempo (Odds et al., 2003a, Perfect et al., 2010; Sudan et al., 2013). Em 1994, Scheven e Self descreveram que a ação do fluconazol leva ao acúmulo do esterol metilado precursor do ergosterol na célula fúngica embasando a atividade fungicida do fluconazol, que é alcançada em doses distintas daquelas necessárias para ocorrer ação inibitória. Este fato é importante para a compreensão na clínica médica, sobre a relevância do resgate da imunidade e/ou doença de base do paciente sob tratamento com fluconazol para o sucesso terapêutico.

A associação de fármacos para tratamento antifúngico visa diminuição da dose e conseqüente efeitos colaterais, em particular da anfotericina B, menor ocorrência de resistência, como no caso da 5-fluorocitosina e uso otimizado de medicamentos (Schaffner e Bohler, 1993). A avaliação da eficácia das combinações antifúngicas é realizada através de estudos clínicos, em modelos animais e estudos *in vitro* (Serena et al., 2005; Serena et al., 2007). A avaliação *in vitro* da ação combinada de fármacos é importante para determinar interação. Vários modelos experimentais existem para medir o efeito de combinações de antimicrobianos (Odds, 2003b). Um dos mais conhecidos e simples é o que emprega um conjunto bidimensional de concentrações seriadas de dois fármacos. O termo “tabuleiro de xadrez” a esse arranjo de tubos, ou de poços de microplacas, preenchidos com múltiplas concentrações de cada um dos dois antifúngicos. Os resultados permitem calcular o chamado índice de concentração inibitória fracionada (FICI) (Odds, 2003b; Johnson et al., 2004).

Dada a importância de 5-fluorocitosina, foi realizado o teste de xadrez com este fármaco e anfotericina B e os resultados indicaram interação indiferente para 3 casos e antagonismo para 3 casos. O paradigma é o uso de anfotericina B com 5-fluorocitosina, que demonstra ser sinérgico em *C. neoformans*, tanto em modelos animais quanto em testes *in vitro*, sendo também observada em pacientes com CSNC (Sugar et al., 1995). A possível explicação para este achado inesperado é o emprego, no teste do xadrez, de inóculo individualizado que poderia ter interferido na interação dos 2 fármacos.

Dentro da linha de otimização de fármacos, em terapia combinada, foi avaliado o inóculo individualizado para determinação da concentração relevante *in vitro* (RivDC) de anfotericina B (Bauer et al., 2012). Foram observados valores de 0,5 mg/L (para 4 casos) a 1,5 mg/L (para 2 casos) capazes de diminuir a carga fúngica até os níveis observados no 14^o de tratamento. A administração de 5-fluorocitosina à maioria dos pacientes poderia, portanto, ser desnecessária, pois a dose sérica, comumente alcançadas em esquemas recomendados de anfotericina B, já seria fungicida (Larsen et al., 2007, Larsen et al., 2011). Estudos clínicos, com base em resultados de RivDC são necessários para confirmar o valor desse parâmetro. Para Groll e Kolve (2004), os métodos para avaliação de sensibilidade a antifúngicos estão sendo continuamente refinados e as relações concentração-efeito *in vivo* e *in vitro* estão sendo, cada vez mais, exploradas. Apesar de tudo isso, as infecções fúngicas invasivas são difíceis de diagnosticar e de tratar e, por isso, novas abordagens devem ser desenvolvidas e colocadas em prática, para manejo dessas infecções (Rex et al., 1997; Groll et al., 2001; Andes, 2003).

A resistência em *C. neoformans*, assim como em outras leveduras, ainda é tema controverso. De fato, os índices de resistência no agente de candidemia, a forma clínica mais estudada entre as micoses invasivas, mostra que o uso amplo do azol na América do Norte deveria ter provocado um aumento significativo da resistência, fato não observado. Estudos de correlação clínico-laboratorial em criptococose continuam sendo realizados, apesar da dificuldade

dos testes de sensibilidade *in vitro* em separar isolados de *C. neoformans* resistentes e sensíveis à anfotericina B e fluconazol, fármacos usados, respectivamente, na fase aguda e manutenção da doença. Em busca de parâmetros que possam se somar ou substituir o teste de MIC, outros testes *in vitro* foram avaliados neste estudo: curvas de morte, método de macrodiluição e teste de tabuleiro do xadrez, ambos com inoculo individualizado. Contribuindo para o prognóstico da criptococose, estudou-se ainda a carga fúngica no LCR, antes e durante o tratamento com anfotericina B e fluconazol. Todas as iniciativas e esforços, vindos de equipes assistências e laboratoriais, são bem-vindas quando dirigidas não apenas à contribuição ao desenvolvimento científico e tecnológico, mas, principalmente, à descoberta de ferramentas que possam aprimorar os critérios de prognóstico e melhorar o prognóstico e qualidade de vida dos pacientes acometidos por criptococose do sistema nervoso central.

6. Conclusões

- A frequência de polimorfismo celular foi de 4% e nunca antes relatada em isolados de micoteca;
- O fenômeno de polimorfismo parece ser exclusivo de *C. neoformans* e não observado em isolados de *C. gattii*;
- Todos os fenótipos polimórficos apresentavam células titãs e, em menor porcentagem, pseudofilamentação;
- A espessura da parede de células polimórficas foi semelhante à das células regulares;
- Isolados com maior número de células titãs apresentaram menor melanização, quando comparadas a células regulares; estudos com maior número de cepas e testes mais específicos, como dosagem química e imunofluorescência, poderão confirmar essa ocorrência;
- O tipo molecular e conjugante da maioria dos fenótipos polimórficos foi *C. neoformans* VNI MAT alfa, com baixa frequência de VNII MAT alfa, seguindo a tendência geral citada na literatura da América Latina;
- Foi inédito o encontro de polimorfismo em isolados de sangue, indicando a facilidade de disseminação de células atípicas pela corrente sanguínea;
- Em contraposição a dado de literatura, comprovou-se a possibilidade de disseminação de células titãs no sistema nervoso central, frente à sua presença em líquido cefalorraquidiano;
- A baixa suscetibilidade (MIC, ≥ 8 mg/L) ao fluconazol foi observada em quase metade dos isolados com células titãs, indicando que polimorfismo possa ter relação com menor suscetibilidade ao fármaco. Frente ao pequeno número de isolados analisados e ausência de *breakpoint* não se pode afirmar, mas apenas, sugerir que polimorfismo altera a suscetibilidade antifúngica a fluconazol;

- De modo inédito, foi demonstrado que anfotericina B tem boa ação inibitória em isolados polimórficos; no entanto, os testes de curvas de morte permitiram distinguir isolados menos sensíveis e tolerantes à ação fungicida deste fármaco, indicando ser este um método mais discriminatório para avaliação do fármaco, em relação à determinação de concentração inibitória mínima (MIC);
- O método usando inóculo individualizado foi equivalente ao Etest®, na totalidade de ensaios com anfotericina B e na maioria dos testes com fluconazol, não sendo mais sensível para avaliar o prognóstico clínico de pacientes com criptococose de sistema nervoso central;
- A interação *in vitro* entre 5-fluorocitosina e anfotericina B resultou em indiferença e antagonismo na maioria dos casos, aumentando a controvérsia já existente na literatura sobre a correlação clínico-laboratorial do método do tabuleiro do xadrez com inóculo individualizado; e
- O método de inóculo individualizado permitiu determinar a dose relevante *in vitro* de anfotericina B para inibição do agente infectante, clinicamente, significativa para cada paciente; o pequeno número de amostras utilizado neste estudo indica serem necessários estudos futuros para avaliar melhor a correlação clínico-laboratorial desse teste.

7. Referências Bibliográficas

Aller AI, Martin-Mazuelos E, Lozano F, et al. Correlation of fluconazole MICs with clinical outcome in cryptococcal infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000;44:1544–8.

Alves SH, Lopes JO, Costa JM, Klock C. Development of secondary resistance to fluconazole in *Cryptococcus neoformans* isolated a patients with AIDS. *Inst Med Trop S Paulo* 1997; 39: 359-61.

Andes D. In vivo pharmacodynamics of antifungal drugs in treatment of candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 1179-86

Arechavala AI, Ochiuzzi ME, Borgnia MD, Santiso GM. Fluconazole and amphotericin B susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans*: Results of minimal inhibitory concentrations against 265 isolates from HIV-positive patients before and after two or more months of antifungal therapy. *Rev Iberoam Micol.* 2009;26(3):194–197.

Armengou A, Porcar C, Mascaró J, Garcia Bragado F. Possible development of resistance to fluconazole during suppressive therapy for AIDS-associated cryptococcal meningitis. *Clin Infect Dis* 1996; 23: 1337-8

Barbosa ATF, Colares FA, Gusmão ES, Barros AA, Cordeiro CEG, Andrade MCT. Criptococose pulmonar isolada em paciente imunocompetente. *J Bras Pneumol.* 2006; 32(5):476-80.

Barchiesi F, Gallo D, Caselli F, Di Francesco LF, Arzeni D, Giacometti A, Scalise G In-vitro relations of itraconazole with flucitosina agaisnt clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. *Journal of antimicrobial chemotherapy.* 1999; 44:65-70

Baroni F , Paula CR, Silva EG, Viani FC, Rivera ING, Oliveira MTBE, Gambale W. *Cryptococcus neoformans* Strains Isolated From Church Towers In Rio De Janeiro City, Rj, Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo.* 2006; 8:71-75.

Bauer, M, Thomas, AM, Larsen, RA. *Cryptococcus neoformans*: the model organism for yeast antifungal drug susceptibility testing. *Mycopathologia.* 2012 ; 173(5-6), 435-443.

Bava J, Solari R, Isla G, Troncoso A Atypical forms of *Cryptococcus neoformans* in CSF of an AIDS patient. *J Infect Developing Countries.* 2008; 2(5):403-405.

- Bennett JE. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother* 1967; 1966:405-10
- Berg J, Clancy CJ, Nguyen MH. The hidden danger of primary fluconazole prophylactics for patients with AIDS. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 186-7
- Bicanic T; Brouwer AE; Meintjes, G; Rebe K, Limmathurotsakul D, Chierakul W, Teparrakkul P, Loyse A, White NJ, Wood R, Jaffar S and Harrison TS. Relationship of CSF pressure, fungal burden and outcome in patients with cryptococcal meningitis undergoing serial lumbar punctures. *AIDS* 2009 23 (6): 701-706.
- Bicanic, T Harrison, TS. Cryptococcal Meningitis. *British Medical Bulletin* 2004; 72: 99-118.
- Bicanic T, Harrison TS. Cryptococcal meningitis *British Medical Bulletin*. 2005; 72: 99–118.
- Bicanic T, Harrison TS, Niepieklo A, Dyakopu N, Meintjes G. Symptomatic relapse of HIV-associated cryptococcal meningitis after initial fluconazole monotherapy: the role of fluconazole resistance and immune reconstitution. *Clin Infect Dis*. 2006; 43: 1069-1073.
- Bicanic T, Meintjes G, Rebe K, Williams A, Loyse A, Wood R, et al. Immune reconstitution inflammatory syndrome in HIV-associated cryptococcal meningitis: a prospective study. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 2009 ; 51(2), 130-134.
- Bii CC, Makimura K, Abe S, Taguchi H, Mugasia OM, Revathi G et al. Antifungal drug susceptibility of *Cryptococcus neoformans* from clinical sources in Nairobi, Kenya. *Mycoses* 2006; 50: 25-30
- Birley HD, Johnson EM, McDonald P. et al. Azole drug resistance as a cause of clinical relapse in AIDS patients with cryptococcal meningitis. *Int J STD AIDS*; 6: 353-355, 1995.
- Bouklas T, Pechuan X, Goldman DL, Edelman B, Bergman A, et al. Old *Cryptococcus neoformans* cells contribute to virulence in chronic cryptococcosis. 2013 ; *MBio*, 4 :4, e00455-13.
- Brajtburg J, Bolard J. Carrier effects on biological activity of amphotericin B. *Clinical Microbiology Reviews*. 1996; 9(4), 512-531.

Brandt ME, Pfaller MA, Hajjeh RA, Hamill RJ, Pappas PG, Reingold AL, et al. Trends in antifungal drugs susceptibility of *Cryptococcus neoformans* isolates in the United States: 1992 to 1994 and 1996 to 1998. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:3065-3069.

Brandt ME, Pfaller MA, Hajjeh RA, Graviss EA, Rees J, Spitzer ED et al. Molecular subtypes and antifungal susceptibilities of serial *Cryptococcus neoformans* isolates in human immunodeficiency virus-associated cryptococcosis. *J Infect Dis* 1996; 174: 812-20

Brouwer AE, Rajanuwong A, Chierakul W, Griffin GE, Larsen RA, White NJ, et al. Combination antifungal therapies for HIV-associated cryptococcal meningitis: a randomised trial. *The Lancet*. 2004 ; 363(9423), 1764-1767.

Burgess DS, Hastings RW. A comparison of dynamic characteristics of fluconazole, itraconazole, and amphotericin B against *Cryptococcus neoformans* using time-kill methodology. *Diag Microbiol Infect Dis* 2000; 38: 87-93

Byrnes EJ, Li W, Lewit Y, Ma H, Voelz K, Ren P et al., Emergence and Pathogenicity of Highly Virulent *Cryptococcus gattii* Genotypes in the Northwest United States. *PLoS Pathog* 6(4). 2010; Disponível em : <http://www.plospathogens.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.ppat.1000850>

Calvo BM, Colombo AI, Fischman O, Santiago A, Thompson L, Lazera M. et al, Antifungal Susceptibilities, Varieties, and Electrophoretic Karyotypes of Clinical Isolates of *Cryptococcus neoformans* from Brazil, Chile, and Venezuela. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001; 39, No. 6:2348–2350.

Casadevall A, Perfect, JR. *Cryptococcus neoformans*: Molecular Pathogenesis and Clinical Management. 1 Edição. Washington. ASM Press; 1998.

Casadevall A, Perfect JR. *Cryptococcus neoformans*, New York, American Society Microbiology Press 2002; 541.

Casadevall A, Pirofski LA. The damage-response framework of microbial pathogenesis. *Nat Rev Microbiol*. 2003; 1: 17–24

Casadevall A, Spitzer ED, Webb D, Rinaldi MG. Susceptibilities of serial *Cryptococcus neoformans* isolates from patients with recurrent cryptococcal meningitis. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 1383-6

Chaturvedi S, Rodeghier B, Fan J, McClelland CM, Wickes BL, Chaturvedi V. Direct PCR of *Cryptococcus neoformans* MAT α and MAT a Pheromones To Determine Mating Type, Ploidy, and Variety: a Tool for Epidemiological and

Molecular Pathogenesis Studies. Journal of clinical microbiology.2000; 38(5), 2007-2009.

Chen J, Varma A, Diaz MR, Litvintseva AP, Wollenberg KK, Kwon-Chung KJ. *Cryptococcus neoformans* strains and infection in apparently immunocompetent patients, China. Emerging infectious diseases. 2008;14(5).

Chryssanthou E, Manuel Cuenca-Estrella M. Comparison of the Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing Proposed Standard and the E-Test with the NCCLS Broth Microdilution Method for Voriconazole and Caspofungin Susceptibility Testing of Yeast Species Journal of Clinical Microbiology. 2002; Vol. 40, No. 10: 3841–3844

CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne; PA 2008.

Cogliati M. Global molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: an atlas of the molecular types. Scientifica, 2013.

Coutinho, G. Virulência e resistência a antifúngicos de amostras clínicas e ambientais de *Cryptococcus neoformans*. São Paulo, 2006 (Dissertação de Mestrado- Coordenação de Controle de Doenças da Secretaria de Estado de Saúde de São Paulo, Brasil)

Córdoba S, Afeltra J, Vitale RG. Evaluation of the in vitro activity of amphotericin B by time–kill curve methodology against large and small capsule C. *neoformans* isolates. Diagnostic microbiology and infectious disease.2011 ; 71(3), 260-262.

Cruickshank JG, Cavill R, Jelbert M. *Cryptococcus neoformans* of Unusual Morphology. Applied Microbiology. 1973;Vol. 25, 2: 309-312.

Cuenca-Estrella M, Diaz-Guerra TM, Mellado E, Rodriguez-Tudela JL. Influence of glucose supplementation and inoculum size on growth kinetics and antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. J Clin Microbiol 2001; 39: 525-32

Dannaoui E, Abdul M, Arpin M, et al. Results obtained with various antifungal susceptibility testing methods do not predict early clinical outcome in patients with cryptococcosis. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50: 2464-2470.

Datta, K.; Jain, N.; Sethi, S.; et al. Fluconazole and itraconazole susceptibility of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* at a tertiary care centre in India: a need for care. Antimicrob Chemother. Oct; 52(4): 683-686, 2003.

Debourgogne A, Hagen F, Elenga N, Long L, Blanchet D, Veron V et al. Successful treatment of *Cryptococcus gattii* neurocryptococcosis in a 5-year-old immunocompetent child from the French Guiana Amazon region. *Revista Iberoamericana de Micologia*, 2012 ; 29(4), 210-213.

Del Valle L, Piña-Oviedo S. HIV disorders of the brain: pathology and pathogenesis. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*. 2005; 11: 718-732.

Dias ALT, Matsumoto F, Melhem MSC, Silva GS, Auler ME, Siqueira AM, Paula CR. Comparative analysis of Etest and broth microdilution method (AFST-EUCAST) for trends on antifungal drug susceptibility testing of Brazilian *Cryptococcus neoformans* Isolates. *J Med Microbiol*. 2006; 55: 1693- 1699.

Dick J D, Merz WG, Saral R. Incidence of polyene – resistant Yeast recovered from clinical specimens. *Anticomb. Agents Chemother.* ; 18: 153- 163, 1980.

Dismukes WE, Pappas PG, Sobel JD. *Clinical Mycology*. 1ª Edição. New York. Editora Oxford; 2003.

Doering TL, Nosanchuk JD, Roberts WK, Casadevall A. Melanin as a potential cryptococcal defence against microbicidal proteins. *Medical Mycology*. 1999;37(3), 175-181.

Dromer F, Mathoulin-Pélissier S, Launay O, Lortholary O, the French Cryptococcosis Study Group. Determinants of disease presentation and outcome during cryptococcosis: the Crypto A/D study; *PloS Med* 2007;1-18 [dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.0040021](https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0040021)

Drutz DJ. In vitro antifungal susceptibility testing and measurement of levels of antifungal agents in body fluids. *Rev Infect Dis* 1987; 9: 392-6

Ellis DH, Pfeiffer TJ. Natural Habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *Journal of clinical microbiology*. 1990; 28 7:1642-1644.

Ernst E, Klepser ME, Pfaller MA. Postantifungal effects of echinocandin, azole and polyene antifungal agents *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1108-11

Ernst EJ, Rogers PD. *Antifungal agents: methods and protocols*. 1ª Edição. Totowa. Humana Press; 2005.

Ernst EJ, Yodoi K, Roling EE, Klepser ME. Rates and Extents of Antifungal Activities of Amphotericin B, Flucytosine, Fluconazole, and Voriconazole against

Candida lusitanae Determined by Microdilution, Etest, and Time-Kill Methods Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2002; Vol. 46, No. 2: 578–581.

EUCAST DEFINITIVE DOCUMENT EDef 7.2 Revision 7.2: method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts EDef 7.2 (EUCAST-AFST). Clinical Microbiology and Infection, 2012; 18(7), E246-E247.

Falci DR, Lunardi LW, Ramos CG, Bay MB, Aquino VR, Goldani LZ. Continuous infusion of amphotericin B deoxycholate in the treatment of cryptococcal meningoencephalitis: analysis of safety and fungicidal activity. Clinical Infectious Diseases, 2010 ; 50(5), e26-e29.

Franzot S, Salkin IF, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: Separate Varietal Status for *Cryptococcus neoformans* Serotype A Isolates. Journal of Clinical Microbiology. 1999; Vol. 37, 3: 838–840.

Feldmesser M, Kress Y, Casadevall A. Dynamic changes in the morphology of *Cryptococcus neoformans* during murine pulmonary infection Microbiology. 2001; 147:2355–2365.

Fraser JA, Giles SS, Wenink EC, Geunes-Boyer SG, Wright J, Stephanie Diezmann S. et al., Same-sex mating and the origin of the Vancouver Island *Cryptococcus gattii* outbreak. 2005; Vol 437 n27:136-1364.

Fries BC, Goldman DL, Cherniak R, Ju R, Casadevall A. Phenotypic Switching in *Cryptococcus neoformans* Results in Changes in Cellular Morphology and Glucuronoxylomannan Structure. Infection and immunity. 1999; Vol. 67, No. 11:6076–6083.

Fries BC, Taborda CP, Serfass E, Casadevall A. Phenotypic switching of *Cryptococcus neoformans* occurs in vivo and influences the outcome of infection. J. Clin. Invest. 2001; 108:1639–1648.

Gazzoni AF, Oliveira FM, Salles EF, Mayayo E, Guarro J, Capilla J, Severo LC. Unusual morphologies of *Cryptococcus* spp. in tissue specimens: report of 10 case. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 2010; 52(3):145-149.

Gilbert NM, Donlin MJ, Gerik KJ, Specht CA, Djordjevic JT, Wilson CF, Sorrell TC, Lodge JK, KRE genes are required for β -1,6-glucan synthesis, maintenance of capsule architecture and cell wall protein anchoring in *Cryptococcus neoformans*. Mol Microbiol. 2010; 76(2): 517–534.

Groll AH, Kolve H. Antifungal agents: in vitro susceptibility testing, pharmacodynamics, and prospects for combination therapy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004; 23: 256-70

Groll AH, Piscitelli SC, Walsh TJ. Antifungal pharmacodynamics: concentration-effect relationships in vitro and in vivo. *Pharmacotherapy* 2001; 21(Suppl): 133-48

Gomez-Lopez A, Zaragoza O, Dos Anjos MM, Melhem MSC, Rodriguez-Tudela JI, Cuenca-Estrella M. In vitro susceptibility of *Cryptococcus gattii* clinical isolates. *Clinical Microbiology and Infection*. 2008; Vol 14 N 7:727-730.

Hadfield TL, Smith MB, Winn RE, Rinald MG, Guerra C. Mycoses caused by *Candida lusitana*. *Ver. Infect. Dis.*; 9: 1006-1012, 1987.

Hazirolan G, Canton E, Sahin S, Arikan-Akdagli S. Head-to-head comparison of inhibitory and fungicidal activities of fluconazole, itraconazole, voriconazole, posaconazole, and isavuconazole against clinical isolates of *Trichosporon asahii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2013, 57(10), 4841-4847.

Hsueh PR, Lau YJ, Chuang YC, Wan JH, Huang WK, Shyr JM, Yan JJ, Yu KW, Wu JJ, Ko WC, Yang YC, Liu YC, Teng LJ, Liu CY, Luh KT. 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. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2005, p. 512-517.

Hoang LM, Maguire JA, Doyle P, Fyfe M, Roscoe DL. *Cryptococcus neoformans* infections at Vancouver Hospital and Health Sciences Centre (1997–2002): epidemiology, microbiology and histopathology. *Journal of medical microbiology*, 2004 ; 53(9), 935-940.

Illnait-Zaragoz MT, Ortega-Gonzalez L M, Hagen F, Martínez-Machin GF, Meis JF. Fatal *Cryptococcus gattii* genotype AFLP5 infection in an immunocompetent Cuban patient. *Medical mycology case reports*. 2013 ; 2, 48-51.

Jain N, Wickes BL, Keller SM, Fu J, Casadevall A, Jain P, et al. Molecular epidemiology of clinical *Cryptococcus neoformans* strains from India. *Journal of clinical microbiology*. 2005; 43(11), 5733-5742.

James PG, Cherniak R, Jones RG, Stortz CA, Reiss E Cell-wall glucans of *Cryptococcus neoformans*. *Carbohydrate Research*. 1990; Vol 198 Issue 1 2: 23-38.

Jarvis JN, Casazza JP, Stone HH, Meintjes G, Lawn SD, Levitz, SM., et al. The phenotype of the Cryptococcus-specific CD4+ memory T-cell response is associated with disease severity and outcome in HIV-associated cryptococcal meningitis. *Journal of Infectious Diseases*, 2013; 207(12), 1817-1828.

Jenney A, Pandithage K, Fisher, DA, Currie BJ. Cryptococcus infection in tropical Australia. *Journal of clinical microbiology*. 2004;42(8), 3865-3868.

Johnson MD, MacDougall C, Ostrosky-Zeichmer I, Perfect JR, Rex JH. Combination antifungal therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 693-715

Junior VLP, Pone MVS, Pone SM, Campos JMS, Garrido JRP, Barros ACMW, et al. Cryptococcus gatii tipo molecular VGII como agente causador de meningoencefalite em criança saudável no Rio de Janeiro, Brasil: relato de um caso autóctone *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2010; 43(6):746-748.

Keele DJ, Delallo VC, Lewis RE, Ernst EJ, Klepser ME. Evaluation of amphotericin B and flucytosine in combination against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* using time-kill methodology. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2001;41: 121-126

Klepser ME, Ernst EJ, Ernst ME, Pfaller MA. Growth medium effect on the antifungal activity of LY 303366. *Diag Microbiol Infect Dis* 1997a ; 29: 227-31

Klepser ME, Wolfe EJ, Jones RN, Nightingale CH, Pfaller MA. Antifungal pharmacodynamic characteristics of fluconazole and amphotericin B tested against *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997-b ; 41: 1392-5

Klepser MA, Ernst EJ, Lewis RE, Ernst ME, Pfaller MA. Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results: proposal for standardized methods. *Antimicrob Agents Chemother* 1998-a; 42 1207-12

Klepser ME, Wolfe EJ, Pfaller MA. Antifungal pharmacodynamic characteristics of fluconazole and amphotericin B against *Cryptococcus neoformans*. *Journal Antimicrob Chemother* 1998-b; 41:397-401

Kimura M, Furuta T, Teramura K, Satou T. Pseudohyphae of Cryptococcus in a cytologic specimen. *Acta Cytol*. 1998; 42:817-8.

Kontoyiannis DP, Lewis RE. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. *Lancet* 2002 ; 359: 1135-44

Kwon-Chung KJ. A new genus, *Filobasidiella*, the perfect state of *Cryptococcus neoformans*. *Mycologia*, 1975; 1197-1200.

Kwon-Chung KJ, Bennett JE. High prevalence of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in tropical and subtropical regions. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. 1. Abt. Originale. A, Medizinische Mikrobiologie, Infektionskrankheiten und Parasitologie*, 1984; 257(2), 213-218.

Kwon-Chung KJ, Rhodes JC. Encapsulation and Melanin Formation as Indicators of Virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity*. 1986, Vol. 51, No. 11986:. 218-223.

Kwon-Chung KJ, Varma A. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? *FEMS Yeast Res* 6. 2006; 574–587.

Lambertucci JR, Franco R, Queiroz LCD. Cryptococcal meningoencephalitis and pulmonary nodule in a non-HIV-infected immunocompetent patient. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2005; 38(2), 207-208.

Larsen RA, Bauer M, Thomas AM, Sanchez A, Citron D, Rathbun M, Harrison TS. Correspondence of In Vitro and In Vivo Fluconazole Dose- Response Curves for *Cryptococcus*. 2005; 49: 3297–3301.

Larsen RA, M Bauer, AM Thomas, JR Graybill. Amphotericin B and fluconazole, a potent combination therapy for cryptococcal meningitis. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2004; 48:985–991.

Larsen RA, Bauer M, Brouwer AE, Sanchez ., Thomas A., Rajanuwong et al. In vitro-clinical correlations for amphotericin B susceptibility in AIDS-associated cryptococcal meningitis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007 ; 51(1), 343-345.

Lee SC, Dickson DW, Casadevall A. Pathology of Cryptococcal Meningoencephalitis: Analysis of 27 Patients With Pathogenetic Implications. *Human Pathology*. 1996; Volume 27, No. 8:839-847.

Lin X, Heitman J. The Biology of the *Cryptococcus neoformans* Species complex. *Annu. Rev. Microbiol*. 2006.60:69-105.

Lin X, Huang JC, Mitchell TG, Heitman J. Virulence Attributes and Hyphal Growth of *C. neoformans* Are Quantitative Traits and the MATa Allele Enhances Filamentation. *PLoS Genet* 2006; 2(11): 1801-1814.

Litvintseva AP, Carbone I, Rossouw J, Thakur R, Govender NP, et al. Evidence that the Human Pathogenic Fungus *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* May Have Evolved in Africa. PLoS ONE.2011; 6(5): e19688. doi:10.1371/journal.pone.0019688

Lockhart SR, Iqbal N, Harris JR, Grossman NT, DeBess E, et al. *Cryptococcus gattii* in the United States: Genotypic Diversity of Human and Veterinary Isolates. PLoS ONE. 2013; 8(9): e74737. doi:10.1371/journal.pone.0074737

Longley N, Muzoora C, Taseera K, Mwesigye J, Rwebembera J, Chakera A, et al. Dose response effect of high-dose fluconazole for HIV-associated cryptococcal meningitis in southwestern Uganda. Clinical infectious diseases. 2008 ; 47(12), 1556-1561.

Lortholary O, Improvisi L, Nicolas M, Provost F, Dupont B et al. Fungemia during murine cryptococcosis sheds some light on pathophysiology. Med Mycol 1999; 37: 169-74

Love GL, Boyd GD, Greer DL Large *Cryptococcus neoformans* isolated from brain abscess. Journal of clinical microbiology.1985; 22(6), 1068-1070.

Loyse A, Wilson D, Meintjes G, Jarvis JN, Bicanic T, Bishop L, et al. Comparison of the early fungicidal activity of high-dose fluconazole, voriconazole, and flucytosine as second-line drugs given in combination with amphotericin B for the treatment of HIV-associated cryptococcal meningitis. Clinical infectious diseases.2012 ; 54(1), 121-128.

Lui G, Lee N, Ip M, Choi KW, Tso YK, Lam E, et al., Cryptococcosis in apparently immunocompetent patients. Qjm.2006; 99(3), 143-151.

Maertens JA. History of the development of azole derivatives. Clinical Microbiology and Infection 2004;10:1-10.

Magditch DA, Liu T-B, Xue C, Idnurm A. DNA Mutations Mediate Microevolution between Host-Adapted Forms of the Pathogenic Fungus *Cryptococcus neoformans*. PLoS Pathog.2012 ; 8(10): e1002936. doi:10.1371/journal.ppat.1002936

Mandal P, Roy TS, Das TK, Banerjee U, Xess I, Nosanchuk JD. Differences in the cell wall architecture of melanin lacking and melanin producing *Cryptococcus neoformans* clinical isolates from india: an electron microscopic study. Brazilian Journal of Microbiology. 2007; 38:662-666

Martin E, Stüben A, Görz A, Weller U, Bhakdi S. Novel aspect of amphotericin B action: accumulation in human monocytes potentiates killing of phagocytosed *Candida albicans*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1994; 38(1), 13-22

Maxwell MJ, Messer SA, Hollis R.J, Diekema DJ, Pfaller MA Evaluation of Etest Method for Determining Voriconazole and Amphotericin B MICs for 162 Clinical Isolates of *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003; Vol. 41, No. 1:97–99.

Meyer W, Castañeda A, Jackson S, Huynh M, Castañeda E e grupo de estudo IberoAmerican Cryptococcal. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* Isolates. *Emerging Infectious Diseases* 2003; 9(2): 189-195.

Meyer W, Marszewska K, Amirmostofina M, Igreja RP, Hardtke C, Methling K, Viviani MA, Chindampon A, Sukoongreung S, John MA, Ellis DH, Sorrel TC. Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by PCR-fingerprinting and RAPD. A pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. *Electrophoresis*. 1999;20:1790-1799

Ministério da Saúde/ Programa Nacional de DST/AIDS. Disponível em <http://www.aids.gov.br/pcdt> Acesso em fevereiro de 2014

Mitchell TG, Perfect JR. Cryptococcosis in the Era of AIDS—100 Years after the Discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clinical Microbiology Reviews*, Oct. 1995, p. 515–548 Vol. 8, No. 4

Mitha M, Naicker P, Mahida P . Disseminated Cryptococcosis in an HIV-negative patient in South Africa: the elusive differential diagnosis. *The Journal of Infection in Developing Countries*.2010 ; 4(08), 526-529.

Mondon P, Petter R, Amalfitano G, Luzzati R, Concia E, Polacheck I et al. Heteroresistance to fluconazole and voriconazole in *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1856-61

Neilson JB, Ivey MH, Bulmer GS *Cryptococcus neoformans*: Pseudohyphal Forms Surviving Culture with *Acanthamoeba polyphaga*. *Infection And Immunity*.1978; Vol. 20, 1: 262-266.

Ngamskulrungrroj P, Meyer W. Melanin production at 37°C is linked to the high virulent *Cryptococcus gattii* Vancouver Island outbreak genotype VGIIa. *Australasian Mycologist*. 2009; 28:9–14.

Ngamskulrungrroj P, Chang Y, Sionov E, Kwon-Chung, KJ. The primary target organ of *Cryptococcus gattii* is different from that of *Cryptococcus neoformans* in a murine model. *Mbio*. 2012; 3(3), e00103-12.

Nooney L, Matthews RC, Burnie JP. Evaluation of Mycograb R , amphotericin B, caspofungin, and fluconazole in combination against *Cryptococcus neoformans* by checkerboard and time-kill methodologies. *Diag Microbiol Infect Dis* 2005; 51: 19-29

Nosanchuk JD, Cleare W, Franzot SP, Casadevall A. Amphotericin B and fluconazole affect cellular charge, macrophage phagocytosis, and cellular morphology of *Cryptococcus neoformans* at subinhibitory concentrations. *Antimicrobial agents and chemotherapy*.1999; 43(2), 233-239.

Nosanchuk JD, Casadevall A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cellular microbiology*.2003;5(4), 203-223.

Nussbaum JC, Jackson A, Namarika D, Phulusa J, Kenala J, Kanyemba C., et al. Combination flucytosine and high-dose fluconazole compared with fluconazole monotherapy for the treatment of cryptococcal meningitis: a randomized trial in Malawi. *Clinical infectious diseases*.2010 ; 50(3), 338-344.

Odds FC. Resistance of yeasts to azole-derivative antifungals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.1993; 31(4), 463-471.

Odds FC, Brown AJ, Gow NA. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends in microbiology*.2003 a; 11(6), 272-279.

Odds FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.2003b ; 52(1), 1-1.

Okagaki LH, Strain AK, Nielsen JN, Charlier C, Baltes NJ, Chrétien F, Heitman J, Dromer F, Nielsen K. Cryptococcal Cell Morphology Affects Host Cell Interactions and Pathogenicity. *PLoS Pathogens*. 2010 Volume 6 Issue 6.

Okagaki LH, Nielsen K. Titan cells confer protection from phagocytosis in *Cryptococcus neoformans* infections. *Eukaryotic cell*. 2012 ; 11(6), 820-826.

Oliveira FM, Severo CB, Guazzelli LS, Severo LC. *Cryptococcus gattii* fungemia: report of a case with lung and brain lesions mimicking radiological features of malignancy. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*. 2007;49(4):263-265, 2007.

OMS. Rapid advice: diagnosis, prevention and management of cryptococcal disease in HIV-infected adults, adolescents and children. Dec.2011.

Pappalardo MCSM, Paschoal RC, Melhem MSC. AIDS-associated central nervous system cryptococcosis: a Brazilian case study. *AIDS*. 2007, 21:1971–1983.

Papalardo MCSM, Melhem MSC. Cryptococcosis: a review of the Brazilian experience for the disease. *Rev Inst Med trop S Paulo*. 2003; 45: 299-305.

Pappalardo MCSM, Szeszs MW , Martins MA , Baceti LB , Bonfietti LX, Purisco SU, Baez AA, Melhem MSC. Susceptibility of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* to amphotericin B using time –kill methodology. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2009; 64.146 – 151.

Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *Aids*; 2009; 23(4), 525-530.

Paschoal RC, Melhem MSC, Guelli T, Szeszs MW. Atypical *Cryptococcus neoformans* cells isolated from cerebrospinal fluid samples. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2007; 66 (1):78-80.

Patil RT, Sangwan J, Juyal D, Lathwal S. Meningitis Due to *Cryptococcus gattii* in an Immunocompetent Patient. *Journal of clinical and diagnostic research*.2013; 7(10), 2274.

Paugam A, Dupovy-Camet P, Blanche P, Gaugneux JP, Tourte-Schafer C, Sicard D. Increased fluconazole resistance of *Cryptococcus neoformans* isolated from a patient with AIDS and recurrent meningitis. *Clin Infect Dis* 1993; 17: 431-6

Pedroso RS, Costa KRC, Ferreira JC, Candido RC Avaliação da produção de melanina por espécies de *Cryptococcus* em quatro diferentes meios de cultura. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*.2007 ; 40(5):566-568.

Pedroso RS, Ferreira JC, Candido RC. Susceptibilidade in vitro de *Cryptococcus* sp a agentes antifúngicos isolados na cidade de Ribeirão Preto, São Paulo,Brasil. *Mem Ins Oswaldo Cruz* 2006; 101: 239-43

Perea S , Patterson T. Antifungal resistance in pathogenic fungi. *Clin Infect Dis* 2002; 35: 1073-80

Perkins A, Gomez-Lopez A, Mellado E, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Rates of antifungal resistance among Spanish clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*. *J Antimicrobial Chemother*. 2005; 56: 1144-1147.

Perfect JR, Magee B B, Magee PT. Separation of chromosomes of *Cryptococcus neoformans* by pulsed field gel electrophoresis. Infection and immunity 1989; 57(9), 2624-2627.

Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, Goldman DL, Graybill JR, Hamill RJ, et al. Clinical Practice Guidelines for the Management of Cryptococcal Disease: 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America. Clinical Infectious Diseases 2010; 50:291–322.

Pfaller MA, Castanheira M, Diekema DJ, Messer SA, Jones RN. Wild-type MIC distributions and epidemiologic cutoff values for fluconazole, posaconazole, and voriconazole when testing *Cryptococcus neoformans* as determined by the CLSI broth microdilution method. Diagn Microbiol Infect Dis 2011; 71: 252 – 259.

Pfaller MA, Diekema DJ, Sheehan DJ. Interpretive breakpoints for fluconazole and *Candida* revisited: a blueprint for the future of antifungal susceptibility testing. Clin Microbiol Rev 2006; 19: 435- 47

Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, Hollis RJ, Rice C, et al. In vitro activities of voriconazole, posaconazole and fluconazole against 4,169 clinical isolates of *Candida* spp and *Cryptococcus neoformans* collected during 2001 and 2002 in the ARTEMIS global antifungal surveillance program. Diag Microbiol Infect Dis. 2004; 48: 201-205.

Pfaller MA, Messer SA, Boyken L C, Rice C, Tendolkar S, Hollis RJ, Doern GV, Diekema DJ. Global Trends in the Antifungal Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* (1990 to 2004). Journal Of Clinical Microbiology. 2005; Vol. 43 No. 5:2163–2167

Pierce AM, Pierce HD, Unrau AM, Oehlschlager AC. Lipid composition and polyene antibiotic resistance of *Candida albicans* mutants. Canadian Journal of Biochemistry 1978; 56: 135-42

Polacheck I, Hearing VJ, Kwon-Chung KJ. Biochemical studies of phenoloxidase and utilization of catecholamines in *Cryptococcus neoformans*. J Bacteriol. 1982; 150(3): 1212-1220

Polacheck I, Lebens GA. Electrophoretic karyotype of the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. Journal of general microbiology. 1989 ; 135(1), 65-71.

Posteraro B, Sanguinetti M, Sanglard D, et al. Identification and characterization of a *Cryptococcus neoformans* ATP binding cassette(ABC) transporter encoding

gene, CnAFR1, involved in the resistance to fluconazole. *Molecular Microbiology* 2003; 47: 357-71.

Powderly WG, Keath EJ, Sokol-Anderson M, Robinson K, Kitz D, Little JR et al. Amphotericin B-resistant *Cryptococcus neoformans* in a patient with AIDS. *Infect Dis Clin Practice*. 1992 ; 1: 314-6

Rajasingham, R., Rolfes, M. A., Birkenkamp, K. E., Meya, D. B., & Boulware, D. R. Cryptococcal meningitis treatment strategies in resource-limited settings: a cost-effectiveness analysis. *PLoS medicine*.2012 ; 9(9), e1001316.

Reolon A, Perez LRR, Mezzari A. Prevalência de *Cryptococcus neoformans* nos pombos urbanos da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul *J Bras Patol Med Lab* 2004; v.10 n 5 pag 293-8

Rex JH, Cooper CR, Merz Jr WG, Galgiani JN, Anaissie EJ. Detection of amphotericin B-resistant *Candida* isolates in a broth -based system. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 906-9

Rex JH, Pfaller MA, Walsh TJ et al. Antifungal susceptibility testing: principal aspects and current challenges. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 643-58

Rex JH, Pfaller MA, Galgiani JN, Bartlett MS, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA et al. Development of interpretative “breakpoints” for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of in vitro-in vivo correlation data for fluconazole, itraconazole and *Candida* infections. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing of the NCCLS. *Clin Infect Dis* 1997; 24: 235- 47

Richardson MDS, Warnock DW *Fungal Infection: Diagnosis and Management* 3 Edição. Massachusetts. Blackwell; 2003.

Robinson PA, Bauer M, Leal M E, Evans SG, Holtom PD, Diamond D. et al. Early mycological treatment failure in AIDS-associated cryptococcal meningitis. *Clinical infectious diseases*.1999 ; 28(1), 82-92.

Rodero L, Cordoba S, Cahn P, Hochenfellner F, Davel G, Canteros C, et al. In vitro susceptibility studies of *Cryptococcus neoformans* isolated from patients with no clinical response to amphotericin B therapy. *J Antimicrobiol Chemother*. 2000-a; 45: 239- 242.

Rodero L, Cordoba S, Cahn P, Soria M, Lucarini M, Davel G, et al, Timed-kill curves for *Cryptococcus neoformans* isolated from patients with AIDS. *Medical Mycology*. 2000-b; 38: 201–207.

Rodero L, Mellado E, Rodriguez AC, Salve A, Guelfand L, Cahn P, et al. G484S amino acid substitution in lanosterol 14-alpha demethylase (ERG11) is related to fluconazole resistance in a recurrent *Cryptococcus neoformans* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47(11):3653-6.

Rodriguez-Tudela JL, Donnelly JP, Pfaller MA, Chryssantou E, Warn P, Denning DW et al. Statistical Analyses of Correlation between Fluconazole MICs for *Candida* spp. Assessed by Standard Methods Set Forth by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (E.Dis. 7.1) and CLSI (M27-A2) *J. Clin. Microbiol* 2007; 45: 109–11

Rodriguez-Tudela JL, Arendrup MC, Barchiesi F, Bille J, Chryssanthou E, Cuenca-Estrella M, et al. EUCAST definitive document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14:398-405.

Rosas AL, Casadevall A. Melanization affects susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to heat and cold. *FEMS microbiology letters.* 1997; 153(2), 265-272.

Ruma P, Chen SCA, Sorrel TC, Brownlee AG. Characterization of *Cryptococcus neoformans* by random DNA amplification. *Letters in Applied Microbiology.* 1996 ;23: 312–316.

Saag MS, Graybill RJ, Larsen RA, Pappas PG, Perfect JR, Powderly WG, et al. Practice Guidelines for the Management of Cryptococcal Disease. *CID* 2000;30:710-718.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T . *Molecular cloning* (Vol. 2, pp. 14-9). New York: 1989 ;Cold spring harbor laboratory press.

Sanchez A, Guiang K, Larsen RA, Bauer M, Thomas AM, Altomstone R, Fothergill AW, Rinaldi MG, Longley N, Muzoora C, Taseera K, Mwesigye J, Rwebembera J, Harrison TS. Correlation of susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans* to fluconazole with biological response and clinical outcome. In: *Abstract Book of the 8th Conference on Cryptococcus and Cryptococcosis.* 2011 maio 2-6. Charleston, Carolina do Sul. Estados Unidos:p44

Sar B, Monchy D, Vann M, Keo C, Sarthou JL, et al. Increasing in vitro resistance to fluconazole of *Cryptococcus neoformans* Cambodian isolates: April 2000 to March 2002. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54: 563-565

Serena C, Fernández-Torres, Pastor FJ, Trilles L, Lazéra MS, Nolard N et al. In vitro interactions of micafungin with other antifungal drugs against clinical

isolates of four species of *Cryptococcus* . Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 2994-6

Serena C, Pastor FJ, Marine M, Rodriguez MM, Guarro J. Efficacy of voriconazole in a murine model of cryptococcal central nervous system infection. J Antimicrob Chemother 2007; 60 : 162-5

Shadomy S, Wagner G, Espinell-Ingroff A, Davis BA. In vitro studies with combinations of 5-fluorocytosine and amphotericin B. Antimicrob Agents Chemother 1975; 8: 117- 21

Schaffner A, Bohler A . Amphotericin B refractory aspergillosis after itaconazole: evidence for significant antagonism. Mycoses 1993; 36: 421- 4

Scheven M, Self L. Quantitative determination of fluconazole-amphotericin B antagonism to *Candida albicans* by agar diffusion. Mycoses 1994; 37: 205-7

Silva PR, Rabelo RAS. Suscetibilidade a antifúngicos de variedades de *Cryptococcus neoformans* isoladas de pacientes em hospital universitário. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2008; 41(2):158-162.

Silva DC, Martins MA, Szeszs MW, et al. Susceptibility to antifungal agents and genotypes of Brazilian clinical and environmental *Cryptococcus gattii* strains. Diagnostic Microbiology & Infectious Disease. Volume 72, Issue 4, April 2012, Pages 332-339.

Sokol-Anderson M, et al. Role of cell defense against oxidative damage in the resistance of *Candida albicans* to the killing effect of amphotericin B. Antimicrobial agents and chemotherapy 32.5 (1988): 702-705.

Steenbergen JN, Shuman HA, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2001; vol. 98 no. 26:15245–15250.

Strob AJ. Monitoramento do perfil de sensibilidade a antifúngicos de 242 amostras clínicas de *Cryptococcus neoformans* do Estado de São Paulo, Brasil, no período de 1995 a 1999. [dissertação]. São Paulo:- Coordenação de Controle de Doenças da Secretaria de Estado de Saúde de São Paulo, Brasil,2007

Sudan A, Livermore J, Howard, SJ, Al-Nakeeb Z, Sharp A, Goodwin J, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of fluconazole for cryptococcal meningoencephalitis: implications for antifungal therapy and in vitro

susceptibility breakpoints. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2013 ; 57(6), 2793-2800.

Sugar AM. Use of amphotericin B with azole antifungal drugs: what are we doing? *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1907-12

Trilles L, Lazéra MDS, Wanke B, Oliveira RV, Barbosa GG, Nishikawa MM, et al. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*.2008; 103(5), 455-462.

Trosken ER, Fischer K, Volkel W, Lutz WK. Inhibition of human CYP19 by azoles used as antifungal agents and aromatase inhibitors, using a new LC-MS/MS method for the analysis of estradiol product formation. *Toxicology*. 2006; 219:33-40.

Turnidge JD, Gudmundsson S, Vogelmann B, Craig WA. The postantibiotic effect of antifungal agents against common pathogenic yeasts. *J Antimicrob Chemother* 1994; 34: 83-92

Vanden Bossche H, Marichal P, Odds FC. Molecular mechanisms of drug resistance in fungi. *Trends in microbiology*.1994; 2(10), 393-400.

van Duin D, Casadevall A, Nosanchuk JD. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* Reduces Their Susceptibilities to Amphotericin B and Caspofungin. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*. 2002; Vol. 46, No. 11:3394–3400.

Vidal JE, Penalva de Oliveira AC, Dauar RF, Boulware DR. Strategies to reduce mortality and morbidity due to AIDS-related cryptococcal meningitis in Latin America. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*.2013; 17(3), 353-362.

Vidal JE, Gerhardt J, Peixoto de Miranda ÉJ, Dauar RF, Oliveira Filho GS, Penalva de Oliveira AC, Boulware DR. Role of quantitative CSF microscopy to predict culture status and outcome in HIV-associated cryptococcal meningitis in a Brazilian cohort. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2012; 73(1), 68-73.

Walsh TJ , Pizzo PA . Treatment of systemic fungal infections : recent progress and current problems. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1988; 7: 460-75

Walton FJ, Idnurm A, Heitman J. Novel gene functions required for melanization of the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology*. 2005; 57(5): 1381–1396.

Wang Y, Aisen P, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: mechanism of action. *Infection and immunity*.1995; 63(8), 3131-3136.

Wang Y, Casadevall A . Growth of *Cryptococcus neoformans* in presence of L-dopa decreases its susceptibility to amphotericin B. *Antimicrobial agents and chemotherapy*.1994; 38(11), 2648-2650.

Wang JM, Zhou Q, Cai HR, Zhuang Y, Zhang YF, Xin XY et al. Clinicopathological features of pulmonary cryptococcosis with cryptococcal titan cells: a comparative analysis of 27 cases. *International journal of clinical and experimental pathology*.2014; 7(8), 4837.

Warnock DW, Jonson EM, Rogers TRF Multi-centre evaluation of the Etest method for antifungal drug susceptibility testing of *Candida* spp and *Cryptococcus neoformans* *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1998; 42, 324-331.

WHO. Diagnosis, Prevention and Management of Cryptococcal Disease in HIV –infected Adults, Adolescents and Children. December 2011.

Wickes BL, Mayorga ME, Edman U, Edman JC. Dimorphism and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*: Association with the a-mating. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996; Vol. 93: 7327-7331.

Witt MD, Lewis RJ, Larsen RA et al. Identification of patients with acute AIDS-associated cryptococcal meningitis who can be effectively treated with fluconazole: the role of antifungal susceptibility testing. *Clin Infect Dis* 1996; 22: 322-8

White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11: 382-402

Yamazumi T, Pfaller MA, Messer SA et al. Characterization of heteroresistance to fluconazole among clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 267-72

Yildiran ST, Fothergill AW, Sutton DA, Rinaldi MG. In vitro susceptibilities of cerebrospinal fluid isolates of *Cryptococcus neoformans* collected during a ten-year period against fluconazole, voriconazole and posaconazole (SCH56592). *Mycoses* 2002; 45: 378-83

Zaragoza O, Garcia-Rodas R, Nosanchuk JD, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL, Casadevall A. Fungal Cell Gigantism during Mammalian Infection *Pathogens*. 2010; Volume 6 Issue 6.

Zaragoza O, Mesa-Arango AC, Gómez-López A, Bernal-Martinez L, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Process analysis of variables for standardization of antifungal susceptibility testing of non-fermentative yeasts. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55(4): 1563-1570.

Zaragoza O, Nielsen K. Titan cells in *Cryptococcus neoformans*: cells with a giant impact. *Current opinion in microbiology.* 2013; 16(4), 409-413.

APÊNDICE

APÊNDICE 1: Valores dos testes de suscetibilidade a antifúngicos dos isolados obtidos das amostras dos 6 pacientes com criptococose no sistema nervoso central, internados no IIER

P.	Contagem (CSF)	FICI 5-FC e AMB	FICI Interpretação	mg/L 5-FC				mg/L AMB				FICI	MIC (mg/L) FCZ	
				MIC XADREZ	combinação	FIC	E-test*	MIC MACRO	MIC XADREZ	combinação	FIC		E-test *	MIC MACRO
1	495	2.25	ANTAGONISMO	≤100	400	4	0.012	0.25	1,75	0,5	0,285	4,3	32	10
2	618	1,14	INDIFERENÇA	200	100	0,5	0.003	0.5	1.75	0.25	0,142	0,64	6	40
3	6	3,8	ANTAGONISMO	200	700	3,5	0.016	0.5	1	0,75	0,75	4,25	16	20
4	1048	1.25	INDIFERENÇA	≤100	300	3	0.032	0.5	1.75	1	0,57	3,57	16	20
5	246	1,35	INDIFERENÇA	800	800	1.5	0.023	0.5	2.5	1.5	0,6	2,1	16	100
6	470	7,5	ANTAGONISMO	≤100	700	7	0.002	0,5	2.5	1	0,4	7,4	64	60

APÊNDICE 2: Dados clínicos e laboratoriais dos 6 pacientes com criptococose no sistema nervoso central, internados no IIER

Id.	Idade (anos)	Aglutinação em latex	Cultura de sangue e/ou outros	Cultura urina	Sinais e sintomas da criptococose	Presença de lesões extra neurais	Carga Viral *	CD4 e CD8 (células/mm³)	Pressão de abertura (mmHg)	Tratamento Dose (antifúngicos)
1	21	Reagente	Sangue: neg	Neg	Cefaleia, náuseas, vômitos, febre	Lesões vesico-pruriginosas pelo corpo	339615	CD4: 47 CD8: 672	18	AmB 1mg/k/dia + FCZ 400mg 12/12h (4 semanas)
2	43	Reagente	Sangue: pos Biópsia de pele: pos	NR	Cefaléia, náuseas, vômitos e confusão mental	Pneumonite, lesões em pele (em tronco e membros)	107125	CD4: 43 CD8: 930	19,5	AmB 1mg/k/dia + FCZ 400 mg 12/12 hrs (4 semanas)
3	45	Reagente	Neg	Neg	Cefaleia, náuseas, vômito e tontura	Pneumonia Lesões hiper Cromicas, violáceas pelo corpo (Sarcoma de Kaposi)	213	CD4: 102 CD8: 576	20	AmB 1mg/k/dia + FCZ 400mg 12/12 por 5 dias Trocado por AmB lipossomal 165mg 1/dia e FCZ 400mg 12/12h (2 semanas)
4	59	NR	NR	NR	Cefaléia, tontura, náusea	----	1935	CD4: 33 CD: 837	50	AmB 1mg/k/dia + FCZ 400mg 12/12 (4 semanas)
5	23	Não Reagente	Sangue: pos biópsia de pele: pos	NR	Cefaleia, dor muscular	Lesões na pele no rosto (molusco contagioso)	11061	CD4: 6 CD8: 270	75	AmB 1mg/k/dia + FCZ 400mg12/12 (4 semanas)
6	40	NR	NR	NR	Dor muscular	----	indetectável	CD4: 151 CD8: -	40	AmB 1mg/k/dia +FCZ 400mg 12/12 por 4 semanas + 5FC (100mg/Kg/dia) 6/6h

ANEXOS

PROJETO DE PESQUISA

Título: Estudo de características dos agentes de criptococose: genótipos, pleomorfismo, melanização e suscetibilidade a antifúngicos

Área Temática: Área 8. Pesquisa com cooperação estrangeira.

Pesquisador: MARCIA DE SOUZA CARVALHO MELHEM

Versão: 1

Instituição: Instituto Adolfo Lutz

CAAE: 03461712.9.0000.0059

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 50200

Data da Relatoria: 21/06/2012

Apresentação do Projeto:

O presente estudo pretende analisar isolados de *C. neoformans* e *C. gattii*, fungos causadores da criptococose, que é uma infecção oportunista que acomete pacientes com deficiência do sistema imunológico. A criptococose pode acometer vários órgãos, porém o mais importante é o cérebro causando a meningite criptocócica. Esta doença continua a ser uma das principais causas de morte em pacientes com Aids na África, Ásia e Brasil. O gerenciamento farmacológico das infecções por *Cryptococcus* depende do estado imunitário do paciente, mas consiste de uma terapia primária com anfotericina B, com ou sem 5-fluorocitosina, quase sempre seguido de terapia de manutenção, ou uma longa terapia supressiva, com alguns azóis, principalmente fluconazol. Estudos indicam que *C. gattii* é menos sensível aos antifúngicos empregados para tratamento da criptococose, em relação a *C. neoformans*, a extensão desse fato, o mecanismo e a origem da resistência, ainda estão por ser esclarecidos. Por estas razões é necessária avaliação contínua da suscetibilidade de cepas de *C. neoformans* aos agentes antifúngicos e este estudo pretende comparar as taxas de resistência entre as duas espécies obtidas de pacientes, de modo a confirmar a diferença entre as duas espécies. O estudo da suscetibilidade por curvas de morte será desenvolvido em continuidade a trabalho publicado pelo grupo e pioneiro no Brasil (Pappalardo et al., 2009). O método de suscetibilidade quantitativo é inédito no Brasil. Ambos poderão fornecer resultados mais fidedignos do que o método de microdiluição quanto à ocorrência de isolados resistentes de *Cryptococcus* spp. A ocorrência de pleomorfismo, seja gigantismo-nanismo ou filamentação, em isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* pode estar relacionada à virulência. Se for comprovado que cepas polimórficas apresentam distintos perfis de virulência a evolução clínica poderia ser influenciada por essa característica do agente etiológico.

Objetivo da Pesquisa:

Caracterização de isolados clínicos dos agentes da criptococose: *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* no Estado de São Paulo quanto ao tipo molecular, presença de pleomorfismo, produção de melanina e resistência a antifúngicos.

Analisar a frequência de pleomorfismo, segundo tamanho celular (gigantismo e nanismo) e presença de pseudo-hifa; Investigar resistência a antifúngicos em isolados pleomórficos: difusão em ágar com fitas Etest® para fluconazol e anfotericina B por metodologia de curvas de morte para anfotericina B Determinar a espessura da parede celular e produção de melanina dos isolados pleomórficos Avaliar frequência e distribuição dos tipos moleculares por metodologia de PCR-RFLP em isolados pleomórficos; Analisar método quantitativo com inóculo individualizado para determinação de resistência ao fluconazol e anfotericina B com vistas ao prognóstico.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Não há risco identificado ao sujeito de pesquisa.

Benefícios: A demonstração da ocorrência de cepas polimórficas e/ ou resistentes, bem como tipos moleculares reconhecidos como mais virulentos servirá de subsídio para estudos de correlação clínica. Além disso, a avaliação de novos métodos de identificação de fenótipos resistentes a anfotericina B e fluconazol poderá resultar na implantação de nova metodologia na rotina de apoio diagnóstico para casos de criptococose tratados com esses fármacos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A constatação da ocorrência de cepas polimórficas com presença de células gigantes resistentes a antifúngicos poderá trazer novos conhecimentos que contribuiriam para terapêutica mais adequada de casos de criptococose e desenvolvimento de novos fármacos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Considero que o presente estudo atende aos aspectos éticos presentes na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde

Recomendações:

Recomendo a aprovação do projeto.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Sim

Considerações Finais a critério do CEP:

Aguardar a manifestação da CONEP sobre o protocolo de pesquisa, por ter sido indicada a participação estrangeira no Centro de Referência Instituto Nacional de Salud Carlos III, Majadahonda, Espanha, para a etapa relacionada às cepas de microrganismos.

Na data de emissão desse parecer estavam pendentes os pareceres de algumas co-participantes. As mesmas deverão ser apresentadas antes do início do projeto.

O presente projeto, seguiu nesta data para análise da CONEP e só tem o seu início autorizado após a aprovação pela mesma.

SAO PAULO, 04 de Julho de 2012

Assinado por:
Luz Marina Trujillo

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo de características dos agentes de criptococose: genótipos, pleomorfismo, melanização e suscetibilidade a antifúngicos

Pesquisador: MARCIA DE SOUZA CARVALHO MELHEM

Área Temática: Área 8. Pesquisa com cooperação estrangeira.

Versão: 2

CAAE: 03461712.9.0000.0059

Instituição Proponente: Instituto Adolfo Lutz

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 134.359

Data da Relatoria: 29/08/2012

Apresentação do Projeto:

Apresentação do Projeto: O presente estudo pretende analisar isolados de *C. neoformans* e *C. gatti*, fungos causadores da criptococose, que é uma infecção oportunista que acomete pacientes com deficiência do sistema imunológico. Este estudo tem colaboração estrangeira, no qual haverá análise das imagens geradas de cepas no Centro de Referência Instituto Nacional de Salud Carlos III, Majadahonda, Espanha.

Introdução: A criptococose é causada por duas espécies de leveduras: *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*. Na atualidade, são aceitos oito subtipos moleculares entre as duas espécies. De acordo com a literatura, os agentes têm predileção para o sistema nervoso central, causando altas taxas de mortalidade. A meningite criptocócica é, geralmente, tratada com a terapia de indução de anfotericina B, seguido por fases de consolidação e manutenção com fluconazol. As principais características utilizadas na identificação de espécies de *Cryptococcus* spp. são a observação no exame direto por coloração por tinta da China, tanto do material biológico quanto do isolado, de células leveduriformes com ou sem brotamento, envoltas pela cápsula mucopolissacarídica. Entretanto, diversos estudos têm demonstrado que *Cryptococcus* spp. pode apresentar alterações em seu aspecto morfológico como mecanismo que o tornam capaz de resistir às pressões do ambiente e logo a persistir no hospedeiro. Outra questão importante abordado pelo estudo, são as mudanças fenotípicas, associadas a distintos perfis de virulência e resistência, em isolados de *Cryptococcus* spp., tais como: desenvolvimento de formas anãs (~1 micron), gigantes- titan cells (~28 micra) e formação de pseudo-hifas. Essas atipias ainda não têm explicação, clara e precisa,

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 1º SUBSOLO, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.750-521

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5878

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



quanto à sua extensão, ocorrência, origem e impacto na instalação e evolução da doença. Por outro lado, indicam que a população celular de *Cryptococcus* está em processo adaptativo dinâmico e que o sistema imune confronta células com características variadas. A ocorrência de pleomorfismo, seja gigantismo-nanismo ou filamentação, em isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* pode estar relacionada à virulência. Se for comprovado que cepas polimórficas apresentam distintos perfis de virulência, a evolução clínica poderia ser influenciada por essa característica do agente etiológico. Além disso, a constatação da ocorrência de cepas polimórficas com presença de células gigantes resistentes a antifúngicos poderia trazer novos conhecimentos que poderão contribuir para terapêutica mais adequada de casos de criptococose e desenvolvimento de novos fármacos.

Hipótese: Cepas polimórficas e/ou resistentes a antifúngicos podem ocorrer em isolados clínicos dos agentes da criptococose no Brasil?

Metodologia: 1. Todos os isolados serão analisados sob microscópio ótico (400x) com uma gota de tinta da China. A microscopia ótica será realizada no Núcleo de Micologia do Instituto Adolfo Lutz, será utilizada para triagem de pleomorfismo. Isolados com pseudo-hifa ou com células gigantes ou com nanismo serão fotografados, as fotos serão enviadas, eletronicamente para centro de referência Instituto Nacional de Salud Carlos III, Majadahonda, Espanha (Dr. Oscar Zaragoza) para confirmação do pleomorfismo celular. A análise da parede celular dos isolados com grupos celulares, gigantes ou com nanismo, será realizada em microscópio eletrônico de transmissão no Núcleo de Microscopia Eletrônica do Instituto Adolfo Lutz. Todos os isolados serão, a seguir, submetidos a ensaios para verificação da produção de melanina, segundo a cor expressa na colônia semeada em meio L-DOPA. Todos os isolados serão submetidos aos procedimentos para determinação de suscetibilidade a antifúngicos. O sistema E-test composto de fitas impregnadas com antifúngicos será usado para determinação da suscetibilidade de todos os isolados de micoteca, além dos isolados clínicos provenientes do IIER. Os testes serão realizados com fitas contendo fluconazol e fitas de anfotericina B (bioMérieux, Fr), segundo orientação do fabricante. Para anfotericina B será também empregado o método de curvas de morte para avaliação da eficácia do fármaco. Será usado o método validado pela literatura para isolados clínicos provenientes dos pacientes do IIER. Os testes serão realizados com fluconazol e anfotericina B e a base metodológica seguirá aquela prevista para a microdiluição segundo documentos M27A3 e M27S3 (CLSI, 2008), com inóculo individualizado para cada isolado. A contagem de ufc/mL de líquido cefalorraquidiano existente na primeira amostra coletada, antes do tratamento será a base para confecção do inóculo. O inóculo, assim preparado, é denominado inóculo paciente-específico ou inóculo individualizado e sua concentração, empregada no teste, será confirmada através de plaqueamento e contagem de ufc/mL. Caso ocorra variação de 10% ou

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 1º SUBSOLO, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



mais, em relação à concentração desejada, o teste será repetido. A gama de concentrações de anfotericina B avaliadas será de 0 a 3,5 mg/L. Para as análises moleculares usadas na genotipagem de todos os isolados, clínicos e ambientais, será aplicada a técnica de PCR-RFLP. Todos os testes serão realizados em duplicata. Em todos os métodos serão utilizadas cepas-padrão sob as mesmas condições experimentais dos isolados de *Cryptococcus* spp. Para os ensaios moleculares serão utilizadas cepas-padrão correspondentes aos quatro genótipos de *C. neoformans*: VNI - WM 148 , VNII- WM 626, VNIII- WM 628 e VNIV- WM 629 e 4 genótipos de *C. gattii*: WM 179 (sorotipo B, VGI), WM 178 (sorotipo B, VGII), WM 161 (sorotipo B, VGIII) e WM 779 (sorotipo C, VGIV) cedidas pela referência internacional, para a este trabalho, Prof. Dr. Wieland Meyer (Universidade de Sydney, Austrália). Para os testes de suscetibilidade a antifúngicos serão usadas as cepas-padrão *Candida krusei* ATCC 6258 e *C. parapsilosis* ATCC 22019. Nos ensaios de melanização e curvas de morte será empregada a cepa-padrão *C. neoformans* ATCC 90014.

Critérios de Inclusão/ Exclusão: Não se aplica.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Caracterização de isolados clínicos dos agentes da criptococose, *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* - no estado de São Paulo quanto ao tipo molecular, presença de pleomorfismo, produção de melanina e resistência a antifúngicos.

Objetivo Secundário: Analisar a frequência de pleomorfismo, segundo tamanho celular (gigantismo e nanismo) e presença de pseudo-hifa; Investigar resistência a antifúngicos em isolados pleomórficos: difusão em ágar com fitas Etest® para fluconazol e anfotericina B por metodologia de curvas de morte para anfotericina B Determinar a espessura da parede celular e produção de melanina dos isolados pleomórficos Avaliar frequência e distribuição dos tipos moleculares por metodologia de PCR-RFLP em isolados pleomórficos; Analisar método quantitativo com inóculo individualizado para determinação de resistência ao fluconazol e anfotericina B com vistas ao prognóstico.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: O risco de não ocorrer caso de criptococose no período definido para o estudo (um ano a partir da aprovação do projeto), impedindo a avaliação do método quantitativo de resistência a anfotericina B e fluconazol.

Benefícios: A demonstração da ocorrência de cepas polimórficas e/ ou resistentes, bem como tipos moleculares reconhecidos como mais virulentos servirá de subsídio para estudos de correlação clínica. Além disso, a avaliação de novos métodos de identificação de fenótipos resistentes a anfotericina B e fluconazol poderá resultar na implantação de nova metodologia na rotina de apoio

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 1º SUBSOLO, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.750-521

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5878

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



diagnóstico para casos de criptococose tratados com esses fármacos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Não se aplica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Não se aplica.

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não se aplica.

Situação do Parecer:

Devolvido

Considerações Finais a critério da CONEP:

Após análise da documentação encaminhada, por tratar-se de envio de material biológico não humano, a CONEP esclarece que essa pesquisa não se enquadra em nenhuma Área Temática Especial do Grupo I.

Nesse caso, a aprovação ética é delegada ao Comitê de Ética em Pesquisa da instituição, devendo ser seguido o procedimento para projetos que não são do Grupo I, conforme o fluxograma disponível no site: <http://conselho.saude.gov.br> e no Manual Operacional para CEP.

Diante do exposto, esta comissão delibera por devolver o protocolo em questão.

BRASILIA, 30 de Outubro de 2012

Assinador por:
Aníbal Gil Lopes
(Coordenador)

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 1º SUBSOLO, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 1º SUBSOLO, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

**INSTITUTO ADOLFO LUTZ
INSTITUTO DE INFECTOLOGIA EMILIO RIBAS
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

Nome do estudo: **Estudo de características dos agentes de criptococose: genótipos, polimorfismo, melanização e suscetibilidade a antifúngicos**

Pesquisadores responsáveis: Dra. Marcia de Souza Carvalho Melhem, Dra. Mara Pappalardo e Dr. José Ernesto Vidal Bermúdez

Unidade do Estudo: Instituto de Infectologia Emilio Ribas

Duração da pesquisa: 1 ano

PROPOSTA

Você (ou seu familiar) foi admitido neste hospital devido a suspeita de uma doença infecciosa conhecida como criptococose. A criptococose é causada por um fungo chamado *Cryptococcus* que acomete o cérebro e manifesta-se com alterações do sistema nervoso como dor de cabeça, convulsões, fraqueza, sonolência, confusão, dentre outras.

Para o diagnóstico da suspeita de criptococose são utilizados exames clínicos, exames de imagem do cérebro como tomografia computadorizada ou ressonância nuclear magnética e exames laboratoriais. Os exames laboratoriais são realizados em amostras de líquido (líquido coletado na coluna vertebral).

Todos os exames necessários para o diagnóstico laboratorial da criptococose serão realizados na sua (ou de seu familiar) amostra de líquido (líquido coletado na coluna vertebral) para a confirmação desta infecção.

Com o objetivo de melhorar o diagnóstico laboratorial desta doença, estamos testando uma nova metodologia. Por se tratar de nova metodologia, os resultados obtidos devem ser comparados com os exames já realizados na rotina do laboratório.

O objetivo desta carta é convidá-lo (você ou seu parente) a participar da pesquisa. Caso você aceite participar, suas três amostras de líquido coletadas para exames de rotina, no 1º, 7º e 14º dias da doença, serão encaminhadas para a realização da pesquisa. Portanto, não será coletada uma nova amostra de líquido especificamente para esta pesquisa.

Este estudo foi revisado e aprovado por um Comitê de Ética em Pesquisa e está de acordo com a Resolução Nº 196, de 10 de outubro de 1996 do Conselho Nacional de Saúde que regulamenta pesquisas envolvendo seres humanos, e com a Declaração de Helsinque que regulamenta a pesquisa médica em humanos.

Riscos e Benefícios

A coleta de líquido é um procedimento de rotina para esta doença. Será realizada por um médico especializado e será feita por meio de injeção na coluna lombar com agulha e seringa estéreis. Pode ocorrer dor local durante o procedimento e dor de cabeça depois da coleta de líquido, porém é pouco comum e pode ser medicada.

O controle rigoroso da hipertensão intracraniana por meio das coletas de líquido são decisivos para que tenha a melhora desta doença. Porém, somente no final da pesquisa poderemos concluir se este trabalho trouxe algum benefício para o diagnóstico desta doença. Talvez você tenha benefício de imediato com a pesquisa, mas o estudo pode ajudar, no futuro, outros pacientes que tenham a criptococose.

Participação na Pesquisa

A sua participação neste estudo é voluntária. Se você estiver com esta infecção, seu diagnóstico e tratamento prosseguirão normalmente, a cargo dos médicos que lhe acompanham, e não será modificado de maneira alguma caso você participe ou não da pesquisa. Você também poderá retirar-se da pesquisa a qualquer momento e não será prejudicado por isso.

Este estudo não implica qualquer ônus para o paciente, assim como não trará nenhuma despesa financeira por sua participação.

Informações adicionais e Confidencialidade

Serão necessários dados dos prontuários quanto ao sexo, idade, sinais e sintomas da criptococose, infecção ou não por HIV ou outra doença, carga viral, valores de células CD4 e CD8, uso de antifúngicos e evolução da doença. Todas as informações coletadas serão mantidas confidencialmente. Serão guardadas, sem identificação, em um computador e seu nome não aparecerá em nenhuma publicação. Você poderá ter acesso aos resultados dos seus exames durante o estudo, bem como terá acesso, se assim desejar, as publicações pertinentes.

Dúvidas em relação à Pesquisa

Se você quiser saber mais sobre a pesquisa ou tiver alguma dúvida, você poderá telefonar para a Dra. Marcia de Souza Carvalho Melhem (telefone 11- 3068 2890 ou 11-99685 5034). Você poderá também telefonar para a Dra. Mara Pappalardo (11-3896 1200 Ramal 1226), para o Dr. José Ernesto Vidal Bermúdez (11-99588 8756), para o Comitê de Ética do Instituto de Infectologia Emilio Ribas (11-3896 1406) ou para o Comitê de Ética do Instituto Adolfo Lutz (11-3068 2859).

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO:

Título do protocolo: **Estudo de características dos agentes de criptococose: genótipos, pleomorfismo, melanização e suscetibilidade a antifúngicos**

Eu, _____, li (ou ouvi a leitura sobre) as informações contidas neste termo de consentimento. Compreendi os possíveis riscos e benefícios da pesquisa para minha doença. Tive oportunidade de fazer perguntas e recebi respostas para todas as minhas dúvidas.

Minha participação nesta pesquisa é voluntária e posso me retirar a qualquer momento, por qualquer razão, sem que a minha decisão de desistir prejudique meu diagnóstico e tratamento.

Uma cópia assinada deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará em meu poder.

Nome do voluntário ou do responsável legal: _____

Assinatura: _____ Data: ___/___/___.

Assinatura do pesquisador: _____ Data: ___/___/___.

TERMO DE ASSENTIMENTO PARA MENORES DE 18 ANOS

A doença que você tem pode ser causada por um fungo que está no ar e o nome dela é criptococose. Para ter certeza da doença o médico fará exames e alguns deles serão feitos no líquido da sua coluna vertebral (líquido da espinha). O médico vai colher o líquido algumas vezes para fazer todos esses exames.

Eu sou farmacêutica e estou fazendo um estudo sobre um novo exame para a criptococose. Eu estou convidando você a participar dessa pesquisa. Caso você aceitar participar dela, três amostras do líquido espinhal que serão colhidos pelo médico, serão levadas ao laboratório onde eu trabalho para ser feito o novo teste. As três amostras para a pesquisa serão aquelas colhidas no 1º, 7º e 14º dia da doença. Nenhuma amostra será colhida somente para a pesquisa. Todas as amostras do líquido usadas na pesquisa serão as colhidas pelo médico para tratamento de sua doença.

É importante você saber que o tratamento da sua doença será feito no hospital mesmo que você não queira participar da pesquisa.

Se você quiser participar da pesquisa seu nome será mantido em segredo.

Se você quiser saber mais sobre a pesquisa ou tiver alguma dúvida, você pode telefonar para mim Dra. Marcia de Souza Carvalho Melhem (telefone 11-3068 2890 ou 11-99685 5034). Você poderá também telefonar para a Dra. Mara Pappalardo (11-3896 1200 Ramal 1226), para o Dr. José Ernesto Vidal Bermúdez (11-99588 8756), para o Comitê de Ética do Instituto de Infectologia Emilio Ribas (11-3896 1406) ou para o Comitê de Ética do Instituto Adolfo Lutz (11-3068 2859).

**Nome do voluntário
menor de idade:** _____

Assinatura: _____ Data: __/__/__.

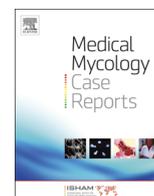
**Assinatura do
pesquisador:** _____ Data: __/__/__.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Medical Mycology Case Reports

journal homepage: www.elsevier.com/locate/mmcr

Report of filamentous forms in *a* mating type VNI clinical sequential isolates of *Cryptococcus neoformans* from an HIV virus-infected patient[☆]



Lidiane de Oliveira^a, Marilena dos Anjos Martins^a, José Ernesto Vidal^b, Maria Walderez Szeszs^a, Mara Cristina S. Martins Pappalardo^b, Marcia Souza Carvalho Melhem^{a,*}

^a Instituto Adolfo Lutz, Av Dr. Arnaldo n 351, São Paulo, Postal Code 01246-000, Brazil

^b Instituto de Infectologia Emilio Ribas, Av Dr. Arnaldo n 165, São Paulo, Postal Code 01246-900, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 June 2014

Received in revised form

3 November 2014

Accepted 17 November 2014

Keywords:

Cryptococcus neoformans

Amphotericin B

Fluconazole

Fingerprinting

ABSTRACT

We reported a cryptococcal meningitis Aids-patient infected with *a* mating type VNI isolate showing filamentous cells in direct examination of cerebrospinal fluid. Clinical data, outcome, treatment features and microbiological findings were discussed.

© 2014 Published by Elsevier B.V. on behalf of International Society for Human and Animal Mycology.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>).

1. Introduction

Cryptococcosis is one of the most life-threatening mycoses affecting human hosts. It is estimated that about 957,000 cases presenting the serious meningeal form of disease occur annually worldwide associated with the human immune deficiency virus infection (HIV), leading to 600 thousand deaths [1]. In Brazil, the disease represents the primary cause of opportunistic meningitis and the second most frequent neurologic opportunistic infection in HIV virus-infected patients [2]. The main etiological agents present MAT α and MAT α sexual states and at least 8 molecular types: VNI, VNII, VNIII and VNIV for *Cryptococcus neoformans* and VGI, VGII, VGIII and VGIV for *Cryptococcus gattii*. Various studies have reported that the two species differ in many aspects including epidemiological, virulence, and antifungal resistance differences resulting in distinct clinical presentation and clinical outcome [3]. Similar to the majority of regions where it manifests worldwide, overall in Brazil the main causative agent is *C. neoformans* VNI alpha mating type [4]. All molecular subtypes enclosing the two species are morphologically identical with typical capsulated, rounded to elongated budding cells, measuring 5–7 μ m in

diameter. Nevertheless, previous studies have reported the occurrence of giant cells (titan cells) and microforms or even hyphal forms besides normal cells [5,6,7]. We report a case of cryptococcal meningitis caused by *a* mating-type VNI *C. neoformans* showing filamentous cells in Indian ink preparation of cerebrospinal fluid (CSF) examination.

2. Case

A male patient 43-old, native of La Paz city in Bolivia and living in São Paulo City, Brazil for the last 15 years, was admitted to Emilio Ribas Institute of Infectious Diseases, a tertiary public hospital in São Paulo, Brazil. The patient presented headache, nausea, vomiting and mental confusion. He presented umbilicated papule skin lesions on the trunk and limbs, besides pulmonary and meningeal symptoms. Thorax computed tomography (CT) for screening of fungal lesions indicated pneumonitis. Laboratory results showed both positive India ink preparation and qualitative latex agglutination in CSF. The leukocytes counting revealed 7 cells/mm³ with a predominance of lymphocytes (87%), protein level of 78 mg/dL and glucose level of 34 mg/dL. The serology for HIV virus was positive, viral burden was 925 viral copies/mL, and CD4 cell count was 43 cells/mm³. Table 1 shows the principal features from the case reported.

The blood culture, CSF and skin tissue cultures yielded the recovery of typical cryptococci encapsulated yeasts. CFS samples

[☆]This work was presented at the 9th Conference on *Cryptococcus* and Cryptococcosis, Amsterdam, The Netherlands, May 2014.

* Corresponding author.

E-mail address: melhemmr@uol.com.br (M.S.C. Melhem).

from day 0, 7, 14 and 21 were sent to Adolfo Lutz Institute, a Public Health Reference Laboratory for quantitative culture and identification by morphological and biochemical characteristics including CGB screening test to differentiate the species *C. neoformans* and *C. gattii*, molecular type testing, and antifungal susceptibility pattern.

Treatment began on the first day of hospitalization with deoxycholate amphotericin B (1 mg/kg/day) in combination with fluconazole (400 mg) twice a day for four weeks. Relief punctures were performed daily in the first seven days of treatment. The patient was discharged on the 30th day of hospitalization after two negative culture results, receiving fluconazole (consolidation phase with 800 mg/day). Two months later the individual's condition relapsed evolving to convulsions and the patient was re-hospitalized requiring combined antifungal therapy initially with amphotericin B and fluconazole for a month. Due to worsening of the neurological status, the patient was admitted to the intensive care unit. The results showed high fluconazole MIC (minimal inhibitory concentration). Cerebral MRI (Magnetic Resonance Imaging) resulted in findings compatible with parenchyma involvement. Fluconazole was switched to voriconazole (400 mg/day) twice a day. The strategy yielded CSF sterilization and the patient was discharged in a few weeks under a voriconazole therapy regimen. A second episode of clinical recurrence was verified four months later with clinical presentation of convulsions, headache, and trembling. Amphotericin B and fluconazole was re-introduced, but renal failure led to monotherapy with fluconazole. Clinical and laboratory cure was observed after 3 weeks.

Table 1
CSF findings during period of patient hospitalization.

Day	Results				Culture	Quantitative culture (cfu/mL)
	Protein (mg/dL)	Glucose (mg/dL)	Yeasts (mm ³)			
0	78	34	618	(pos)	440,000	
1	81	21	1420	(pos)	NP	
4	395	10	329	(pos)	NP	
7	207	7	128	(pos)	135	
12	81	18	NR	(pos)	NP	
14	61	26	10	(pos)	90	
17	44	21	16	(pos)	NP	
18	30	72	NR	(pos)	NP	
20	49	36	50	(neg)	NP	
22	56	40	NR	(neg)	0	

pos: positive; neg: negative; NP: Not Performed; CFU/mL: colony-forming units per milliliter of CSF.

The initial quantitative CSF culture, according to Robinson and co-authors (1999) showed high initial fungal burden (8.8×10^5 CFU/mL) dropping to 2.7×10^2 and 1.8×10^2 CFU/mL at day 7 and 14, respectively, followed by negative results on day 21. Pseudohyphal forms of fungal cells were observed in Indian ink examination only in the first CSF sample (Fig. 1). Otherwise primary and sequential cultures showed only normal budding cells. Multiple colonies ($n=19$) from quantitative cultures related to sequential CSF samples were collected to speciation. Genotypes were characterized through the use of URA5-restriction fragment length polymorphism analysis (URA5-RFLP) [3]. The genetic variability was determined following Ulrich and co-authors (2009) by using PCR-fingerprinting with the minisatellite-specific primer M13 (M13 PCR fingerprinting) [4] and the mating type was established by PCR as recommended by Chaturvedi and co-authors [8].

The following standard strains representing each molecular type were included in the analysis: WM 148 (serotype A, VNI/AFLP1), WM 626 (serotype A, VNII/AFLP1A), WM 628 (serotype AD, NIII/AFLP2), WM 629 (serotype D, VNIV/AFLP3), WM 179 (serotype B, VGI/AFLP4), WM 178 (serotype B, VGII/AFLP6), WM 175 (serotype B, VGIII/AFLP5), and WM 779 (serotype C, VGIV/AFLP7). *Filobasidiella neoformans* ATCC 28957 and ATCC 28958 were used as standard strains.

All multiple colonies were *C. neoformans* genotype VNI (Fig. 2), mating-type α and the M13 PCR fingerprinting (Fig. 3) of the 19 distinct colonies showed the same band patterns. Antifungal susceptibility test through broth micro dilution reference method (European Committee EUCAST AFST.EUCAST) was used to determine the minimal

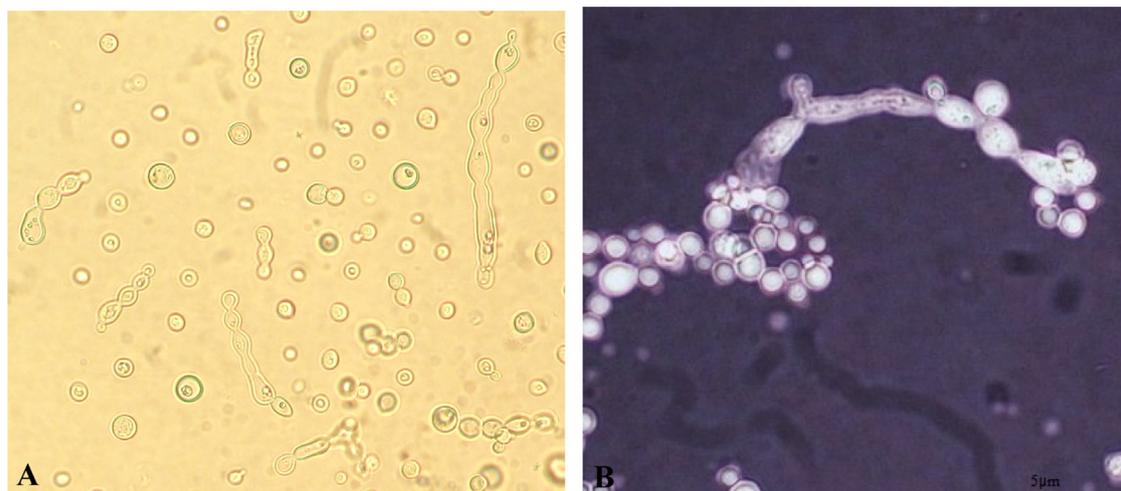


Fig. 1. Pseudohyphae observed in direct microscopy (A) and India Ink examination (B) of cerebral spinal fluid of Cryptococcal meningitis case.

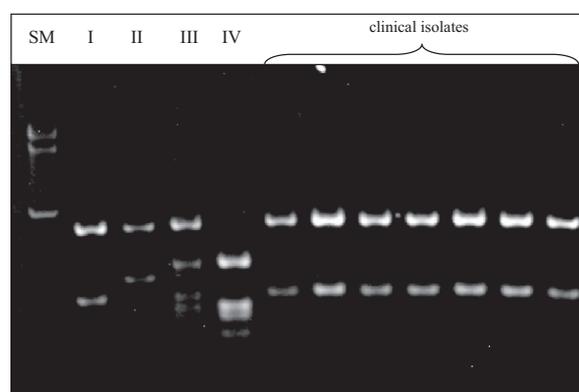


Fig. 2. Electrophoresis of PCR-RFLP products to determine molecular genotyping. SM: size marker 100bp; I, II, III and IV refer to genotypes VNI, VNII, VNIII and VNIV, respectively (W. Meyer strain-types).

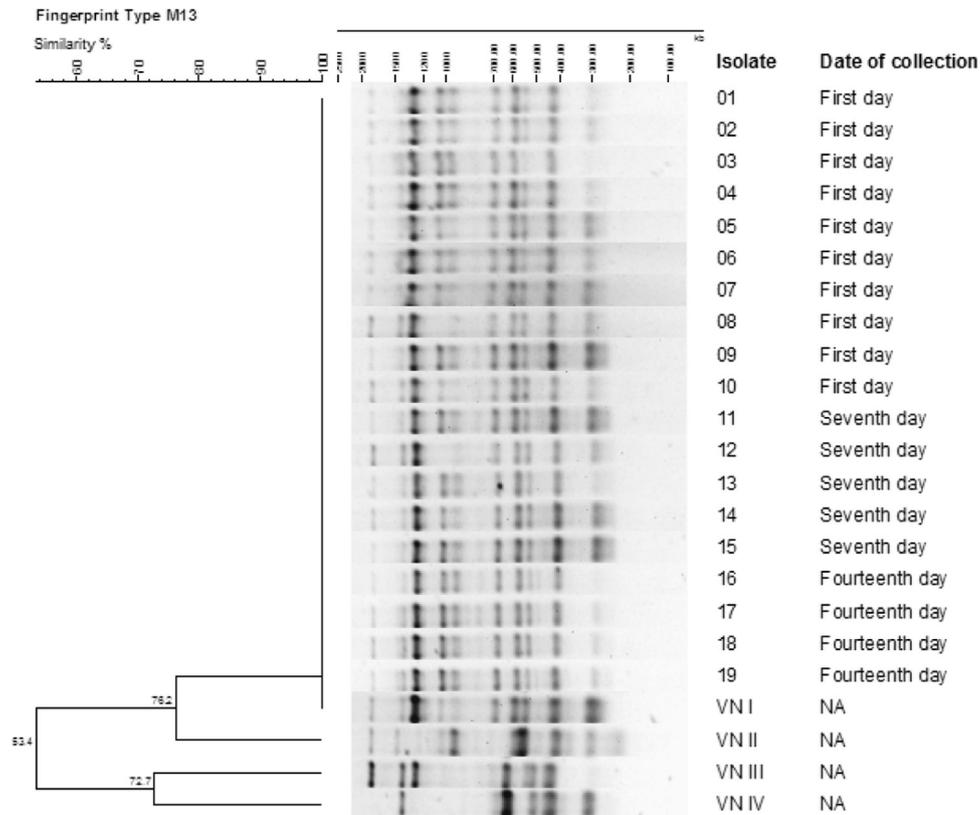


Fig. 3. Dendrogram of PCR-fingerprint profiles with primer M13, of 19 clinical isolates from a Cryptococcal meningitis case (BioNumerics, Dice coefficient and UPGMA).

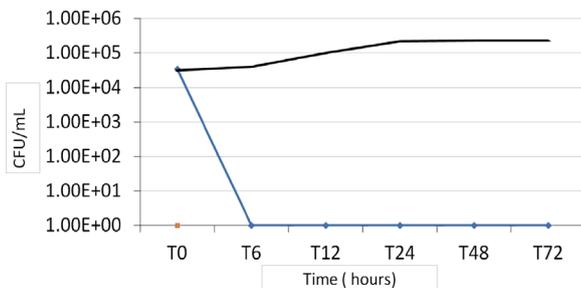


Fig. 4. Time-kill curve results of amphotericin B for 19 isolates of Cryptococcus patient. Black line, positive control.

inhibition concentration (MIC) of fluconazole and voriconazole. The commercial method of diffusion using the drug-containing strip Etest[®] was employed for testing amphotericin B. Homogeneous high MIC-values of fluconazole (MIC 16 mg/L) and voriconazole (MIC 0.25 mg/L), and low amphotericin B-MIC (0.064 mg/L) were found for all multiple colonies tested. The fungicidal activity of amphotericin B (1 mg/L) was assessed by time-kill curve tests demonstrating complete colony killing in the first 6 h drug-exposure for all multiple isolates (Fig. 4).

3. Discussion

Little is known about the occurrence of filamentation in *C. neoformans* cells although low virulence in filamentous forms have been previously reported in murine models [5–10]. One hypothesis is that pseudohyphal production is an adaptive mechanism to environmental pressures to yeast development. The occurrence of these morphological changes like increases in cell size or filamentation in isolates of *C. neoformans* may be related to virulence. Some authors reported the

interaction of *C. neoformans* and amoebas, like *Acanthamoeba polyphaga*, one of its natural predators, observing that, in addition of pseudohyphae formation, these structures could not be engulfed by amoebas, showing a form developed by yeast to ensure its survival in the environment [9]. However, low virulence was observed when these cells were subjected to tests *in vivo*. Similar results were found in rats, leaving a clear need for more studies on these findings [10]. Likewise, strains producing pseudohyphal forms were observed to be less phagocytosed by amoeba *Acanthamoeba castellanii* than the wild-type strain. However, mice inoculated with wild-type strain succumbed and were sacrificed 26 h after inoculation, whereas mice inoculated with pseudohyphal strains remained healthy during the same period. Later, some of these cases produced yeast cell forms causing disease in their hosts [11]. Another relevant morphologic alteration is the titan and microforms of *C. neoformans*. It has been demonstrated that titan cells are resistant to phagocytosis, they may evade immune cells in lungs of mice and could tolerate oxidative and nitrosative stresses [12].

All colonies showed identical band patterns by M13 PCR fingerprinting, suggesting that the patient was infected by only one strain and this strain persisted in all sequential CSF samples. The antifungal susceptibility patterns to amphotericin B, fluconazole, and voriconazole were identical for all the colonies. The success of the therapy was demonstrated by serial quantitative culture, which showed a considerable decrease in fungal load during treatment. Mortality is thought to be associated with a higher burden of infection, according one study that indicated the number of cryptococci cultured from the CSF as an independent predictor of early death [13]. The fungal burden by quantitative cultures in 14 day-therapy correlated with our patient's mycological response to treatment and has been confirmed to monitor the clinical outcome [14,15,16]. The combined therapy using amphotericin B and fluconazole resulted in clinical improvement. Interestingly, we observed this occurrence correlated with the good efficacy of amphotericin B *in vitro* demonstrated by

low MIC results as expected for this species [17]. Furthermore, the clear association between *in vivo* rapid fungal clearance and early *in vitro* killing effect provided a strong argument in favor of extending studies to evaluate the time-curve method as a tool to predict outcome. Despite that amphotericin B was introduced in the late 1950s, in addition to its dose-limiting toxicity, this agent remains the first-line induction treatment for cryptococcal meningitis [18]. It would be worthwhile to evaluate the potential of time kill curves in isolates with distinct susceptibility patterns and correlated with clinical outcome.

Our patient experienced two clinical relapse months after being discharged. Of note, the primary and sequential isolates of the etiologic agent showed high fluconazole-MIC and voriconazole-MIC values showing no correlation with the good outcome observed in our case. Globally, such high values are rarely observed for *C. neoformans* isolates, conversely to high fluconazole-MICs frequently found for *C. gattii* [16,17,19]. We found these findings have potential clinical implications, since this azole agent is the recommended standard to treat Cryptococcosis, particularly during the maintenance phase of antifungal treatment of cryptococcal in HIV virus-infected patients [3,18]. Although our patient had a good outcome before hospital discharge, he was re-admitted to the hospital a few months after the first episode. Infection relapse on commencement of fluconazole maintenance therapy associated with high fluconazole-MIC (> 8 mg/L) was previously reported [20]. However, there is no conclusive information about the clinical relevance of susceptibility tests in the management of cryptococcal meningitis. In addition, several factors are responsible for poor responses to fluconazole therapy in patients with HIV virus associated cryptococcal meningitis, mainly profound immunodeficiency as demonstrated in our patient and inadequate fluconazole exposure due to poor drug adherence as likely in this case. It is unclear whether clinical relapse is attributable to low susceptibility resistance of the isolates to fluconazole. Patient non-compliance is a factor that could have contributed to the observed clinical relapse. Further studies are necessary to explain the clinical relevance of filamentous forms and molecular profiles of the etiologic Cryptococcosis agent and its relationship with antifungal susceptibility changes.

Conflict of interest

There are none.

Acknowledgments

C. neoformans VNI, VNII, VNIII, and VNIV were generously provided by Wieland Meyer, Molecular Mycology Research Laboratory, Center for Infectious Diseases and Microbiology, Westmead Millennium Institute, Sydney Emerging Disease and Biosecurity Institute, Sydney Medical School, Westmead Hospital, University of Sydney, Westmead, NSW, Australia. We are grateful for the technical assistance of Andrés Avelino Baez and Lindete Adélia Moreira da Silva. Carlos Henrique Camargo, Bacteriology Department of Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brazil for assistance in analyzing dendrogram by BioNumerics Software. Jim Hesson of

AcademicEnglishSolutions.com revised the English. L.O. is supported by CAPES- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior from Ministry of Education and Culture (Brazil) (Grant no. 33115010001M8). MSCM was supported by FAPESP-Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (Brazil).

References

- [1] Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS* 2009;23(23):525–30.
- [2] Vidal JE, Penalva de Oliveira AC, Fink MC, Pannuti CS, Trujillo JR. AIDS related progressive multifocal leukoencephalopathy: a retrospective study in a referral center in Sao Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2008;50:209–12.
- [3] Meyer W, Castañeda A, Jackson S, Huynh M, Castañeda and IberoAmerican Cryptococcal Group. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerg Infect Dis* 2003;9(2):189–95.
- [4] Trilles L, Lazéra MS, Bodo Wanke B, Oliveira RV, Barbosa GG, Nishikawa MM, et al. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008;103(5):455–62 (Rio de Janeiro).
- [5] Kimura M, Furuta T, Teramura K, Satou T. Pseudohyphae of *Cryptococcus* in a cytologic specimen. *Acta Cytol* 1998;42:817–8.
- [6] Bava J, Solari R, Isla G, Troncoso A atypical forms of *Cryptococcus neoformans* in CSF of an AIDS patient. *J Infect Dev Ctries* 2008;2(5):403–5.
- [7] Zaragoza O, Nielsen K. Titan cells in *Cryptococcus neoformans*: cells with a giant impact. *Curr Opin Microbiol* 2013;16:409–13.
- [8] Chaturvedi S, Rodeghier B, Fan J, McClelland CM, Wickes BL, Chaturvedi V. Direct PCR of *Cryptococcus neoformans* MAT alpha and MAT a pheromones to determine mating type, ploidy and variety: a tool for epidemiological and molecular pathogenesis studies. *J Clin Microbiol* 2000;38:2007–9.
- [9] Neilson JB, Ivey MH, Bulmer GS. *Cryptococcus neoformans*: pseudohyphal forms surviving culture with *Acanthamoeba polyphaga*. *Infect Immun* 1978;20(1):262–6.
- [10] Fries BC, Goldman DI, Cherniak R, Ju R, Casadevall A. Phenotypic switching in *Cryptococcus neoformans* results in changes in cellular morphology and glucuronoxylomannan structure. *Infect Immun* 1999;67(No. 11):6076–83.
- [11] Magditch DA, Liu T-B, Xue C, Idnurm A. DNA mutations mediate microevolution between host-adapted forms of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Pathog* 2012;8(10):e1002936. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1002936>.
- [12] Okagaki LH, Nielsen K. Titan cells confer protection from infectious phagocytosis in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* 2012;11(6):820.
- [13] Brouwer AE, Rajanuwong A, Chierakul W, Griffin GE, Larsen RA, White NJ, et al. Combination antifungal therapies for HIV-associated cryptococcal meningitis: a randomised trial. *Lancet* 2004;363:1764–7.
- [14] Vidal JE, Gerhardt J, Peixoto de Miranda EJ, Dauar RF, Oliveira Filho GS, Penalva de Oliveira AC, et al. Role of quantitative CSF microscopy to predict culture status and outcome in HIV-associated cryptococcal meningitis in a Brazilian cohort. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012;73:68–73.
- [15] Robinson PA, Bauer M, Leal MAE, Evans SG, Holtom PD, Diamond DM, et al. Early mycological treatment failure in AIDS-associated cryptococcal meningitis. *Clin Infect Dis* 1999;28:82–92.
- [16] Jarvis JN, Casazza JP, Stone HH, Meintjes G, Lawn SD, Levitz SM, Harrison TS, Koup RA. The phenotype of the cryptococcus-specific CD4+ memory T-cell response is associated with disease severity and outcome in HIV-associated cryptococcal meningitis. *J Infect Dis* 2013;207:1817–28.
- [17] Espinel-Ingroff A, Chowdhary A, Cuenca-Estrella M, Fothergill A, Fuller J, Hagen F, 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* 2012 Jun;56(6):3107–13.
- [18] Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, et al. Practice guidelines for the management of cryptococcal disease. *Clin Infect Dis* 2010;50:291–322.
- [19] Espinel-Ingroff A, Aller AI, Canton E, Castañón-Olivares LR, Chowdhary A, Córdoba S, et al. *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* species complex: an international study of wild-type susceptibility endpoint distributions and epidemiological cutoff values for fluconazole, itraconazole, posaconazole and voriconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56(11):5898–906.
- [20] Cheong JWS, McCormack J. Fluconazole resistance in cryptococcal disease: emerging or intrinsic? *Med Mycol* 2013;51:261–9.