

## QUIMIOTIPAGEM DO *Cryptococcus neoformans*. REVISÃO DA LITERATURA. NOVOS DADOS EPIDEMIOLÓGICOS SOBRE A CRIPTOCOCOSE. NOSSA EXPERIÊNCIA COM O EMPREGO DO MEIO DE C.G.B. NO ESTUDO DAQUELA LEVEDURA.

Natalina Takahashi de MELO (1), Carlos da Silva LACAZ (2), Cecília Eugênia CIARBEL (3), Amélia Dias PEREIRA (4), Elisabeth Maria HEINS-VACCARI (1), Antonio Spina FRANÇA-NETTO (5), Luis dos Ramos MACIADO (5) & José Antonio LIVRAMENTO (5).

---

### RESUMO

O presente trabalho, além da revisão da literatura sobre quimiopigamentação do *C. neoformans*, com novos dados sobre a epidemiologia da criptococose, teve por finalidade principal a caracterização das duas variedades desta levedura em pacientes com neurocriptococose, HIV + e HIV -. As variedades *neoformans* e *gattii* estão hoje bem definidas bioquimicamente, com o emprego do meio C.G.B., proposto por KWON-CHUNG et al. (1982)<sup>24</sup>. O isolamento do *C. neoformans* var. *gattii* das flores e folhas do *Eucalyptus camaldulensis* e do *Eucalyptus tereticornis*, na Austrália, através dos trabalhos de ELLIS & PFEIFFER (1990)<sup>16</sup> e PFEIFFER & ELLIS (1992)<sup>41</sup>, possibilitou investigações epidemiológicas das mais interessantes sobre este microrganismo, levedura capsulada a qual SANFELICE<sup>50,51</sup>, na Itália, em 1894 e 1895 despertou a atenção do meio médico. BUSSE<sup>8</sup>, em 1894, descrevia o primeiro caso de criptococose humana sob a forma de lesão óssea, simulando sarcoma. As pesquisas nacionais sobre o assunto em foco foram destacadas, seguindo-se a experiência dos Autores com o meio de C.G.B. (L - canavanina, glicina e azul de bromotímol). Foi possível, através deste meio o estudo de 50 amostras de líquor, sendo 39 procedentes de aidéticos (78%) e 11 de não aidéticos (22%). De pacientes HIV+, 37 (74%) foram identificados como *C. neoformans* var. *neoformans* e 2 (4%) como *C. neoformans* var. *gattii*. Dos HIV - 8 (16%) foram classificados como *C. neoformans* var. *neoformans* e 3 (6%) como *C. neoformans* var. *gattii*. Através deste trabalho, evidencia-se a importância da neurocriptococose, principalmente entre os aidéticos, demonstrando-se mais uma vez o interesse do meio CGB na quimiopigamentação do *C. neoformans* em suas duas variedades, ganhando em importância a demonstração de que duas espécies de eucalipto podem funcionar como "árvores-hospedeiras" para o *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*.

**UNITERMOS:** Criptococose; Neurocriptococose; *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*; *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*.

---

(1) Pesquisadora do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (Laboratório de Micologia Médica) São Paulo, SP, Brasil.

(2) Chefe dos Laboratórios de Micologia Médica do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo e do LIM-53 HC-FMUSP. São Paulo, SP, Brasil.

(3) Estagiária da Fundap, no LIM-53 HC-FMUSP. São Paulo, SP, Brasil.

(4) Pesquisadora Científica do Instituto Adolfo Lutz. São Paulo, SP, Brasil.

(5) Médicos do Centro de Investigações em Neurologia, da Faculdade de Medicina da USP. São Paulo, SP, Brasil.

Endereço para correspondência: Prof. Carlos da Silva Lacaz. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Av. Dr. Amaldo, 455 - 2º andar. CEP 01246-903 São Paulo, SP, Brasil.

## INTRODUÇÃO

### QUIMIOTIPAGEM DO *Cryptococcus neoformans*

Duas importantes descobertas realizadas por STAIB (1962)<sup>53</sup>, (1987)<sup>54</sup>, (1988)<sup>55</sup> possibilitaram, posteriormente, grandes avanços na chamada quimiotipagem do *C. neoformans*, separando suas duas variedades: *neoformans* (sorotipos A-D) e *gattii* (sorotipos B-C). Referimo-nos à capacidade do *C. neoformans* assimilar a creatinina como fonte de nitrogênio e a produção de melanina em meios contendo extrato aquoso de *Guizotia abyssinica* (ágar-creatinina; Bird seed ágar; Niger seed ágar ou ágar - STAIB). A produção de um pigmento marrom (Brown Colour Effect), por uma fenol-oxidase, identificaria amostras de *C. neoformans*, o mesmo não ocorrendo com outras leveduras. A produção de melanina está intimamente relacionada com a virulência da amostra, pois é um polímero inerte, não havendo enzimas capazes de hidrolizá-la ou anticorpos que a reconheçam (STAIB et al., 1987)<sup>54</sup>.

KWON-CHUNG et al. (1978)<sup>23</sup>, foram os primeiros a descreverem técnica rápida, simples e acurada para tentar diferenciar as variedades através da quimiotipagem em meio de cultura, contendo creatinina, dextrose e azul de bromotimol como indicador (ágar CDB).

A base bioquímica da variação da cor do meio, foi estudada, depois, por POLACHECK & KWON-CHUNG (1980)<sup>42</sup>, concluindo que na variedade *gattii* ocorre produção de amônia, a partir da degradação da creatinina por ação da creatinina deiminase, resultando em metilhidantoina e amônia (o meio torna-se alcalino, passando da cor amarela para azul). Fato contrário, acontece com a var. *neoformans*, que tem inibida a síntese da enzima pela presença de pouca quantidade de amônia. Outra diferença observada por KWON-CHUNG et al. (1978)<sup>23</sup> nas duas variedades de *C. neoformans* relaciona-se à produção de urease em meios contendo 100 µM de EDTA; assim, amostras de *C. neoformans* var. *neoformans* são mais resistentes ao EDTA em relação a *C. neoformans* var. *gattii*, mostrando reação positiva em 1 hora, a 37°C. Amostras de *C. neoformans* var. *gattii* são negativas até 4 horas de incubação. Esta inibição é eliminada quando o cátion Ni<sup>2+</sup> (mas não outros cátions) é incorporado aos meios contendo EDTA, tudo fazendo crer em maior afinidade do *C. neoformans* var. *neoformans* ao cátion Ni<sup>2+</sup>.

SALKIN & HURD (1982)<sup>48</sup> desenvolveram novo meio, o GCP (glicina-cicloheximida-fenol vermelho) para diferenciar as duas variedades de *Cryptococcus*. Os sorotipos A-D não apresentam crescimento pois, os mesmos, são inibidos pela ciclo-heximida, enquanto que, os sorotipos B-C crescem, tornando o ágar róseo-pardo. Resultados negativos, são observados em cerca de 10% do *C. neoformans* var. *gattii*. Em São Paulo, MENDES et al., (1989)<sup>33</sup> trabalharam com o referido meio, classificando 11 amostras isoladas de pacientes com AIDS, como *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipos A-D).

KWON-CHUNG et al. (1982)<sup>24</sup> descreveram outro ágar à base de L-canavanina, glicina e azul de bromotimol (CGB), verificando que todas as amostras de *C. neoformans* var. *gattii* utilizavam a glicina como fonte de carbono e nitrogênio, resistindo à L-canavanina (análogo de arginina). Uma glicina-decarboxilase foi detectada nos extratos celulares.

A amônia liberada durante a clivagem da glicina é a responsável pela reação positiva e o indicador torna o meio azul-cobalto no *C. neoformans* var. *gattii* (B-C), o mesmo não ocorrendo com *C. neoformans* var. *neoformans* (A-D) em que todas as amostras do sorotipo D e 33% do sorotipo A são sensíveis à L-canavanina nas concentrações de até 5 µg/ml ou menos.

Este meio mostrou-se superior aos dois anteriores, GCP e CDB.. De acordo com KWON-CHUNG & BENNETT (1992)<sup>27</sup>, em mais de 500 amostras examinadas de *C. neoformans* nenhum falso resultado foi obtido, diferenciando nitidamente as duas variedades.

O meio de D-prolina formulado por DUFIT et al. (1987)<sup>15</sup> parece ser útil na separação das duas variedades de *Cryptococcus*, visto que a var. *gattii* é a única que utiliza D-prolina como fonte de nitrogênio.

### ALGUNS NOVOS DADOS EPIDEMIOLÓGICOS SOBRE A CRIPTOCOCOSE

É provável que a creatinina desempenhe papel de grande importância na ecologia das duas variedades. A creatinina é um dos produtos nitrogenados naturais excretada pelos pombos, cujas fezes, ricas também em amônia, representam excelente reservatório natural para o *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* POLA-

CHECK & KWON-CHUNG, (1980)<sup>42</sup> e POLACHECK et al. (1982)<sup>43</sup>. Segundo observações de KWON-CHUNG et al. (1978)<sup>23</sup> *C. neoformans* var. *gattii* assimila de modo muito mais efetivo a creatinina, do que *C. neoformans* var. *neoformans*.

Fato dos mais interessantes foi registrado por ELLIS & PFEIFFER (1990)<sup>16</sup> isolando em Adelaide (Austrália) de folhas, sementes, flores e cascas de eucalipto (*Eucalyptus camaldulensis*) amostras de *C. neoformans* var. *gattii*. Nas infecções por esta levedura, o principal propágulo seria representado pelos basidiósporos presentes nas flores de eucalipto que funcionaria como "árvore-hospedeira" para o fungo, através de uma associação biotrófica (Figura 1). No que diz respeito à forma de infecção pelo *C. neoformans*, tudo faz crer que esses basidiósporos penetram através da árvore respiratória (ELLIS & PFEIFFER, 1992)<sup>17</sup> (Tabela 5). *C. neoformans* var. *gattii* teria sido exportado da Austrália para outras partes do mundo através de sementes do *E. camaldulensis*, contendo micélio dicariótico daquela levedura. Sabe-se que *C. neoformans* var. *gattii* é raramente encontrado em pacientes com AIDS.

PFEIFFER & ELLIS (1991)<sup>40</sup> isolaram, também, amostras de *C. neoformans* var. *gattii* de eucaliptos da Califórnia. Esta associação ecológica, específica, do *C. neoformans* var. *gattii* com *Eucalyptus camaldulensis* explica a incidência maior da criptococose, por esta variedade, entre os aborígenes australianos e, em Koala (*Phascolarctos cinerius*), habitando zonas com predomínio de eucalipto e, a menor frequência desta infecção em pacientes com AIDS. Em 1992, PFEIFFER & ELLIS<sup>41</sup>, isolaram do *Eucalyptus tereticornis* (Forest red gum), na Austrália, amostras de *C. neoformans* var. *gattii* (sorotipo B). *Eucalyptus camaldulensis* é muito semelhante ao *E. tereticornis*. Segundo os dados de KWON-CHUNG & BENNETT (1984)<sup>25</sup>, existe elevada prevalência de *C. neoformans* var. *gattii* na Austrália, Brasil, Cambódia, Havá, México, Paraguai, Tailândia, Vietnam e Nepal (zonas tropicais e subtropicais).

IKEDA et al., (1982)<sup>21</sup> realizaram sorotipagem de amostras de *C. neoformans*, bem como análise antigênica dos quatro sorotipos conhecidos desta levedura. Os sorotipos A-D, possuem os fatores antigênicos 1, 2, 3, 7 e 1, 2, 3, 8 respectivamente. Os sorotipos B-C têm os fatores antigênicos 1, 2, 4, 5 e 1, 4, 6 respectivamente. De 62 amostras de *C. neoformans* isoladas no Japão, 58 foram do sorotipo A, 3 do sorotipo AD e 1 do sorotipo D.

**ECOLOGIA DO *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS***

ELLIS & PFEIFFER, 1990<sup>16</sup>

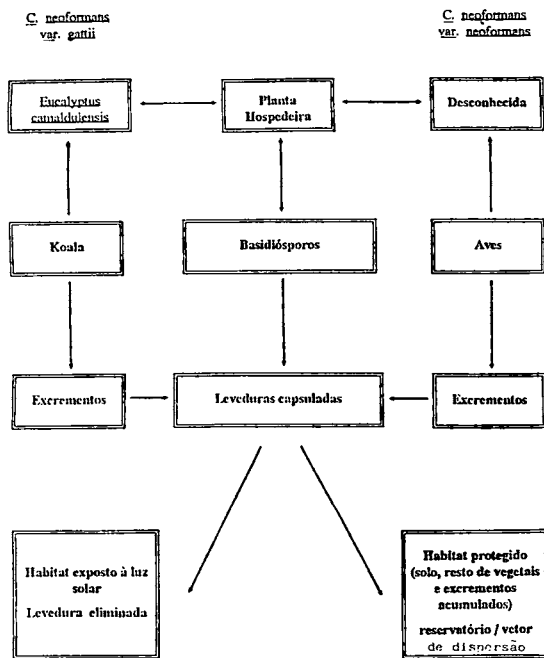


Fig. 1

Diferenças bioquímicas foram assinaladas por BENNETT et al. (1978)<sup>4</sup> distinguindo os sorotipos A-D e B-C do *C. neoformans* var. *neoformans* e *C. neoformans* var. *gattii*.

As tabelas 1, 2, 3 e 4 retiradas do trabalho de BENNETT & KWON-CHUNG (1989)<sup>5</sup> mostram a prevalência dos sorotipos A, D, B e C em diversas partes do mundo.

GATTI & ECKELS (1970)<sup>19</sup> isolaram de líquido de um bantú do Congo, com crises convulsivas, amostra de

Tabela 1

Prevalência do sorotipo A

Estados Unidos	262/355	73,8%
Excluindo Sul da Califórnia	215/269	79,9%
Canadá	62/78	79,5%
Nova Zelândia, Austrália	35/50	70,0%
Europa	78/117	66,7%
América do Sul	44/76	57,9%
Sudeste da Ásia	9/18	50,0%
Japão	58/62	93,5%

Tabela 2  
Prevalência do sorotipo D

Dinamarca e Itália	16/19	84,2%
Suíça *	17/23	73,9%
Alemanha	5/17	29,4%
Europa, qualquer outra parte	3/98	3,1%
Nova Zelândia, Austrália	2/50	4,0%
Estados Unidos	21/355	5,9%
Canadá	5/78	6,4%
América do Sul	6/76	7,9%

\* incluindo 18 de Schoeler

Tabela 3  
Prevalência do sorotipo B

Sudeste da Ásia	9/18	50,0%
Sudeste da Ásia (Schoeler)	9/23	39,1%
Austrália	9/24	37,5%
Venezuela	5/16	31,2%
Brasil	14/48	29,2%
Sul da Califórnia	22/86	25,6%
Argentina	1/10	10,0%
Canadá	5/78	6,4%
Estados Unidos, exceto Sul da Califórnia	13/269	4,8%
Nova Zelândia	1/26	3,8%
Europa	4/117	3,4%

Tabela 4  
Prevalência do sorotipo C

Sul da Califórnia	11/86	12,8%
Estados Unidos, exceto Sul da Califórnia	5/269	1,9%
América do Sul	1/76	1,3%
Canadá	1/80	1,2%
Europa	1/117	0,9%
Nova Zelândia, Austrália	0/50	0%

*C. neoformans* descrita como "atípica" pois a mesma apresentava-se sob a forma de células alongadas. Ainda em 1970 VANBREUSEGHEM & TAKASHIHO<sup>60</sup> deram a esta amostra a denominação *C. neoformans* var. *gattii*<sup>13</sup>.

FROMTLING et al. (1982)<sup>18</sup>, de 90 amostras de *C. neoformans* isoladas nos Estados Unidos, verificaram que 3 pertenciam ao sorotipo B-C (*Cryptococcus neoformans* var. *gattii*).

*C. neoformans* var. *neoformans* foi isolado da poeira e excretas de pombos e galinhas em Kinshasa (Zaire) por SWINNE et al. (1986)<sup>56, 57</sup>.

BOTTONE et al. (1986)<sup>7</sup> em um paciente da cidade de New York, isolaram pela primeira vez amostra de *C. neoformans* sorotipo B, sendo que as células observadas eram bem maiores que as habitualmente registradas. A paciente não era portadora de AIDS e, sim, de um carcinoma pulmonar.

SHIMIZU et al. (1986)<sup>52</sup>, na Califórnia, de um total de 46 amostras obtidas de 30 pacientes, sendo 20 portadores de AIDS, verificaram que nesses últimos, todas eram de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*. De 10 pacientes não aidséticos, 2 estavam infectados com *C. neoformans* var. *gattii*.

RINALDI et al. (1986)<sup>44</sup> examinaram 28 amostras de *C. neoformans* isoladas na Califórnia, sendo 14 pacientes com AIDS. Estas últimas pertenciam todas à variedade de *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipos A, D ou AD).

CLANCY et al. (1990)<sup>11</sup>, de um paciente com AIDS, isolaram no Sudoeste da Califórnia, *C. neoformans* var. *gattii* (sorotipo B). Este paciente vivia em Los Angeles mas, viajava frequentemente para São Paulo e Rio de Janeiro, áreas endêmicas desse microrganismo.

LAZERA (1989)<sup>30</sup>, estudando na cidade do Rio de Janeiro as fontes saprofíticas do *C. neoformans*, utilizando amostras de solo de diversas origens, em número de 83, isolou 11 amostras dessa levedura (13,2% de positividade).

*C. neoformans* foi isolado, inclusive, de fezes de morcegos e em oco de árvore (*Syzygium jambolana*)

Tabela 5  
Forma e tamanho dos propágulos infectantes do  
*Cryptococcus neoformans*  
(Segundo ELLIS & PFEIFFER, 1992)<sup>17</sup>

Propágulo	Forma	Tamanho
Leveduras capsuladas (ambas variedades)	Globosa ou oval	3-8 µm
Leveduras dessecadas em excretas de pombos	Globosa ou oval	2 µm
Basidiósporos da var. <i>neoformans</i>	Esférica, oblonga elíptica ou cilíndrica com paredes pouco rugosas	1,8-3 x 2-5 µm
Basidiósporos da var. <i>gattii</i>	Bacilar, de parede lisa	1-1,8 x 3-8 µm

biótopo até então não relacionado ao fungo. Estudadas em ágar CGB, 7 amostras foram identificadas como *C. neoformans* var. *neoformans* e 1, *C. neoformans* var. *gattii*.

GEZUELE et al. (1989)<sup>20</sup> fazem referência ao isolamento do *C. neoformans* var. *gattii* no Uruguai, de restos de uma colméia de vespa comunitária (*Polybia occidentalis*), empregando os meios de CGP e CGB. Esta amostra foi citada no trabalho de CONTI-DIAZ (1990)<sup>12</sup>.

PEREZ RAMIREZ (1991)<sup>38</sup>, com material do Hospital Emílio Ribas (São Paulo), estudando a criptococose em casos de AIDS, de 29 pacientes, isolou 24 amostras de *C. neoformans* sendo 23 da var. *neoformans* e 1 não determinado. Em 5 casos o cultivo foi negativo. ANDREU et al. (1991)<sup>1</sup> em Cuba, isolaram o *C. neoformans* em meios à base de sementes de girasol (*Helianthus annuus*). Bioquimicamente as 10 amostras isoladas do líquido em um hospital da cidade de La Habana comportaram-se como *C. neoformans* var. *neoformans*.

SWINNE et al. (1991)<sup>59</sup> isolaram da pocira doméstica, em Bujumbura (Burundi) amostras de *C. neoformans* var. *neoformans*, acreditando que os pacientes HIV-positivos, portadores de criptococose se contaminaram com os propágulos que se originam principalmente de fezes de pombo<sup>22, 58</sup>.

MALIK et al. (1992)<sup>32</sup>, isolaram de 29 casos de criptococose em gatos, na Austrália, 27 amostras, sendo 21 de *C. neoformans* var. *neoformans* e 6 de *C. neoformans* var. *gattii*. BAVA & NEGRONI (1992)<sup>3</sup>, estudando 105 casos de criptococose diagnosticados na Argentina, entre 1981 a 1990 verificaram que, em 57 pacientes a causa predisponente era a AIDS. *C. neoformans* var. *neoformans* foi isolado em 101 pacientes e nos 4 restantes a var. *gattii* (sorotipo B).

DROMER et al. (1992)<sup>14</sup>, registraram o primeiro caso de criptococose, na França, por *C. neoformans* var. *gattii*. (sorotipo B). O paciente residente neste país, há 23 anos, procedia de Cambódia, tendo vivido 3 anos no Zaire.

Os Autores sugerem reativação de infecção latente pois, não havia "doença de base" evidente.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudadas culturas de *Cryptococcus neoformans* isoladas do líquido de pacientes atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 46 casos e da cidade de Salvador - Bahia, 4 casos. As culturas de *C. neoformans* foram identificadas através de provas de urease em meio de CHRISTENSEN, assimilação de carboidratos e crescimento a 37°. Para a quimiotipagem das duas variedades do *C. neoformans* utilizamos o meio de Canavanina-Glicina-Azul de Bromotimol (ágar-CGB), preparado de acordo com KWON-CHUNG et al. (1982)<sup>24</sup>. A composição do meio de cultura para 1000ml contém: 1) Solução A: 10g de glicina; 30 mg de sulfato de L-Canavanina; 50 µl de tiamina HCl; 1,0g de fosfato de potássio monobásico e 1,0g de sulfato de magnésio dissolvidos em 100ml de água destilada e esterilizada em filtro Millipore 0,45 µm; 2) Solução B: 20 ml de azul de bromotimol sódico 0,4% (pH 5,8 ± 0,1) adicionado a 20g de ágar dissolvido em 880ml de água destilada. Autoclavar a 120°C por 15 minutos. Esfriar o meio a 60°C e adicionar 100ml da solução A.

As cepas de *C. neoformans* foram semeadas no meio de CGB e incubadas a 28°C durante 5 dias. Variação na coloração do meio de cultivo foram observadas a partir do 2º dia de incubação. Resultados da reação foram feitos segundo o esquema: 0 = nenhuma variação; 1+ = leve variação na cor; 2+ = meio azul-esverdeado; 3+ = azul cobalto e fundo azul-esverdeado; 4+ = azul cobalto até o fundo do tubo. Quando o resultado variar de 0 a 2+ = var. *neoformans* (sorotipos A-D) 2+ = indeterminado e igual ou acima de 3+ = var. *gattii* (sorotipos B-C). A prova é positiva quando o meio de cultura de cor amarelo-ouro (pH 5,8 ± 0,1) passa para a cor azul (pH em torno do 7,0) = *C. neoformans* var. *gattii*. O meio de CGB foi anteriormente examinado em sua sensibilidade e especificidade com 16 amostras identificadas bioquimicamente, da Micoteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, assim classificadas:

<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	(A-D)	2
<i>C. neoformans</i> var. <i>gattii</i>	(B-C)	14

Nota: Nenhuma das amostras examinadas de líquido, procediam de transplantados renais, desde que, com o emprego da ciclosporina A a criptococose não mais foi observada no Serviço de Transplante Renal do Hospital das Clínicas. Este dado é de grande importância, pois antes do emprego daquele imunossupressor a frequência da neurocriptococose era relativamente elevada, sendo que o material clínico desses casos serviu para tese de doutoramento de Nóbrega (1987)<sup>36</sup>.

## RESULTADOS

Foram examinadas 50 amostras de *C. neoformans*, isoladas em ágar-Sabouraud, a partir do líquido, procedentes de pacientes HIV+ e HIV-. A caracterização das variedades foi efetuada em ágar-CGB e os resultados são os seguintes:

Nº DE CASOS	HIV+	HIV-	TOTAL
50	39(78%)	11(22%)	50(100%)
<i>C. neoformans</i>			
var. <i>neoformans</i>	37(74%)	8(16%)	45(90%)
<i>C. neoformans</i>			
var. <i>gattii</i>	2(4%)	3(6%)	5(10%)

## DISCUSSÃO

Nosso trabalho, com 50 amostras de *C. neoformans*, todas isoladas do líquido em casos confirmados de meningite criptocócica registra a ocorrência do *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, em pacientes HIV-positivos (2 casos - 4%) e HIV-negativos (3 casos - 6%), sem doença de base definida. A maioria foi identificada como *C. neoformans* var. *neoformans* (45 casos - 90%), sendo 37 (74%) de pacientes HIV+ e 8 (16%) de HIV-.

Alguns pesquisadores sugeriram que a var. *gattii* aparece com maior frequência em pacientes imuno-compententes, sendo menos virulenta que a var. *neoformans* (LEVITZ, 1991) <sup>31</sup>. Não tivemos a possibilidade de realizar a sorotipagem das referidas amostras. De qualquer modo, fica evidente que no Brasil existem as variedades *gattii* e *neoformans*, agentes de neurocriptococose, inclusive em pacientes aidéticos.

Na quimiotipagem do *C. neoformans*, demos preferência ao meio de CGB (Canavanina, Glicina e Azul de Bromotimol), proposto por KWON-CIIUNG et al. (1982) <sup>24</sup>, meio este já estudado em comparação ao CDB (Creatinina, Dextrose e Azul de Bromotimol) e GCP (Glicina, ciclo-heximida e fenol vermelho) e que apresenta melhores resultados.

No Brasil, os primeiros registros sobre a frequência das duas variedades de *C. neoformans* por sorotipagem ou quimiotipagem oferecem os seguintes resultados (Tabela 6).

*C. neoformans* var. *gattii* já foi registrado na Argentina por BAVA & NEGRONI (1990) <sup>2</sup> e em paciente com síndrome de PANCOAST por MITCHELL & SORRELL (1992) <sup>34</sup>.

*C. neoformans* var. *neoformans*, ocorre com grande frequência no Japão e Coréia, por exemplo, predominando a var. *gattii* no Zaire, Quênia, Costa do Marfim e República dos Camarões. Já na Austrália, antes da "epidemia da AIDS", de 102 amostras de *C. neoformans*, a metade era provocada por uma das duas variedades, *neoformans* (50%) e *gattii* (50%).

Convém assinalar que em Adelaide, ELLIS & PFEIFFER (1990) <sup>16</sup> registraram o isolamento do *C. neoformans* var. *gattii* de eucalipto.

Com o advento da AIDS, os casos de criptococose começaram a ser registrados com maior frequência, em cerca de um terço dos pacientes. Atualmente, nos Estados Unidos, mais de 50% dos casos de criptococose ocorrem em pacientes com AIDS, principalmente sob a forma de meningite. A maioria dos pacientes com AIDS é infectada pelo *C. neoformans* var. *neoformans*. Poucos casos são devidos à var. *gattii*, um no Zaire, outro no Canadá, Los Angeles e Brasil (ROZENBAUM et al., 1990) <sup>46</sup>, segundo dados de KWON-CHUNG & BENNETT (1992) <sup>27</sup>. Fora dos Estados Unidos, a incidência da criptococose entre os aidéticos parece ser menor. Na África (parte central) é elevada a incidência da criptococose por *C. neoformans* var. *gattii*.

Os estudos epidemiológicos realizados anteriormente à "epidemia da AIDS" mostram que *C. neoformans* var. *gattii* predominava em regiões tropicais e subtropicais, sendo que o sorotipo B é cerca de 4,5 vezes mais prevalente que o sorotipo C.

Na África Central é tão comum a criptococose entre os aidéticos que a presença desta infecção fúngica quase diagnóstica a AIDS <sup>36, 57</sup>.

Segundo KWON-CIIUNG et al. (1988) <sup>26</sup> os pacientes com AIDS são mais frequentemente infectados com *C. neoformans* var. *neoformans*. De acordo com ROZENBAUM et al. (1992) <sup>47</sup> *C. neoformans* var. *neoformans* seria um agente oportunista e a var. *gattii* um patógeno primário.

NÓBREGA (1987) <sup>36</sup> estudou 35 casos de neurocriptococose, sendo 17 transplantados renais, tra-

Tabela 6

Frequência das duas variedades de *Cryptococcus neoformans* no Brasil, determinadas por sorotipagem ou quimiotipagem.

AUTOR (ES)	Nº DE AMOSTRAS	SOROTIPO	%
LACAZ & RODRIGUES (1983) <sup>28,29</sup> (sorotipagem)	14	A	56,0
- 25 amostras de <i>C. neoformans</i>	2	D	8,0
	9	B	36,0
KWON-CHUNG & BENNETT (1984) <sup>25</sup> (sorotipagem)			
- 20 amostras de <i>C. neoformans</i>	14	A	45,5
var. <i>neoformans</i>	4	D	12,9
	1	AD	3,2
	1	não tipado	3,2
- 11 amostras de <i>C. neoformans</i>	10	B	32,3
var. <i>gattii</i>	0	C	0
	1	não tipado	3,2
CALVO (1988) <sup>9</sup> e CALVO et al. (1990) <sup>10</sup> (sorotipagem)			
- 25 amostras de <i>C. neoformans</i> isoladas	22	A	88,0
do liquor de pacientes aids	3	não tipado	12,0
PAULA et al. (1988) <sup>37</sup> (quimiotipagem)			
- 40 amostras de <i>C. neoformans</i>			
- var. <i>neoformans</i>	25	A-D	62,5
- var. <i>gattii</i>	13	B-C	32,5
- não tipado	2	-	5,0
MENDES et al. (1989) <sup>33</sup> (quimiotipagem)			
- 11 amostras de <i>C. neoformans</i> isoladas de pacientes aids	11	A-D	100,0
ROZENBAUM (1990) <sup>45</sup> e ROZENBAUM et al. (1992) <sup>47</sup>			
- 83 amostras de <i>C. neoformans</i> (quimiotipagem)			
var. <i>neoformans</i>	75	A-D	90,4
var. <i>gattii</i>	8	B-C	9,6
- 27 amostras de <i>C. neoformans</i> (sorotipagem)			
- var. <i>neoformans</i>	19	A	70,3
- var. <i>gattii</i>	8	B	29,6
ROZENBAUM et al. (1990) <sup>46</sup> e (1992) <sup>47</sup> (quimiotipagem)			
- 66 amostras de <i>C. neoformans</i> isoladas de	65	A-D	98,5
pacientes aids	1	B-C	1,5

tados com outros medicamentos imunossupressores diferentes da CsA.

Fato digno de nota observado na Unidade de Transplante Renal do Hospital das Clínicas, trabalho de SAMPAIO et al. (1992)<sup>49</sup>. Estudando 1.168 pacientes transplantados, no período de 1978 - 1990, verificaram 20 casos de neurocriptococose, quando o esquema de imunossupressão era azatioprina e prednisona. A partir de 1986, coincidindo com o emprego da Ciclosporina A houve uma queda significativa na incidência desta infecção. Nenhum dos pacientes sob o uso da CsA teve a infecção fúngica. É provável que a ciclosporina, hoje obtida por síntese, possa ter uma atividade antifúngica sobre o *C. neoformans*. Trata-se de problema a ser melhor investigado.

Aos interessados sobre ciclosporina A, recomenda-

mos a leitura da excelente revisão coordenada por BOREL (1986)<sup>6</sup>. Em 1988 MODY et al.<sup>35</sup>, verificaram em camundongos inoculados com *C. neoformans* por via venosa ou traqueal, o efeito protetor da ciclosporina A (injetada por via subcutânea), o mesmo acontecendo *in vitro*, quando se adicionava o referido imunossupressor aos meios de cultivo contendo o fungo, em concentrações comparáveis aos encontrados no sangue circulante dos camundongos em experimentação. *In vitro*, concentrações de 1 µg/ml inibiam o crescimento de amostras de *C. neoformans*.

Anteriormente, em 1985, PERFECT & DURACK<sup>39</sup>, estudaram os efeitos da ciclosporina A na meningite criptocócica experimental, em coelhos, chegando a resultados diferentes, concluindo, pelos seus achados, que aquele imunodepressor poderia até aumentar a incidência da criptococose em seres humanos, principalmente

se associada à terapêutica com corticóides. Convém referir que neste experimento, a ciclosporina A não foi detectada no liquor em quantidade suficiente para inibir o desenvolvimento do fungo. Sabe-se que a ciclosporina A foi originalmente obtida de um extrato de dois fungos imperfeitos - *Cylindrocarpon lucidon* e *Tolypocladium inflatum*, atuando sobre a interleucina - 2, diminuindo sua liberação através dos linfócitos T ativados.

## SUMMARY

**Biotyping of *Cryptococcus neoformans*. Review of the literature. New epidemiologic informations about cryptococcosis. Our experience with the utilization of C.G.B medium in this yeast.**

The purpose of this work was to collect the main information from the literature about the biotyping of *Cryptococcus neoformans*. The more up-to date research concerning the epidemiology of *cryptococcosis* comprising quite a few articles, mainly after the advent of AIDS, was also reviewed. The *Cryptococcus neoformans* varieties *neoformans* and *gattii* are well defined biochemically nowadays chiefly through the C.G.B. medium, according to KWON-CHUNG et al. (1982)<sup>24</sup>. The isolation of *C. neoformans* var. *gattii* from flowers and leaves of *Eucalyptus camaldulensis* and *Eucalyptus tereticornis*, specially in Australia, through the works of ELLIS & PFEIFFER (1990)<sup>16</sup> and PFEIFFER & ELLIS (1992)<sup>41</sup> permitted very interesting epidemiological investigations on *C. neoformans*, a capsulated yeast by which SANFELICE<sup>50, 51</sup>, in Italy (1894; 1895) attracted attention of medical class. BUSSE<sup>8</sup>, in 1894, described the first human case of cryptococcosis under the presentation of a bone lesion simulating sarcoma.

In this paper, the Brazilian researchers focused on this subject were pointed out, followed by the Author's experience with the C.G.B medium (L - canavanine, glycin and bromothymol blue) proposed by KWON-CHUNG et al. (1982)<sup>24</sup> with very good results. It was possible with such medium the study of 50 C.N.S. liquor samples, being 39 from AIDS patients (78%) and 11 from non-AIDS ones (22%). Thirty-seven out of the 39 HIV- positive patients (74%) were identified as *C. neoformans* var. *neoformans* and 2 (4%) as *C. neoformans* var. *gattii*. From the negative HIV, 8 (16%) were classified as *C. neoformans* var. *neoformans* and 3 (6%) as *C. neoformans* var. *gattii*. We could not perform the serotyping of the above referred samples. It is evident anyway that in Brazil there exist both varieties *gattii* and

*neoformans*, agents of neurocryptococcosis, including AIDS patients.

The importance of neurocryptococcosis, mainly among AIDS patients, is stressed here, showing once more the value of C.G.B. medium in the typing of *C. neoformans* in its two varieties. Also, it is of relevant importance the demonstration that some species of eucalyptus may act as "host-trees" of *C. neoformans* var. *gattii*.

## AGRADECIMENTOS

Otávio Augusto Moreno de Carvalho, Jacy Amaral de Andrade e Marilena dos Anjos Martins pelo fornecimento de algumas culturas de *C. neoformans*, Prof. Gildo Del Negro pela versão do resumo em inglês, Creusa P. Siqueira e Claudia de Freitas Carvalho, pelo trabalho de datilografia e computação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDREU, C.F.; MACHIN, G.M.; SAN PEDRO, J.M. & RODRIGUEZ, B.O. - Identificación de variedades de *Cryptococcus neoformans* mediante la utilización de medios de cultivo. Rev. Cuba. Med. trop., 43: 100-103, 1991.
2. BAVA, A.J. & NEGRONI, R. - Estudio del primer caso autóctono argentino de criptococosis producida por *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. Rev. Iberoamer. Micol., 7: 39-42, 1990.
3. BAVA, A.J. & NEGRONI, R. - Características epidemiológicas de 105 casos de criptococosis diagnosticados en la República Argentina entre 1981-1990. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, 34: 335-340, 1992.
4. BENNETT, J.E.; KWON-CHUNG, K.J. & THEODORE, I.S. - Biochemical differences between serotypes of *Cryptococcus neoformans*. Sabouradia, 16: 167-174, 1978.
5. BENNETT, J.E. & KWON-CHUNG, K.J. - Correlates of serotypes in *Cryptococcus neoformans*. In: DROUHET, E.; COLE, G.T.; REPENTIGNY, L. de; LATGÉ, J.P. & DUPONT, B., ed. Fungal antigens: isolation, purification and detection. Paris, Plenum Publishing, 1989. p. 265-272.
6. BOREL, J.F., ed. - Ciclosporin. Basel, Karger, 1986. (Progress in Allergy, v. 38).
7. BOTTONE, E.J.; KIRSCINER, P.A. & SALK, I.F. - Isolation of highly encapsulated *Cryptococcus neoformans* serotype B from a patient in New York City. J. clin. Microbiol., 23: 186-188, 1986.
8. BUSSE, O. - Ueber parasitare Zelleinschlusse und ihre Zuchtung. Zbl. Bakt., 16: 175-180, 1984.
9. CALVO M.B. - Antígeno capsular, variedades y serotipos de *Cryptococcus neoformans* en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida y neurocriptococosis, en São Paulo, Brasil. São Paulo, 1988. (Dissertação de Mestrado - Escola Paulista de Medicina).



10. CALVO, B.; FISCHMAN, O.; PIGNATARI, A.; DEL BIANCO, R. & ZAROR, L. - Variedades y serotipos de *Cryptococcus neoformans* en pacientes con SIDA y neurocriptococosis en São Paulo, Brasil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 32: 480-482, 1990.
11. CLANCY, M.N.; FLEISCHMANN, J.; HOWARD, D.H.; KWON-CHUNG, K.J. & SHIMIZU, R.Y. - Isolation of *Cryptococcus neoformans gattii* from a patient with AIDS in Southern California. *J. infect. Dis.*, 161: 809, 1990.
12. CONTI-DIAZ, I.A. - Highlights of Cryptococcosis in Uruguay. *Bull. Soc. franc. Mycol. méd.*, 19: 83-90, 1990.
13. DE VROEY, C. & GATTII, F. - *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. Vanbreuseghem and Takashio, 1970. *Mycoses*, 32: 675, 1989.
14. DROMER, F.; RONIN, O & DUPONT, B. - Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from an Asian patient in France. Evidence for dormant infection in healthy subjects. *J. med. vet. Mycol.*, 30: 395-397, 1992.
15. DUFAIT, R.; VELHO, R. & DE VROEY, C. - Rapid identification of the two varieties of *Cryptococcus neoformans* by D-Proline assimilation. *Mycoses*, 30: 482, 1987.
16. ELLIS, D.H. & PFEIFFER, T.J. - Ecology, life cycle and infectious propagule of *Cryptococcus neoformans*. *Lancet*, 336: 923-925, 1990.
17. ELLIS, D. & PFEIFFER, T. - The ecology of *Cryptococcus neoformans*. *Europ. J. Epidem.*, 8: 321-325, 1992.
18. FROMTLING, R.A.; SHADOMY, S.; SHADOMY, H.J. & DISMUKES, W.E. - Serotype B/C *Cryptococcus neoformans* isolated from patients in nonendemic areas. *J. clin. Microbiol.*, 16: 408-410, 1982.
19. GATTI, F. & EECKELS, R. - An atypical strain of *Cryptococcus neoformans* (San Felice) Vuillemin 1894. Part I. - Description of the disease and of the strain. *Ann. Soc. belge Méd. trop.*, 689-694, 1970.
20. GEZUELE, E.; CALEGARI, L.; SANABRIA, D.; DAVEL, G. & CIVILA, E. - *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* aislado de la naturaleza. IN: CONGRESSO ARGENTINO DE MICOLOGIA, 4. E JORNADAS ARGENTINAS DE MICOLOGIA, 14., Huerta Grande, Córdoba, 1989. p. 11.
21. IKEDA, R.; SHINODA, T.; FUKAZAWA, Y. & KAUFMAN, L. - Antigenic characterization of *Cryptococcus neoformans* serotypes and its application to serotyping of clinical isolates. *J. clin. Microbiol.*, 16: 22-29, 1982.
22. KAPENDA, K.; KOMICHELO, K.; SWINNE, D. & VANDEPITTE, J. - Meningitis due to *Cryptococcus neoformans* biovar *gattii* in a Zairean AIDS patient. *Europ. J. clin. Microbiol.*, 6: 320-321, 1987.
23. KWON-CHUNG, K.J.; BENNETT, J.E. & THEODORE, I.S. - *Cryptococcus bacillisporus* sp. nov.: serotype B-C of *Cryptococcus neoformans*. *Int. J. system. Bact.*, 28: 616-620, 1978.
24. KWON-CHUNG, K.J.; POLACHECK, I. & BENNETT, J.E. - Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (Serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. (Serotypes B and C). *J. clin. Microbiol.*, 15: 535-537, 1982.
25. KWON-CHUNG, K.J. & BENNETT, J.E. - Epidemiologic differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Amer. J. Epidem.*, 120: 1123-1130, 1984.
26. KWON-CHUNG, K.J.; VARMA, A.K. & HOWARD, D.H. - Ecology and epidemiology of *Cryptococcus neoformans*: a recent study, of isolates in the United States. In: TORRES-RODRIGUEZ, J.M. ed. CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR HUMAN AND ANIMAL MYCOLOGY - ISHAM, 10. Barcelona, 1988. Proceedings. Barcelona, J.P. Prous Science, 1988. p. 107-112.
27. KWON-CHUNG, K.J. & BENNETT, J.E. - *Medical Mycology*. Philadelphia. Lea & Febiger, 1992.
28. LACAZ, C. da S. & RODRIGUES, M.C. - Sorotipagem do *Cryptococcus neoformans*. *Rev. bras. Med.*, 40: 297-300, 1983.
29. LACAZ, C. da S.; PORTO, E. & MARTINS, J.E.C. - *Micologia médica*. 8 ed. rev. e ampl. São Paulo, Sarvier, 1991.
30. LAZERA, M. dos S. - Fontes saprofíticas de *Cryptococcus neoformans* na cidade do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 1989. (Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro).
31. LEVITZ, S.M. - The ecology of *Cryptococcus neoformans* and the epidemiology of cryptococcosis. *Rev. infect. Dis.*, 13: 1163-1169, 1991.
32. MALIK, R.; WIGNEY, D.I.; MUIR, D.B.; GREGORY, D.J. & LOVE, D.N. - Cryptococcosis in cats: clinical and mycological assessment of 29 cases and evaluation of treatment using orally administered fluconazole. *J. med. vet. Mycol.*, 30: 133-144, 1992.
33. MENDES, C.M.F.; FRANCISCO, W.; SIQUEIRA, L.F.G. & SILVEIRA, M.J. - Sorogrupagem de *Cryptococcus neoformans*. Nota epidemiológica. *Rev. Microbiol. (S. Paulo)*, 20: 333-336, 1989.
34. MITCHELL, D. H. & SORREL, T. C. - Pancoast's syndrome due to pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. *Clin. infect. Dis.*, 14: 1142-1144, 1992.
35. MODY, C.H.; TOEWS, G.B. & LIPSCOMB, M.F. - Cyclosporin A inhibits the growth of *Cryptococcus neoformans* in a murine model. *Infect. Immun.*, 56: 7-12, 1988.
36. NÓBREGA, J.P.S. - Contribuição para o estudo do emprego da anfotericina B no tratamento da neurocriptococose em pacientes submetidos a transplante renal. São Paulo, 1987. (Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo).
37. PAULA, C.R.; ITO, C.H.; PURCHIO, A.; GAMBALE, W.; CORREA, B. & MINAMI, P.S. - Biochemical serotyping and other physiological characteristics of 40 *Cryptococcus neoformans* samples isolated from clinical materials in Brazil. *Rev. Iberoamer. Micol.*, 5 (suppl. 1): 105, 1988 (Abstract P-219).
38. PEREZ RAMIREZ, L.P. - La cryptococose au cours de l'infection VIH: étude épidémiologique et clinique (Hôpital Emilio Ribas, São Paulo, Brésil). Montpellier, 1991. (These de Docteur en Médecine - Faculté de Médecine de Montpellier).
39. PERFECT, J.R. & DURACK, D.T. - Effects of cyclosporine in experimental cryptococcal meningitis. *Infect. Immun.*, 50: 22-26, 1985.

40. PFEIFFER, T. & ELLIS, D. - Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans gattii* from California. *J. infect. Dis.*, 163: 929-930, 1991.
41. PFEIFFER, T.J. & ELLIS, D.H. - Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from *Eucalyptus tereticornis*. *J. med. vet. Mycol.*, 30: 407-408, 1992.
42. POLACHECK, I. & KWON-CHUNG, K. J. - Creatinine metabolism in *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus bacillisporus*. *J. Bact.*, 142: 15-20, 1980.
43. POLACHECK, I.; HEARING, V.J. & KWON-CHUNG, K.J. - Biochemical studies of phenoloxidase and utilization of catecholamines in *Cryptococcus neoformans*. *J. Bact.*, 150: 1212-1220, 1982.
44. RINALDI, M.G.; DRUTZ, D.J.; HOWELL, A.; SANDE, M.A.; WOFSEY, C.B. & HADLEY, W.K. - Serotypes of *Cryptococcus neoformans* in patients with AIDS. *J. infect. Dis.*, 153: 642, 1986.
45. ROZEMBAUM, R. - Criptococose: contribuição ao estudo da micose e de seu agente no Brasil. Rio de Janeiro, 1990. (Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro).
46. ROZEMBAUM, R.; GONÇALVES, A.J.R.; WANKE, B. & VIEIRA, W. - *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in a Brazilian AIDS patient. *Mycopathologia* (Den Haag), 112: 33-34, 1990.
47. ROZEMBAUM, R.; RIOS-GONÇALVES, A.J.; WANKE, B.; CAIUBY, M.J.; CLEMENTE, H.; LAZERA, M. dos S.; MONTEIRO, P.C.F. & LONDERO, A.T. - *Cryptococcus neoformans* varieties as agents of cryptococcosis in Brazil. *Arq. bras. Med.*, 66: 261-263, 1992 e *Mycopathologia* (Den Haag), 119: 133-136, 1992.
48. SALKIN, I.F. & HURD, N.J. - New medium for differentiation of *Cryptococcus neoformans* serotypes pairs. *J. clin. Microbiol.*, 15: 169-171, 1992.
49. SAMPAIO, M.; IANHEZ, L.E. & SABBAGA, E. - Protective effect of cyclosporine in human renal post transplant cryptococcosis. *Transplant. Proc.*, 24: 3051, 1992.
50. SANFELICE, F. - Contributo alla morfologia e biologia dei blastomicetici e si sviluppano nei succhi di alcuni fruttii. *Istituto d'Igiene della R. Università di Cagliari*, 4: 463-498, 1884.
51. SANFELICE, F. - Sull'azione patogena dei blastomiceti. *An. Ist. Igiene Univ. (Roma)*, 5: 239-262, 1895.
52. SHIMIZU, R.Y.; HOWARD, D.H. & CLANCY, M.N. - The variety of *Cryptococcus neoformans* in patients with AIDS. *J. infect. Dis.*, 154: 1042, 1986.
53. STAIB, F. - Vogelkot, ein Nashsubstrat für die Gattung *Cryptococcus*. *Zbl. Bakt.*, 186: 233-247, 1962.
54. STAIB, F.; SEIBOLD, M.; ANTWEILLER, E.; FROHLICH, B.; WEBER, S. & BLISSE, A. - The Brown Colour Effect (BCE) of *Cryptococcus neoformans* in the diagnosis, control and epidemiology of *C. neoformans*. Infections in AIDS patients. *Zbl. Bakt. Hyg. A.*, 266: 167-177, 1987.
55. STAIB, F. - *Cryptococcus neoformans* and cryptococcosis. Historical background. In: TORRES-RODRIGUEZ, J.M. ed. CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR HUMAN AND ANIMAL MYCOLOGY - ISHAM, 10, Barcelona, 1988. *Proceedings*. Barcelona, J.P. Prous Science, 1988. p. 101 - 106.
56. SWINNE, D.; KAYEMBE, K. & NIYIMI, M. - Isolation of saprophytic *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in Kinshasa, Zaire. *Ann. Soc. belge Méd. trop.*, 66: 57-61, 1986.
57. SWINNE, D.; NKURIKIYINFURA, J.B. & MUYEMBE, T.L. - Clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* from Zaire. *Europ. J. clin. Microbiol.*, 5: 50-51, 1986.
58. SWINNE, D. & LUMBILA, M. - *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, agents de la criptococose. *Bull. Acad. roy. Méd. Belg.*, 142: 238-248, 1987.
59. SWINNE, D.; DEPPNER, M.; MANIRATUNGA, S.; LAROCHE, R.; FLOCH, J.J. & KADENSE, P. - AIDS - associated cryptococcosis in Bujumbura, Burundi and epidemiological study. *J. med. vet. Mycol.*, 29: 25-30, 1991.
60. VANBREUSEGHEM, R. & TAKASHIO, M. - An atypical strain of *Cryptococcus neoformans* (San Felice) Vuillemin, 1894. Part. II - *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* var. nov. *Ann. Soc. belge Méd. trop.*, 50: 695-702, 1970.

Recebido para publicação em 30/03/1993.

Aceito para publicação em 21/07/1993.