

Artigo especial

*Criptococose: Atualização e análise de dados laboratoriais sobre a frequência de *Cryptococcus gattii* no Estado de São Paulo numa série temporal de 11 anos*

*Cryptococcosis: Update and analysis of laboratory data on the frequency of *Cryptococcus gattii* in the State of São Paulo in a time series of 11 years*

Marilena dos Anjos Martins, Dayane Cristina da Silva Santos, Mirian Rando Araújo, Sandra Regina Brasil Stolf Pukinskas

Núcleo de Micologia do Instituto Adolfo Lutz. Secretaria de Estado da Saúde. São Paulo, Brasil

INTRODUÇÃO

A criptococose é micose sistêmica causada, principalmente, pelo complexo de espécies *C. neoformans/C. gattii*. É adquirida por inalação de propágulos dispersos no meio ambiente, sendo a meningoencefalite a manifestação clínica mais comum.¹⁻³ Cabe ressaltar que *C. gattii* forma, com mais frequência, nódulos tumorais únicos, ou múltiplos, nos pulmões e cérebro, denominados criptocomas, além de aumento de morbidade neurológica e baixa resposta à terapia antifúngica.⁴ A criptococose por *C. neoformans* apresenta distribuição global e é a maior causa de morbidade e mortalidade em indivíduos imunocomprometidos, principalmente aqueles com o vírus da imunodeficiência humana (HIV). A infecção por *C. gattii*, ao que parece, acomete, na maioria das vezes, pessoas imunocompetentes, sendo mais prevalente em regiões de clima tropical e subtropical. Sua detecção em regiões de clima temperado sugere que esta espécie se adapta às condições de novos meios.^{3,5,6,7} O diagnóstico laboratorial apresenta alguns problemas quanto à determinação correta do agente etiológico, pois nem todos os laboratórios diferenciam as espécies *C. neoformans* e *C. gattii* causando prejuízo na conduta terapêutica.

Este artigo tem como objetivo fazer breve atualização sobre a criptococose e seus

principais agentes, bem como realizar levantamento de dados laboratoriais para obter estimativa da frequência da infecção por *C. gattii* no Estado de São Paulo. Por apresentar aspectos clínico-epidemiológicos pouco conhecidos, é enquadrada como micose endêmica e necessita de abordagem distinta da criptococose oportunista por *C. neoformans*.⁸

Complexo de espécies *Cryptococcus neoformans/C. gattii*

Leveduras capsuladas do gênero *Cryptococcus* spp são os agentes etiológicos da criptococose. Embora compreenda aproximadamente 70 espécies, apenas *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* são considerados patogênicos.⁹

Anteriormente, *C. neoformans* estava dividido em duas variedades: var. *neoformans* (sorotipos A, D e AD) e var. *gattii* (sorotipo B e C). Devido às diferenças fenotípicas, genotípicas e epidemiológicas, houve a separação definitiva dessas variedades em duas espécies distintas: *C. neoformans* e *C. gattii*,^{10,11} sendo que *C. neoformans* apresenta duas variedades: var. *grubii* (sorotipo A) e var. *neoformans* (sorotipo D).^{12,13}

Estudos moleculares identificaram 8 tipos moleculares dentro do complexo de espécies

C. neoformans/C. gattii, a saber: VNI/AFLP1 e VNII/AFLP1A para *C. neoformans* var. *grubii*, sorotipo A; VNIII/AFLP2 para híbrido AD; sorotipo AD e VNIV/AFLP3 para *C. neoformans* var. *neoformans*, sorotipo D e, VGI/AFLP4, VGII/AFLP6, VGIII/AFLP5 e VGIV/AFLP7 para *C. gattii* sorotipo B e *C.*^{14,15}

Apesar de ser a nomenclatura mais aceita, existe a proposta do reconhecimento de 7 espécies, devido à significativa diversidade genética dentro do complexo de espécies *C. neoformans/C. gattii*.¹⁶

C. neoformans ocorre em todo o mundo e é o responsável pela maioria dos casos. *C. gattii*, originalmente, estava limitado às regiões tropicais e subtropicais, porém, um surto em Vancouver, Canadá e posterior dispersão para o noroeste dos Estados Unidos demonstrou que esta espécie pode se adaptar a regiões de clima temperado.^{2,6,17}

Na revisão de relatos brasileiros, *C. neoformans* e *C. gattii* foram encontrados em todas as regiões. De acordo com as tendências epidemiológicas, o Brasil foi dividido em: macro região norte (compreende os estados de Amazonas, Roraima, Pernambuco, Piauí e Bahia), endêmica para *C. gattii*, e macro região sul (compreende os Estados de Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná e Rio Grande do Sul), em que há predomínio da infecção por *C. neoformans*.¹⁸

A doença

A infecção é adquirida por inalação de propágulos infectantes. A forma pulmonar pode ser assintomática ou apresentar sintomas de infecção respiratória leve, com resolução espontânea. Também, poderá evoluir para formas pulmonares graves com insuficiência

respiratória aguda. A infecção pode se disseminar por via hematogênica, e atingir outros órgãos como o sistema nervoso central (SNC), causando meningocefalite, que é a principal manifestação clínica da doença na forma disseminada.^{5,8}

As apresentações clínicas estão relacionadas, diretamente, com o estado imunológico do hospedeiro. A meningoencefalite é a forma clínica mais comumente diagnosticada, ocorrendo em mais de 80% dos casos, quer sob a forma isolada ou associada ao acometimento pulmonar.⁸

Do ponto de vista clínico-epidemiológico essa micose se divide em: criptococose oportunista, associada a condições de imunodepressão celular causada predominantemente por *C. neoformans*, e criptococose primária, associada a hospedeiro, aparentemente imunocompetente, causada, predominantemente, por *C. gattii*.⁸

A recente detecção de *C. gattii* no Canadá e Estados Unidos, acometendo indivíduos aparentemente não imunocomprometidos, mostrou a importância na diferenciação da infecção em pacientes com vírus da imunodeficiência humana (HIV) e pacientes não infectados pelo HIV, para melhor entender as características clínicas entre estes dois grupos de pacientes. Por se tratar de grupo diverso, torna-se um desafio adaptar regime terapêutico que seja adequado a todos os pacientes. Embora os pacientes, aparentemente, imunocompetentes pareçam ser grupo homogêneo, eles provavelmente apresentam uma proporção de imunodeficiências inatas ou adquiridas imunodeficiências subclínicas inatas ou adquiridas. Complicações clínicas podem ser mais graves nesse grupo de pacientes, incluindo sequelas neurológicas, tais como:

acidente vascular cerebral, cegueira, surdez e outras anomalias de nervos cranianos focais.¹⁹

No Brasil, há relatos de *C. gattii* acometendo hospedeiros imunocompetentes nativos, principalmente pessoas jovens e crianças, nas regiões norte, sudeste e sul. Nestes grupos de pacientes a infecção é caracterizada por alta letalidade (taxas de 40,6 a 56%) e frequentemente causam incapacidades como: déficit visual ou cegueira e hidrocefalia.^{7,20,21,22}

O tratamento da criptococose depende do estado imunitário do paciente e os antifúngicos mais utilizados são: anfotericina B, 5-fluorocitosina e fluconazol.⁸ O tratamento é dividido em: fase de indução da terapia com anfotericina B; fase de consolidação e terapia de manutenção com fluconazol.²³

Diagnóstico Laboratorial

A doença é diagnosticada, em geral, quando o agente já está no SNC. O diagnóstico laboratorial é, comumente, realizado no líquido cefalorraqueano (LCR) e consiste, principalmente, na pesquisa direta da levedura capsulada (micológico direto com tinta da China), isolamento em meios de cultura e pesquisa de antígeno capsular. Pesquisa com tinta da China positiva direciona para gênero *Cryptococcus*. Quanto à cultura, não há meios seletivos, isto é, que promovam o crescimento apenas do gênero *Cryptococcus*. Leveduras deste gênero crescem bem em vários meios de cultura, desde que não tenham em sua composição cicloheximida, comercialmente Actidione®. O ideal é que seja utilizado meio que promova a identificação presuntiva, como o ágar Niger ou ágar L-dopa, em que as colônias apresentam coloração marrom.⁸

A determinação da espécie normalmente é realizada por métodos fenotípicos a partir do crescimento em cultura. Para isso, os laboratórios podem utilizar: métodos manuais, métodos comerciais automatizados, espectrometria de massa ou não e métodos moleculares.

Laboratórios de pesquisa costumam realizar método manual de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio e provas complementares como: hidrólise da ureia, crescimento em várias temperaturas e prova de CGB (L-canavanina, glicina e azul de bromotimol).²⁴ Se for utilizado método comercial, as provas complementares serão incluídas. Cabe esclarecer que a prova de CGB é de fácil execução e deve ser utilizada apenas e tão somente para diferenciar *C. neoformans* e *C. gattii*.²⁵

Em geral, os laboratórios de rotina utilizam métodos comerciais automatizados ou não. Estes métodos utilizam processos assimilativos ou enzimáticos para identificação das principais leveduras de interesse médico. No caso de leveduras do gênero *Cryptococcus*, o banco de dados destes métodos não contempla a espécie *C. gattii*, sendo assim, o resultado liberado é *C. neoformans*, taxonomia antiga que engloba as duas variedades.

A utilização da espectrometria de massa (*matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry* - MALDI-TOF MS) mostrou ser método rápido, acurado para identificação de *C. neoformans* e *C. gattii* assim como de outras espécies do gênero. Apesar de ser equipamento caro, os insumos para a realização da identificação até gênero/espécie de fungos em geral apresentam baixo custo.^{26,27}

Métodos moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e suas variações

(nested, multiplex e tempo real) podem ser utilizados para diagnóstico e também para identificação da espécie.²⁸⁻³²

Infelizmente, a técnica MALDI-TOF e os métodos moleculares, não estão disponíveis na maioria dos laboratórios de rotina.

A detecção de antígeno capsular em líquidos corpóreos normalmente é realizada por teste de aglutinação com partículas de látex. Recentemente, um teste rápido teve seu registro aprovado pela Anvisa. Trata-se de teste imunocromatográfico para detecção de antígenos polissacarídeos, que não requer infraestrutura laboratorial e que pode ser utilizado como triagem de amostras de sangue para detecção de casos assintomáticos/sub-clínicos e assim reduzir a mortalidade, principalmente em pacientes infectados pelo HIV.³³ Ambas metodologias sorológicas não diferenciam as espécies *C. neoformans* e *C. gattii*.

Os testes de sensibilidade aos antifúngicos *in vitro* (TSA) devem ser realizados nas seguintes situações: cepas provenientes de pacientes submetidos a tratamento prévio ou à profilaxia com antifúngicos; constatação de falha terapêutica; espécie do agente etiológico com sensibilidade pouco conhecida.³⁴ Normalmente o TSA determina a concentração inibitória mínima (CIM). Os métodos de referência preconizados pelo comitê norte-americano denominado Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) consistem na microdiluição do fármaco em caldo RPMI. O método de microdiluição proposto pelo comitê europeu (*European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing* – AFST-EUCAST) e fitas impregnadas com diferentes concentrações de antifúngicos, também podem ser utilizados e apresentam

resultados comparáveis ao CLSI.^{33,35} Outros métodos comerciais, automatizados ou não, já foram avaliados e mostraram bons resultados quando comparados aos métodos de referência, com a vantagem de serem menos laboriosos.³⁶ A vantagem da utilização de método comercial automatizado é ser menos laborioso e mais rápido quanto à liberação de resultados.

Apesar de não existirem dados sobre a relação entre MIC, dosagem do antifúngico e resposta clínica, o TSA pode ser útil em pacientes com falha na resposta à terapia, aparentemente, apropriada. Assim, resultado de CIM alto pode nortear a substituição de uma droga alternativa. Os testes de susceptibilidade são recomendados para monitorar tendências epidemiológicas.³⁷

Dados Laboratoriais sobre frequência de *C. gattii* no Estado de São Paulo

Por meio de pesquisa bibliográfica é possível observar o interesse da comunidade científica por *C. gattii* e micose causada por este agente nos últimos anos.

Desde 1994, quando pesquisadores do Núcleo de Micologia do Instituto Adolfo Lutz (NM-IAL) iniciaram projeto de monitoramento da criptococose no Estado de São Paulo, foi formado banco de cepas do complexo de espécies *C. neoformans/C. gattii*. Nesse projeto foram oferecidos vários cursos de capacitação, para os laboratórios da rede pública e credenciada, no diagnóstico laboratorial da criptococose e foi estabelecido fluxo de envio de amostras. O envio dos isolados ao NM-IAL permitiu que fosse realizado controle de qualidade destas identificações, pois todas as amostras eram reidentificadas por prova bioquímica (CGB) para diferenciação da variedade (atualmente,

espécie) para fins epidemiológicos, além da determinação da suscetibilidade ao fluconazol e anfotericina B. Até o momento, todos os isolados de *Cryptococcus* são objeto de estudo para caracterização de virulência, resistência, interação patógeno-hospedeiro, além de estudos ambientais da busca de fontes de infecção.³⁸⁻⁵⁶

O levantamento de dados laboratoriais no período de 1994 a 2015, considerando um isolado por paciente, mostrou que a suscetibilidade a ambos os fármacos foi alta e a frequência de *C. gattii* variou de 3,0% (1995, 1999 e 2000) a 15,5% (2009 e 2014), como pode ser observado no Quadro 1 e Gráfico 1.

Quadro 1. Frequência de *C. gattii*/ano (1 amostra/paciente) nos isolados do complexo *C. neoformans/C. gattii* recebidos pelo Núcleo de Micologia do Instituto Adolfo Lutz

ANO	Total de isolados do complexo <i>C. neoformans/C.gattii</i>	Total de <i>C. gattii</i>
1994	54	4 (7,4%)
1995	132	4 (3,0%)
1996	248	8 (3,2%)
1997	76	5 (6,6%)
1998	89	3 (3,4%)
1999	136	4 (3,0%)
2000	102	3 (3,0%)
2001	130	16 (12,6%)
2002	64	6 (9,4%)
2003	119	7 (5,9%)
2004	84	6 (7,1%)
2005	91	10 (11%)
2006	85	13 (15,3%)
2007	74	8 (9,3%)
2008	69	10 (14,5%)
2009	99	15 (15,2%)
2010	51	7 (13,7%)
2011	73	10 (13,7%)
2012	83	9 (10,8%)
2013	86	6 (7,0%)
2014	90	14 (15,6%)
2015	84	11 (13,1%)

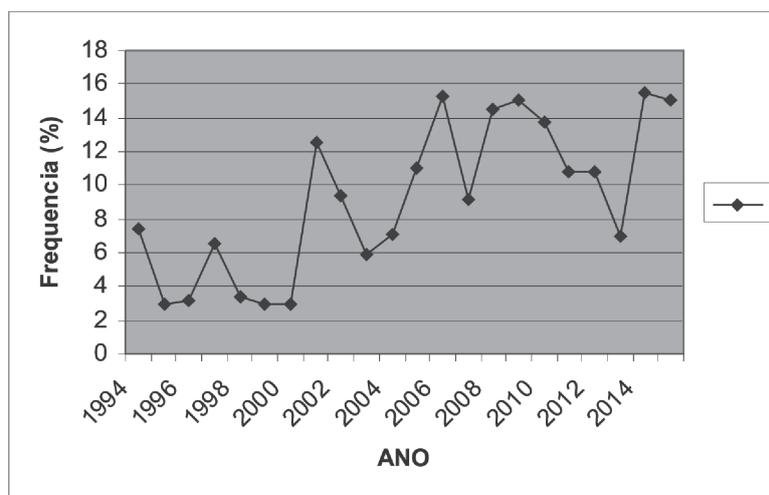


Figura 1. Distribuição das frequências relativas de *C. gattii* no Estado de São Paulo, segundo ano-calendário 1994-2015

Os resultados estatísticos pelo teste de qui quadrado levam a concluir que a distribuição não foi uniforme no tempo, isto é, frequências esperadas ora abaixo, ora acima, de 8,3%, como observado para o total. A análise de resíduos padronizados apontam os anos 2006, 2009 e 2014 como aqueles que tiveram, estatisticamente, maiores frequências relativas de *C. gattii* ($Z_{res} 2,409$, $Z_{res} 2,556$ e $Z_{res} 2,574$, respectivamente) para nível de significância de 0,005. Diante desses resultados, acreditamos ser mais factível considerar que houve flutuações nesta série temporal do que cogitar o aumento da frequência de *C. gattii* em anos recentes. Não foi possível associar infecção por este agente com doença imunológica prévia ou não, uma vez que este dado nem sempre constava da ficha de envio ao laboratório.

Discussão

Embora sejam dados aleatórios, uma vez que não expressam o número real de casos ocorridos no Estado de São Paulo, e levando em conta que as regiões norte e nordeste concentram o maior número de casos de criptococose por

C. gattii, as porcentagens encontradas neste estudo podem ser consideradas representativas.

Não existem dados oficiais sobre a criptococose em nosso meio, pois não é doença de notificação compulsória. Para isso será de suma importância a identificação correta do agente etiológico. Sendo assim, seria necessário que os laboratórios de análises clínicas, que não utilizam a técnica de MALDI-TOF ou técnicas moleculares, complementem a identificação com a prova de CGB para a diferenciação das espécies *C. neoformans* e *C. gattii*, mesmo que o método chegue ao resultado *C. neoformans*. Caso contrário, deveriam liberar o laudo como *Cryptococcus* spp. ou complexo das espécies *C. neoformans/C. gattii*.

Uma vez que a criptococose por *C. gattii* é considerada emergente e tem aspectos clínico-epidemiológicos pouco conhecidos, necessitando de abordagem distinta da criptococose oportunista por *C. neoformans*, enfatiza-se a importância do correto diagnóstico do agente para obtenção de taxas reais sobre a

frequência dos dois principais agentes e assim contribuir para o monitoramento do agente tanto no Estado de São Paulo como no Brasil como um todo e, assim, melhor compreender a relação patógeno/infecção.

Defendemos, ainda, a criação de sistema de vigilância para infecções de *C. gattii* no Brasil, assim como ocorre na Colômbia, Canadá e EUA, desde 1997, 1999 e 2011, respectivamente.

Como laboratório de Saúde Pública, o NM-IAL participaria dessa vigilância

recebendo todos os isolados com características de *Cryptococcus* spp. ou identificados como tal na rede pública e credenciada, para: i) verificar a prevalência real da criptococose no estado de São Paulo, ii) realizar tipagem molecular, de resistência e virulência, que contribuam em estudos epidemiológicos e clínicos e iii) monitorar possíveis focos de infecção ambiental.

Agradecimentos

Dr Euclides Ayres da Cunha pelas análises estatísticas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Lin X, Heitman J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annu Rev Microbiol.* 2006;60:69-105.
- Galanis E, MacDougall L. Epidemiology of *Cryptococcus gattii*, British Columbia, Canada, 1999-2007. *Emerg. infect. dis.* 2010;16:251-7.
- Martins LMS, Wanke B, Lazera M, Trilles L, et al. Genotypes of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* as agents of endemic cryptococcosis in Teresina, Piauí (northeastern Brazil). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* (online). 2011; 106:725-30.
- Sorrel TC. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. *Med Mycol.* 2001; 39:155-68.
- Casadevall A, Perfect JR. *Cryptococcus neoformans*. Washington, DC:ASM press; 1998.
- Kidd SE, Hagen F, Tscharke RL, Huynh M, Bartlett KH, Fyfe M, et al. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004;101: 17258-63.
- Lazera MS, Gutierrez-Galhardo MC, Cavalcanti MAS, Wanke B. Criptococose. In: Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2005; p. 1223-36.
- Moretti ML, Resende MR, Lazera MS, Colombo AL, Shikanai-Yasuda MA. Consenso em cryptococcosis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2008; 41(5):524-44.
- Heitman J, Kozel TR, Kwon-Chung KJ, Perfect JR, Casadevall A. *Cryptococcus*: From Human Pathogen to Model Yeast. Washington, D.C.: ASM Press; 2011. 620 p.
- Kwon-Chung KJ, Boekhout T, Fell JW, Diaz M. Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellonycetidae). *Taxon* 2002; 51:804-6.
- Kwon-Chung KJ, Varma SA. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? *FEMS Yeast Res.* 2006; 6:574-87.
- Franzot SP, Salkin IF, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus*

- neoformans* serotype A isolates. J. Clin. Microbiol. 1999; 37(3): 838-40.
13. Kwon-Chung KJ. Filobasidiella. In: Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T (Editores). The Yeasts – A Taxonomic Study. Amsterdam: Elsevier Science; 2011. v. 3, p. 1443-55.
 14. Boekhout T, Theelen B, Diaz M, Fell JW, Hop WC, Abeln EC, et al. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. Microbiology. 2001;147(4): 891-907.
 15. Meyer W, Castaneda A, Jackson S, Huynh M, Castaneda E. IberoAmerican Cryptococcal Study Group. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. Emerg. Infect. Dis. 2003; 9(2): 189-95.
 16. Hagen F, Khayhan K, Theelen B, Lolecka A, Polacheck I, Sionov E, et al. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. Fungal Genet Biol. 2015; 78: 16-48
 17. Bartlett KH, Kidd SE, Kronstad JW. The emergence of *Cryptococcus gattii* in British Columbia and the Pacific Northwest. Curr Infect Dis Rep. 2008;10: 58-65.
 18. Trilles L, Lazera MS, 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.
 19. Pappas PG. Cryptococcal infections in non-HIV infected patients. Trans Am Clin Climatol Assoc. 2013; 124: 61-79.
 20. Correa MP, Oliveira EC, Duarte RR, Pardo PP, Oliveira FM, Severo LC. Cryptococcosis in children in the State of Para, Brazil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 1999; 32:505-8.
 21. Pinto Junior VT, Pone MVS, Pone SM, Campos JMS, Garrido JRP, Barros ACMW, et al. *Cryptococcus gattii* molecular type VGII as agent of meningitis in a healthy child in Rio de Janeiro, Brazil: report of an autochthonous case. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2010; 43(6): 746-8.
 22. Rozenbaum R, Gonçalves AJ. Clinical epidemiological study of 171 cases of cryptococcosis. Clin. Infect. Dis. 1994;18: 369-80.
 23. 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. Clin. Infect. Dis. 2010; 50(3): 291-322.
 24. Kwon-Chung KJ. Filobasidiella Kwon-Chung. In: The yeasts: a taxonomic study. San Diego: Elsevier; 2011. p.1443-55.
 25. Kwon-Chung KJ, Polacheck I, Bennett JE. Improvement diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (Serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (Serotypes B and C). J. Clin. Microbiol. 1982; 15: 535-7.
 26. McTaggart LR, Lei E, Susan E. Richardson SE, Hoang L, Fothergill A, Zhang SX. Rapid identification of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J. Clin. Microbiol. 2011; 49(8): 3050-3.
 27. Stevenson L, Drake S, Shea Y, Zelazny A, Murray P. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of clinically important yeast species. J. Clin. Microbiol. 2010; 48: 3482-6.
 28. Leal AL, Faganello J, Bassanesi MC, Vainstein MH. *Cryptococcus* species identification by multiplex PCR. Med. Mycol. 2008; 46(4): 377-83.
 29. Martins MA, Brighente KB, Matos TA, Vidal JE, Hipólito DDC, Pereira-Chioccola VL. Molecular diagnosis of cryptococcal meningitis in cerebrospinal fluid: comparison

- of primer sets for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* species complex. *Braz. J. Infect. Dis.* 2015;19(1): 62-7.
30. Mitchell TG, Freedman EZ, Meyer W, White TJ, Taylor JW. PCR Identification of *Cryptococcus neoformans*. In: Persing DH et al., ed *Diagnostic Molecular Microbiology: principles and applications*. Washington, American Society for Microbiology. 1993. p. 431-6.
 31. Mitchell TG, White TJ, Taylor JW. Unique oligonucleotide primers in PCR for identification of *Cryptococcus neoformans*. *J. Clin. Microbiol.* 1994; 2: 253-5.
 32. Rappelli P, Are R, Casu G, Fiori PL, Cappuccinelli P, Aceti A. Development of a Nested PCR for Detection of *Cryptococcus neoformans* in Cerebrospinal. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36(11): 3438-40.
 33. Vidal JE, Boulware. Lateral Flow assay for cryptococcal antigen: an important advance to improve the continuum of HIV care and reduce cryptococcal meningitis-related mortality. *Rev. Med. Trop. São Paulo.* 2015; 57(supl.19): 38-45.
 34. Cuenca-Estrella M, Lee-Yang W, Ciblak MA, Arthington-Skaggs BA, Mellado E, Warnock DW, et al. Comparative evaluation of NCCLS M27-A and EUCAST broth microdilution procedures for antifungal susceptibility testing of *Candida* species. *Antimicrob. agents. chemother.* 2002; 46: 3644-7.
 35. Claudino ALR, Peixoto Jr. RF, Melhem MSC, Szeszs MW, Lyon JP, Chavasco JK et al. Correlation between CLSI, EUCAST and Etest methodologies for amphotericin B and fluconazole antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. *Clinical isolates. Pharmazie.* 2008; 63: 286-9.
 36. Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Alastruey-Izquierdo A, Bernal-Martinez L, Cuesta I, Buitrago MJ, et al. Comparison of the Vitek 2 Antifungal Susceptibility System with the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Broth Microdilution Reference Methods and with the Sensititre YeastOne and Etest Techniques for In Vitro Detection of Antifungal Resistance in Yeast Isolates. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(5): 1782-6.
 37. Chen SCA, Meyer W, Sorrell TC. *Cryptococcus gattii* Infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 2014; 27(4): 980-1023.
 38. Bellissimo-Rodrigues F, Baciotti M, Zanatto MP, Silva JO, Martins MA, Martinez R. Cutaneous cryptococcosis due to *Cryptococcus gattii* in a patient on chronic corticotherapy. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2010; 43:211-2.
 39. Bonfietti LX, Pham C, Silva DC, Martins MA, Lockhart S, Melhem MSC. Diversidade de isolados clínicos de *Cryptococcus gattii* por Multi-locus sequence typing no Estado de São Paulo. *Bol. Inst. Adolfo Lutz.* 2014; 24(1):36-9.
 40. Cardoso PH, Baroni FA, Silva EG, Nascimento DC, Martins MA, Szeszs W, et al. Feline nasal granuloma due to *Cryptococcus gattii* type VGII. *Mycopathologia.* 2013; 176(3-4): 303-7.
 41. Castro e Silva DM, Santos DCS, Martins MA, Oliveira L, Szeszs MW, Melhem MSC. First isolation of *Cryptococcus neoformans* genotype VNI MAT-alpha from wood inside hollow trunks of *Hymenaea courbaril*. *Med. Mycol.* 2016; 54(1):97-102.
 42. Espinel-Ingroff A, Aller AI, Canton E, Castanon-Olivares LR, Chowdhary A, Cordoba 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: 5898-906.
 43. 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; 56:3107-13.
44. Lacaz CS, Heins-Vaccari EM, Hernandez-Arriagada GL, Martins EL, Prearo CA, Corim SM, et al. Primary cutaneous cryptococcosis due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* serotype B, in an immunocompetent patient. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 2002; 44:225-8.
45. Lomes NR, Melhem MSC, Szeszs MW, Martins MA, Buccheri R. Cryptococcosis in non-HIV/non-transplant patients: a brazilian case series. *Med. Mycol.* 2016; 54(7): 669-76.
46. Martins MA, Pappalardo MCSM, Melhem MSC, Pereira-Chioccola VL. Molecular diversity of serial *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients in the city of São Paulo, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2007; 102(7):777-84.
47. Martins MA, Pukinskas SRBS. *Cryptococcus gattii* – problemas no diagnóstico de *C. neoformans* e *C. gattii*. *Bol. Inst. Adolfo Lutz.* 2011; 21: 55-6.
48. Matsumoto MT, Baeza LC, Almeida AMF, Mendes-Giannini MJ, Melhem MSC, Pukinskas SRBS, et al. Molecular Typing And Antifungal Susceptibility Of Clinical Sequential Isolates of *Cryptococcus neoformans* from São Paulo, Brazil. *FEMS Yeast Res.* 2007; (7):152-64.
49. Meyer W, Castañeda A, Jackson S, Huynh M, Castañeda E, Ibero-American Cryptococcal Study Group. Molecular typing of Ibero-American *Cryptococcus neoformans* isolates. 2003. *Emerg. Infect. Dis.* 9(2):189-95.
50. Oliveira L, Martins MA, Vidal JE, Szeszs MW, Pappalardo MCSM, Melhem MSC. Report of filamentous forms in a mating type VNI clinical sequential isolates of *Cryptococcus neoformans* from an HIV virus-infected patients. *Med Mycol Case Rep.* 2014; 7: 4-7.
51. Pappalardo MCSM, Melhem MSC. Cryptococcosis: A review of the brazilian experience for the disease. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 2003; 45(6): 299-305.
52. Silva DC, Martins MA, Szeszs MW, Bonfietti LX, Matos D, Melhem MSC. Susceptibility to antifungal agents and genotypes of Brazilian clinical and environmental *Cryptococcus gattii* strains. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2012; (72): 332-9.
53. Silva JO, Silva P, Medeiros MIC, Carneiro AMM, Szeszs MW, Martins MA. Contribuição para a Epidemiologia da criptococose no Estado de São Paulo – dados do Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto no período de cinco anos. *Bol. Inst. Adolfo Lutz.* 2014; 24(1): 47-8.
54. Souto ACP, Bonfietti LX, Ferreira-Paim K, Trilles L, Martins M, Ribeiro-Alves M, et al. Population Genetic Analysis Reveals a High Genetic Diversity in the Brazilian *Cryptococcus gattii* VGII Population and Shifts the Global Origin from the Amazon Rainforest to the Semi-arid Desert in the Northeast of Brazil. *Plos Negl. Trop. Dis.* 2016; 10(8): e0004885.
55. Valério V, Melhem M, Pukinskas SRBS, Aoki S, Carrara C, Pugliese A. Actividad enzimática extracelular y serotipo en cepas de *Cryptococcus neoformans* de pacientes con sida en Brasil. *Rev. Iberoam. Micol.* 2005;(22): 29-33.
56. Vasconcelos DM, Domingues-Ferreira M, Soares MCP, Martins MA, Bezerra TA, Paula CR, et al. *Cryptococcus gattii*: immunological and microbiological study in a patient with neurocryptococcosis. *JMM Case Reports.* 2015. *JMM Case Reports*, 2015 2: 1-4.