

CHRYSTIANE RODRIGUES PASA

**TIPAGEM MOLECULAR E SUSCETIBILIDADE ANTIFÚNGICA DE
CRYPTOCOCCUS ISOLADOS DE PACIENTES EM HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO COM INVESTIGAÇÃO DOMICILIAR**

CAMPO GRANDE
2011

CHRYSTIANE RODRIGUES PASA

**TIPAGEM MOLECULAR E SUSCETIBILIDADE ANTIFÚNGICA DE
CRYPTOCOCCUS ISOLADOS DE PACIENTES EM HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO COM INVESTIGAÇÃO DOMICILIAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Marilene Rodrigues Chang

CAMPO GRANDE
2011

FOLHA DE APROVAÇÃO

CHRYSTIANE RODRIGUES PASA

**TIPAGEM MOLECULAR E SUSCETIBILIDADE ANTIFÚNGICA DE
CRYPTOCOCCUS ISOLADOS DE PACIENTES EM HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO COM INVESTIGAÇÃO DOMICILIAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Resultado _____

Campo Grande (MS), _____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Márcia dos Santos Lazéra
Fundação Oswaldo Cruz

Prof. Dr. José Ivan Albuquerque Aguiar
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Profª. Dra. Marilene Rodrigues Chang
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

DEDICATÓRIA

A Deus por estar presente
em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais que são a minha razão de viver,
Aos meus irmãos companheiros que me dão forças,
Ao meu marido que me incentiva a buscar novos projetos,
pelo amor, dedicação, apoio, motivação e incentivo
que me guiam em todas as conquistas.

AGRADECIMENTOS

- A minha orientadora Dra. Marilene Rodrigues Chang que doou seu conhecimento e seu tempo, agradeço sua orientação e minha sincera gratidão.
- A Máina Oliveira Nunes do Laboratório de Micologia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul pelo ensinamento da técnica de antifungograma, fornecimento das amostras clínicas e por todo o auxílio prestado.
- A Dra. Nájla Mohamad Kassab e o Dr. Marcos Serrou do Amaral, meus orientadores de Iniciação Científica, pelo incentivo para a realização deste mestrado.
- A companheira de mestrado Mariê dos Santos Gomes pela ajuda e acompanhamento em todo o trabalho.
- A Dra. Luciana Trilles da Fundação Oswaldo Cruz- FIOCRUZ/RJ pelo treinamento das técnicas de biologia molecular e esclarecimento das dúvidas.
- A Dra. Maria de Fátima Cepa Matos pela disponibilização do laboratório de biologia molecular.
- Ao Manoel Sebastião da Costa Lima Junior pelo acompanhamento nas técnicas de biologia molecular.
- Ao Fernando Lopes Aguilar pela ajuda na construção dos resultados e tabelas.
- Ao Dr. Albert Schiaveto de Souza pela ajuda na análise estatística.
- As técnicas Débora de Souza Olartechea de Alencar e Fernanda Luiza Espinosa Sposito pela ajuda na preparação dos materiais necessários para a pesquisa.
- A aluna de iniciação científica Ágata Nogueira D'Aurea Moura pela ajuda nas visitas e coletas ambientais nos domicílios dos pacientes.
- Ao Dr. Eriques G. Silva da Universidade de São Paulo pela doação do voriconazol
- Aos funcionários do Hospital Universitário da UFMS pela gentileza e atenção.
- Aos pacientes e familiares que participaram da pesquisa.
- A Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul – FUNDECT pelo apoio financeiro para a realização do projeto.
- Ao Programa de Pós-Graduação Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste que possibilitaram a realização deste trabalho.
- A todos aqueles que diretamente ou indiretamente ajudaram e colaboraram para a realização deste trabalho.

*“Uma pessoa inteligente resolve um problema,
um sábio o previne”.*
(Albert Einstein)

RESUMO

Pasa CR. Tipagem molecular e suscetibilidade antifúngica de *Cryptococcus* isolados de pacientes em hospital universitário com investigação domiciliar. Campo Grande-MS; 2011. [Dissertação – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

A criptococose é uma infecção de caráter sistêmico causada por *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. Acomete tanto pacientes imunodeprimidos como normais e apresenta alta letalidade. O objetivo deste estudo foi verificar a espécie e o tipo molecular de *Cryptococcus* isolados de casos diagnosticados, determinar o perfil de suscetibilidade a antifúngicos utilizados na prática clínica e investigar a presença desses agentes no ambiente domiciliar dos pacientes com criptococose atendidos em Hospital Universitário de Mato Grosso do Sul no período de fevereiro de 2009 a julho de 2010. As amostras clínicas e ambientais foram identificadas por testes fenotípicos padronizados. A suscetibilidade antifúngica foi determinada pelo método de microdiluição em caldo conforme *Clinical Laboratory Standards Institute* (M27-A3) com os antifúngicos fluconazol, itraconazol, voriconazol e anfotericina B. A tipagem molecular foi realizada pelo método *Restriction Fragment Length Polymorphisms* - URA5. No período foram diagnosticados 15 pacientes com criptococose. Meningoencefalite (46,7%) e infecção disseminada (26,7%) foram as síndromes clínicas mais observadas. Entre os pacientes estudados 60,0% eram portadores do HIV. A letalidade geral foi de 46,7%, sendo 44,5% em HIV positivos e nenhum óbito foi observado em HIV negativos. A tipagem molecular das leveduras isoladas de amostras clínicas revelou que 73,3% eram *C. neoformans* (VNI) e 26,7% *C. gattii* (VGII). Em apenas uma residência das seis visitadas foi possível isolar *C. neoformans* com o mesmo tipo molecular da amostra clínica (VNI). *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* foram sensíveis a todos os antifúngicos testados. A presença de *Cryptococcus neoformans* na poeira doméstica sugere a possibilidade de infecção intradomiciliar e ressalta a importância de estudar a ecoepidemiologia desta doença. Este foi o primeiro trabalho de caracterização molecular e de suscetibilidade antifúngica de *Cryptococcus* sp. realizado em Mato Grosso do Sul e pela primeira vez foi realizado a tipagem molecular de *Cryptococcus* sp. isolados do ambiente domiciliar dos pacientes com criptococose.

Palavras-chave: criptococose, epidemiologia, RFLP, ambiente domiciliar, Brasil.

ABSTRACT

Pasa CR. Molecular typing and antifungal susceptibility of *Cryptococcus* isolates from patients in a teaching hospital, with domiciliary follow-up investigation. Campo Grande-MS; 2011. [Dissertation – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

Cryptococcosis, an infection of systemic features, is caused by *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. It affects both normal and immunocompromised patients and has been associated with high mortality. The purpose of this study was to identify the species and molecular types of *Cryptococcus* isolates from diagnosed cases, determine their susceptibility to antifungal agents used in clinical practice, and investigate the presence of these agents in the households of patients treated for cryptococcosis at the Hospital Universitário de Mato Grosso do Sul from February 2009 to July 2010. Clinical and environmental samples were identified using standard phenotypic tests. Susceptibility to antifungal agents (fluconazole, itraconazole, voriconazole, and amphotericin B) was determined using the Clinical Laboratory Standards Institute (M27-A3) broth microdilution method. Molecular typing was based on the restriction fragment polymorphisms – URA5 method. Fifteen patients were diagnosed with cryptococcosis during the period of study. Meningoencephalitis (46.7%) and disseminated infection (26.7%) were the most frequently observed clinical syndromes. Of the patients investigated, 60.0% were HIV-infected. Overall mortality was 46.7%. Among HIV-positive patients, the death rate was 44.5% whereas no deaths among HIV-negative individuals. Molecular typing of yeasts isolated from clinical samples revealed 73.3% to be *C. neoformans* (VNI) and 26.7% *C. gattii* (VGII). *Cryptococcus neoformans* had the same molecular type as the clinical specimen (VNI) in only one of the six residences visited. *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* were sensitive to all antifungal agents tested. The presence of *Cryptococcus neoformans* in household dust suggests domestic infection, underscoring the importance of investigating the ecoepidemiology of this disease. This was the first study on the molecular characterization and antifungal susceptibility of *Cryptococcus* sp. conducted in Mato Grosso do Sul state and the first to include molecular typing of *Cryptococcus* sp. isolated from the domestic environment of patients with cryptococcosis.

Keywords: cryptococcosis, epidemiology, RFLP, domestic environment, Brazil.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Varição das espécies de referência recomendada pelo CLSI (2008) segundo Concentração Inibitória Mínima (CIM) e espécie.....	59
Tabela 2 -	Características demográficas de 15 pacientes com criptococose segundo o agente etiológico, Campo Grande-MS, fevereiro de 2009 a julho de 2010.....	61
Tabela 3 -	Pacientes com criptococose segundo profissão ou ocupação e o agente etiológico, Campo Grande-MS, fevereiro de 2009 a julho de 2010.....	62
Tabela 4 -	Pacientes com criptococose segundo síndrome clínica e a infecção pelo HIV, Campo Grande-MS, fevereiro de 2009 a julho de 2010.....	63
Tabela 5 -	Características clínicas de pacientes com criptococose, Campo Grande-MS, fevereiro de 2009 a julho de 2010.....	66
Tabela 6 -	Pacientes com criptococose segundo tipo de atendimento, tratamento e evolução, Campo Grande-MS, fevereiro de 2009 a julho de 2010.....	67
Tabela 7 -	Pacientes com criptococose segundo tratamento, evolução e infecção pelo HIV, Campo Grande-MS, fevereiro de 2009 a julho de 2010.....	68

Tabela 8 -	Pacientes HIV positivos com criptococose segundo tempo de diagnóstico do HIV, uso de terapia antiretroviral e contagem de células CD4, Campo Grande-MS, fevereiro de 2009 a julho de 2010.....	68
Tabela 9 -	Exame quimiocitológico de líquido cefaloespinal de dez pacientes com criptococose, Campo Grande-MS, fevereiro de 2009 a julho de 2010	69
Tabela 10 -	Domicílios dos pacientes em que não houve coleta ambiental segundo o motivo, Campo Grande-MS, fevereiro de 2009 a julho de 2010.....	70
Tabela 11 -	Amostras ambientais coletadas em seis domicílios segundo sítio de isolamento, positividade e espécies isoladas, Campo Grande-MS, fevereiro de 2009 a julho de 2010.....	71
Tabela 12 -	Variação e média geométrica da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de quatro agentes antifúngicos segundo as espécies de <i>Cryptococcus</i> isoladas de amostras clínicas, Campo Grande-MS, fevereiro de 2009 a julho de 2010.....	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Aspecto mucóide e cor característica de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> em agar níger.....	45
Figura 2 -	Teste do meio CGB.....	45
Figura 3 -	Desenho esquemático da extração do DNA genômico de <i>Cryptococcus</i> sp.....	47
Figura 4 -	Desenho esquemático da reação de RFLP (<i>restriction fragment length polymorphisms</i>)-URA5.....	50
Figura 5 -	Perfil <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (RFLP) do gene URA5 duplamente digerido com <i>Sau96I</i> e <i>HhaI</i> das oito cepas padrão de <i>Cryptococcus</i> sp. caracterizando os oito tipos moleculares conhecidos.....	51
Figura 6 -	Desenho esquemático de diluições para os antifúngicos anfotericina B, itraconazol e voriconazol.....	54
Figura 7 -	Desenho esquemático de diluições do antifúngico fluconazol.....	55
Figura 8 -	Distribuição dos antifúngicos diluídos nas microplacas.....	56
Figura 9 -	Distribuição do inóculo diluído, do Controle de Esterilidade e de Crescimento na microplaca.....	58
Figura 10 -	Criptococose cutânea primária em antebraço direito.....	65

Figura 11 -	Resolução da criptococose cutânea primária após dezoito meses da infecção.....	65
Figura 12 -	Lesão cutânea primária após 24 dias do início do tratamento antifúngico.....	65
Figura 13 -	Domicílio de um paciente com criptococose cutânea exemplificando algumas condições de moradia observadas durante a pesquisa.....	70
Figura 14 -	Domicílio do paciente com criptococose disseminada onde foi isolado <i>C. neoformans</i> na poeira intradomiciliar localizada no sótão.....	71
Figura 15 -	Perfil da amplificação do gene URA5 ($\approx$ 750 bp) pela técnica de PCR de <i>Cryptococcus</i> isolados de amostras clínicas.....	72
Figura 16 -	Perfil <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (RFLP) do gene URA5 duplamente digerido com <i>Sau96I</i> e <i>HhaI</i> de <i>Cryptococcus</i> isolados de amostras clínicas nº 1 a 25.....	72
Figura 17 -	Perfil <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (RFLP) do gene URA5 duplamente digerido com <i>Sau96I</i> e <i>HhaI</i> de <i>Cryptococcus</i> isolados de amostras clínicas nº 26 a 34.....	73
Figura 18 -	Perfil <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (RFLP) do gene URA5 duplamente digerido com <i>Sau96I</i> e <i>HhaI</i> de <i>Cryptococcus neoformans</i> isolado da amostra clínica 187UR-09 e ambiental A17 de paciente com criptococose disseminada.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFLP	Polimorfismo de tamanho de fragmentos amplificados – <i>amplified fragment lenght polymorphism</i>
AIDS	<i>Acquired immunodeficiency syndrome</i> - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
AMB	Anfotericina B
ASD	Agar Sabouraud dextrose
ATCC	<i>American type culture collection</i>
BHI	<i>Brain heart infusion</i>
CC	Controle de Crescimento
CD4	Linfócito T <i>helper</i>
CD8	Linfócito T citotóxico
CE	Controle de Esterilidade
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CGB	Meio de cultura de cavanina-glicina-azul de bromotimol
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CTI	Centro de Terapia Intensiva
DIP	Doenças Infecciosas e Parasitárias
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetra-acético
ELISA	Teste imunoenzimático para detecção de antígenos e anticorpos – <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
EUA	Estados Unidos da América
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FLC	Fluconazol
<i>HhaI</i>	Enzima de restrição obtida pelo gene de <i>Haemophilus haemolyticus</i> (ATCC 10014)
HCl	Ácido clorídrico

HIV	Vírus da imunodeficiência humana – <i>human immunodeficiency virus</i>
IFN γ	Citocina Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IL-12	Interleucina-12
IL-18	Interleucina-18
ITC	Itraconazol
LCE	Líquido cefaloespinhal (líquor)
MLST	<i>Multi locus sequence typing</i>
MOPS	Ácido 3-morfolinopropano-1-sulfônico
NaCl	Cloreto de sódio
NCCLS	<i>National Commitee for Clinical Laboratory Standards</i>
NHU-UFMS	Núcleo do Hospital Universitário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
NK	<i>Natural killer</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase – <i>polymerase chain reaction</i>
PFGE	Análise eletroforética do cariótipo celular em campo pulsátil - <i>pulsed-field gel eletrophoresis</i>
RAPD	Análise por DNA polimórfico amplificado ao acaso – <i>randomly amplified polymorphic DNA analysis</i>
RFLP	Análise de fragmentos de DNA gerados por enzimas de restrição - <i>restriction fragment length polymorphisms</i>
RNA	Ácido ribonucléico
RPMI 1640	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (meio composto por aminoácidos e vitaminas)
<i>Sau96I</i>	Enzima de restrição obtida pelo gene de <i>Staphylococcus aureus</i> PS96 (ATCC 49831)
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SNC	Sistema Nervoso Central
TARV	Terapia antirretroviral
TBE	Tampão Tris-Borato-EDTA
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNF α	Citocina Fator de Necrose Tumoral alfa

URA5	Gene da enzima ortidina monofosfato pirofosforilase
VRC	Voriconazol
YNB	<i>Yeast nitrogen base</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

$\mu\text{g}/\text{mg}$	micrograma por miligrama
$\mu\text{g}/\text{mL}$	micrograma por mililitro
μL	microlitro
μm	micrômetro
bp	pares de bases
células/ μL	células por microlitro
células/mL	células por mililitro
cópias/mL	cópias por mililitro
g	grama
g/L	grama por litro
h	hora
leucócitos/ μL	leucócitos por microlitro
M	molar
mg	miligrama
mg/dia	miligrama por dia
mg/dL	miligrama por decilitro
mg/kg/dia	miligrama por kilograma por dia
mL	mililitro
mM	milimolar
ng/ μL	nanograma por microlitro
p	probabilidade
pH	potencial hidrogeniônico
pmol	picomol
sp.	espécie
spp.	espécies
U	unidade
U/mL	unidade por mililitro
v	volume
xg	unidade gravitacional

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 <i>Cryptococcus</i> e suas características.....	20
2.1.1 Caracterização molecular.....	23
2.1.2 Outras espécies de <i>Cryptococcus</i> spp.....	25
2.2 Ecologia.....	26
2.3 Epidemiologia da criptococose.....	28
2.4 Patogênese e formas clínicas.....	29
2.5 Diagnóstico Clínico e Laboratorial.....	32
2.5.1 Testes de suscetibilidade antifúngica.....	33
2.6 Tratamento.....	35
3 OBJETIVOS	39
3.1 Objetivo geral	39
3.2 Objetivos específicos	39
4 MATERIAL E CASUÍSTICA	40
4.1 Tipo de estudo	40
4.2 Casuística.....	40
4.2.1 Definição de caso.....	40
4.3 Período e local do estudo	40
4.4 Caracterização epidemiológica e clínica.....	41
4.4.1 Conceitos e definições.....	42
4.5 Caracterização laboratorial.....	42
4.5.1 Coleta de amostras	42
4.5.2 Processamento das amostras	43
4.5.2.1 Amostras clínicas	43
4.5.2.2 Amostras ambientais	43
4.5.3 Identificação a nível de espécie	43
4.5.4 Seleção das amostras.....	44
4.5.5 Tipagem molecular	46

4.5.5.1 Tipos moleculares de referência	46
4.5.5.2 Extração de DNA genômico	46
4.5.5.3 RFLP (<i>restriction fragment length polymorphisms</i>)-URA5	48
4.5.5.3.1 Reação de PCR (reação em cadeia da polimerase)	48
4.5.5.3.2 Eletroforese da amplificação de DNA	48
4.5.5.3.3 Reação de RFLP	49
4.5.5.3.4 Eletroforese do RFLP	49
4.5.5.3.5 Análise dos perfis gerados pelo RFLP	50
4.5.6 Determinação da suscetibilidade antifúngica	51
4.5.6.1 Agentes antifúngicos	51
4.5.6.2 Preparação das microplacas com antifúngicos	52
4.5.6.3 Preparação do inóculo e sua distribuição	57
4.5.6.4 Controle de qualidade	57
4.5.6.5 Leitura e interpretação da suscetibilidade antifúngica	59
4.6 Organização e análise dos dados	60
4.7 Considerações éticas	60
5 RESULTADOS	61
6 DISCUSSÃO	75
7 CONCLUSÕES	93
REFERÊNCIAS	95
ANEXOS	119
APÊNDICES	121

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, observa-se um aumento acentuado de infecções fúngicas invasivas, principalmente em indivíduos imunocomprometidos. Dados da literatura referem que este fato pode ser decorrente da epidemia da *acquired immunodeficiency syndrome* (AIDS) e do aumento do uso de imunossupressores como em neoplasias, transplantes de órgãos, doença de Hodgkin, lúpus eritematoso sistêmico, desordens linfoproliferativas, leucemias, sarcoidose entre outras (BADDLEY *et al.*, 2008; BICANIC; HARRISON, 2004; DARZÉ *et al.*, 2000; HUSAIN; WAGENER; SINGH, 2001; MITCHELL; PERFECT, 1995; MORETTI *et al.*, 2008).

A criptococose é uma importante micose de patogenia sistêmica, caráter oportunista, causada por *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. Anteriormente o fungo era classificado como uma espécie e duas variedades e hoje, pelas diferenças filogenéticas, no ciclo sexuado e morfologia dos basidiósporos, bem como diferenças fenotípicas e metabólicas, sustentam-se a idéia de duas espécies distintas (BOEKHOUT *et al.*, 2001; DIAZ *et al.*, 2000; KWON-CHUNG *et al.*, 2002; KWON-CHUNG; VARMA, 2006).

A infecção é adquirida pela inalação de propágulos infectantes que podem levar a primoinfecção pulmonar. Por disseminação hematogênica, pode atingir outros órgãos (BIVANCO; MACHADO; MARTINS, 2006) com especial tropismo pelo Sistema Nervoso Central (SNC). Entre as diferentes manifestações clínicas, a mais frequente é a meningoencefalite, que está associada à elevada taxa de letalidade (BICANIC; HARRISON, 2004; KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; LINDENBERG *et al.*, 2008).

A espécie *C. neoformans* geralmente acomete indivíduos imunodeprimidos, entre os quais pode se destacar os portadores de AIDS. A levedura pode ser encontrada em diversas fontes ambientais, principalmente em excretas de aves, madeira em decomposição e em detritos vegetais dentro de ocos de diversas árvores (COSTA *et al.*, 2009; LAZÉRA; WANKE; NISHIWAKA, 1993; LAZÉRA *et al.*, 1996; PASSONI *et al.*, 1998). A universalidade, peculiar adaptação e concentração demasiada de algumas espécies de aves nas áreas urbanas, especialmente pombos, favorecem a formação de microfocos e a exposição ao fungo. E até mesmo a poeira domiciliar pode ser fonte de infecção (PASSONI *et al.*, 1998;

REOLON; PEREZ; MEZZARI, 2004; SWINNE; KAYEMBE; NIYIMI, 1986; SWINNE *et al.*, 1989).

Por outro lado, *C. gattii* está mais associado a material vegetal em decomposição, principalmente em ocos de árvores (LAZÉRA *et al.*, 1998), e acomete, em sua maioria, os indivíduos imunocompetentes (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992).

Os índices de morbidade e letalidade da criptococose, mesmo com o surgimento de novas abordagens terapêuticas, ainda permanecem elevados. E com o aumento do número de pacientes imunodeprimidos suscetíveis tem sido necessária a implementação de métodos laboratoriais para melhor subsidiar o diagnóstico clínico.

O serviço de Doenças Infecciosas e Parasitárias (DIP) do NHU-UFMS, um centro de referência em micoses sistêmicas no estado de Mato Grosso do Sul que presta atendimento especializado a portadores de doenças infectoparasitárias. A equipe multiprofissional de pesquisadores da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul vem desenvolvendo alguns estudos na tentativa de obter dados padronizados de diagnóstico e tratamento que possam fortalecer o Sistema Nacional de Vigilância de infecções fúngicas invasivas.

Estudos clínico-epidemiológicos são ferramentas úteis na elaboração de medidas de prevenção e terapias efetivas. Os dados obtidos na investigação realizada certamente contribuirão com a ecoepidemiologia da criptococose em Mato Grosso do Sul, entre outras coisas por isolar *Cryptococcus neoformans* em ambiente domiciliar de paciente acometido pela doença, informação essa que pode ser útil no sentido de minimizar a exposição de outras pessoas, de adquirir a infecção ou se reinfectarem.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Cryptococcus* e suas características

A primeira descrição do agente de criptococose, como patógeno humano, foi feita por Busse em 1894 (*apud* KWON-CHUNG; BENNETT, 1992) pela observação de levedura arredondada causando lesão semelhante a um sarcoma na tíbia de um paciente que faleceu em decorrência da disseminação do mesmo e foi denominada *Saccharomyces hominis*. No mesmo ano, Sanfelice (*apud* KWON-CHUNG; BENNETT, 1992) isolou uma levedura encapsulada em suco de pêssego e denominou-a de *Saccharomyces neoformans*, demonstrando o primeiro isolamento em natureza.

Em 1901, o micologista Vuillemin classificou as leveduras isoladas por Busse (1894) e Sanfelice (1894) como gênero *Cryptococcus* devido à ausência de ascóporos e fermentação de carboidratos, características do gênero *Saccharomyces*. Sendo então denominados *Cryptococcus hominis* e *C. neoformans* (*apud* KWON-CHUNG; BENNETT, 1992).

Von Hansemann (*apud* KWON-CHUNG; BENNETT, 1992), em 1905, relatou a primeira observação do fungo em necropsia de cérebro humano e no mesmo ano Stoddard e Cutler (*apud* KWON-CHUNG; BENNETT, 1992) descreveram dois casos de meningite e denominaram o fungo como *Torula histolytica*. Posteriormente, em 1914, Verse (*apud* KWON-CHUNG; BENNETT, 1992) reconheceu o primeiro caso de meningite criptococócica. Em 1935, Benham concluiu que se tratava de uma única espécie: *Cryptococcus hominis*, contendo duas variedades. Anos depois, em 1950, o mesmo autor estabeleceu o nome da doença como criptococose e seu agente como *Cryptococcus neoformans* (*apud* KWON-CHUNG; BENNETT, 1992). Entretanto os isolados de *Cryptococcus* continuam sob revisão taxonômica até os dias atuais.

O complexo *Cryptococcus neoformans* compreende duas variedades: *neoformans* e *gattii*. Franzot, Salkin e Casadevall (1999) sugeriram uma terceira variedade, a *grubii*, após identificarem diferenças genéticas significativas e esta terminologia foi utilizada por muitos autores. Atualmente estas variedades são

reconhecidas como duas espécies diferentes após a observação de características filogenéticas distintas e divergentes: *Cryptococcus neoformans* que abrange *C. neoformans* variedade *grubii* e variedade *neoformans* e *Cryptococcus gattii* (antigo *C. neoformans* variedade *gattii*). Estas espécies apresentam diferenças bioquímicas, antigênicas, fenotípicas, genéticas, epidemiológicas e ecológicas (BOEKHOUT *et al.*, 2001; DIAZ *et al.*, 2000; KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; KWON-CHUNG *et al.*, 2002; KWON-CHUNG; VARMA, 2006).

Cryptococcus neoformans e *C. gattii* são as formas assexuadas (anamórfica) de basidiomicetos zoopatógenos (forma sexuada ou teleomórfica) *Filobasidiella neoformans* e *F. bacillispora* respectivamente. Dois tipos sexuais distintos são conhecidos: *mating-type* α e *a*. A reprodução sexuada ocorre por conjugação e é conhecida apenas *in vitro*, entretanto ambos *mating-types* coexistem em um mesmo nicho, o que possibilitaria cruzamentos naturais (LAZÉRA *et al.*, 2000). O *mating-type* α é mais prevalente em amostras clínicas e ambientais (SPRINGER; CHATUVERDI, 2010).

Cinco sorotipos são conhecidos conforme antígenos capsulares: o sorotipo A (variedade *grubii*), o sorotipo D (variedade *neoformans*), os sorotipos B e C (*C. gattii*) e o sorotipo AD que é considerado um híbrido do cruzamento do sorotipo A e D (LENGELER; COX; HEITMAN, 2001). A presença dos subgrupos AI e AII foi relatada por Litvintseva *et al.* (2005). E mais recentemente foi descrito o isolamento de um híbrido BD (BOVERS *et al.*, 2006).

A classificação do sorotipo é baseada nas diferenças sorológicas dos antígenos capsulares (LENGELER; COX; HEITMAN, 2001) observadas no teste de aglutinação Crypto Check (Iatron, Japão), entretanto, atualmente este kit encontra-se indisponível para comercialização. Esta classificação torna-se difícil, pois frequentemente observa-se divergências significativas a nível molecular entre os sorotipos (ABEGG *et al.*, 2006), já que os limites dos sorotipos não coincidem totalmente com os grupos genéticos e desta forma a sorotipagem não é uma característica confiável para diferenciar cepas (BOEKHOUT *et al.*, 2001). Além disso, alguns resultados de sorotipos não são correlacionados com o método de tipagem molecular como, por exemplo, no estudo realizado por Meyer *et al.* (2003) em que foi observado três cepas do sorotipo D pelo método de aglutinação (Crypto Check) identificadas pelos métodos PCR *fingerprinting* e RFLP-URA5 como sorotipo

AD, estas mudanças podem resultar da instabilidade de cepas diplóides durante propagação prolongada (LENGELER; COX; HEITMAN, 2001).

Com o desenvolvimento e aprimoramento das técnicas de biologia molecular foi possível a classificação dessa levedura em oito tipos moleculares: *C. neoformans* em VNI (sorotipo A), VNII (sorotipo A), VNIII (sorotipo AD) e VNIV (sorotipo D). *C. gattii* por sua vez foi tipado como VGI, VGII, VGIII e VGIV, porém não foi encontrada correlação entre sorotipo e tipo molecular para esta espécie (MEYER *et al.*, 1999, 2003). A observação dos subgrupos VGIIa e VGIIb foi relatada por Kidd *et al.* (2004).

Segundo Kwon-Chung e Varma (2006) a classificação da espécie não deve ser baseada apenas nos sorotipos, pois estes são fundamentados pela propriedade antigênica e esta não é estável, além de que podem existir subgrupos dentro de cada sorotipo. Desta forma, para evitar confusão na identidade das linhagens, são definidas duas espécies: *C. neoformans* sorotipos A, D e AD enquanto *C. gattii* sorotipos B e C. Os autores referem ainda que para determinar características mais profundas, tais como o subgrupo, deve ser feito a caracterização molecular da cepa de interesse por meio de técnicas padronizadas.

Quanto à morfologia, as leveduras *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* são estruturas globosas ou ovóides que medem de 3 a 8 µm normalmente envolvidas por uma cápsula mucopolissacarídea, composta principalmente por glucuronoxilomanana que permite a classificação dos sorotipos e apresenta grau variável de encapsulamento dependendo do genótipo e de fatores ambientais (cápsulas pequenas no ambiente e espessas na maioria das infecções). Raramente apresentam pseudohifas curtas e reproduzem-se por brotamento único ou múltiplo com colo estreito (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; MITCHELL; PERFECT, 1995).

Esses microrganismos crescem bem em temperaturas que variam de 25 a 40 °C com temperatura ótima de 30 °C. As colônias costumam ser lisas, mucóides, de coloração branca a creme no período de 48 a 72h. A mucosidade da colônia está relacionada à espessura da cápsula (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992).

Drogas como ciclohexemida são inibidoras de *Cryptococcus* spp. Quanto ao metabolismo, esses fungos não fermentam carboidratos, nem assimilam lactose, melibiose e nitrato de potássio, mas assimilam glicose, maltose, sacarose, galactose, inositol, xilose, trealose, dulcitol, manitol e peptona (LARONE, 1995). A partir de compostos difenólicos como ácido caféico, ácido clorogênico, L-dopa,

dopamina, norepinefrina, epinefrina produzem melanina, que se difunde e impregna a cápsula formando colônias marrons dentro de cinco dias de incubação em meios com tais substratos. São produtoras de urease e na microscopia direta da levedura com nigrosina (tinta da China) é possível a observação do contorno da cápsula, pois este reagente não penetra na mesma (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992).

As espécies *C. neoformans* e *C. gattii* podem ser diferenciadas pelo cultivo no meio CGB (Cavanina-Glicina-Azul de Bromotimol) no qual apenas *C. gattii* cresce utilizando a glicina como fonte de carbono e nitrogênio provocando a alcalinização do meio mudando-o para a coloração azul cobalto (KWON-CHUNG; POLACHEK; BENNETT, 1982). *Cryptococcus neoformans* é sensível a L-cavanina presente no meio. Existem outras características morfológicas diferentes entre as duas espécies como, por exemplo, as colônias de *C. gattii* costumam ser mais mucóides e pegajosas (sem interferência na produção da cápsula) e apresentam menos intensidade marrom e pode apresentar uma nuance esverdeada no agar níger, além disso, as leveduras são mais elípticas quando comparadas com *C. neoformans* (KWON-CHUNG; VARMA, 2006).

2.1.1 Caracterização molecular

A biologia molecular fornece informações sobre aspectos epidemiológicos, caracterização das linhagens, distinção entre cepas, dados importantes para determinar recidivas ou novas infecções. Desta forma um grande número de técnicas vem sendo desenvolvidas, como análises de fragmentos de DNA (ácido desoxirribonucléico) gerados por enzimas de restrição (RFLP), análise eletroforética do cariótipo celular em campo pulsátil (PFGE), cariotipagem, análise por DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD), sequenciamento de DNA, reação em cadeia da polimerase (PCR) *fringerprinting*, polimorfismo de tamanho de fragmentos amplificados (AFLP) e elas têm revelado grande heterogeneidade genética entre as espécies (BOEKHOUT *et al.*, 1997; BOEKHOUT *et al.*, 2001; DIAZ *et al.*, 2000; MEYER *et al.*, 1999, 2003).

A técnica de PCR *fringerprinting* é uma das mais utilizadas e combina a especificidade da hibridização clássica de DNA com a rapidez e simplicidade da

reação de PCR. Os *primers* do minissatélite específico da sequência do core (fago M13) e da sequência repetitiva simples (microsatélites GACA₄ ou GTG₅) são utilizados para a amplificação do DNA. Esta técnica apresenta boa reprodutibilidade devido ao alto grau de homologia entre os *primers* e o molde de DNA. Além disso, os padrões das bandas são estáveis nos isolados, mesmo quando testados após anos de armazenagem ou repiques sucessíveis, entretanto este método requer condições padronizadas, pois pequenas variações podem ocorrer (MEYER *et al.*, 1999). Estudos multicêntricos realizados por Meyer *et al.* (1999, 2003) utilizando esta técnica permitiu a classificação do fungo em oito tipos moleculares conhecidos.

A técnica de RFLP é comumente empregada para a diferenciação entre cepas de uma mesma espécie, determinando o tipo molecular das cepas de *Cryptococcus* sp. Esta técnica visa identificar diferenças na sequência de DNA e pode ser realizada associada a PCR. Assim, um determinado fragmento gênico é amplificado com *primers* específicos e posteriormente submetido à ação de enzimas de restrição que cortam este gene em sítios determinados, produzindo fragmentos de DNA com sequências específicas (ABREU, 2007).

O gene URA5 (744 bp), que codifica a enzima ortidina monofosfato pirofosforilase (SORRELL, 2001; XU; VILGALYS; MITCHELL, 2000), utilizado no RFLP, apresenta cópia única, sequência conhecida (CASADEVALL *et al.*, 1992b) e é polimórfico na sequência do nucleotídeo com conservação da estrutura primária da enzima. No estudo realizado por Casadevall e Fan (1992a) para determinar a sequência de nucleotídeo da proteína codificada pela região do gene URA5 entre as variedades *neoformans* e *gattii*, os autores notaram *exons* e *introns* idênticos em tamanho e localização. As proteínas estruturais codificadas apresentaram 98% de similaridade, demonstrando homologia entre as variedades e permitindo o uso do gene URA5 para estudos moleculares.

A técnica de RFLP-URA5 é considerada uma boa ferramenta para a epidemiologia molecular de *Cryptococcus* sp. e tem sido utilizada por alguns autores (COSTA *et al.*, 2009; FRASÉS *et al.*, 2009; MEYER *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2008; TRILLES *et al.*, 2008). A análise dos padrões genômicos obtidos pela digestão do gene URA5 demonstra a distinção dos oito tipos moleculares principais, fornece sensibilidade e especificidade da cepa tipada e dados para vigilância epidemiológica das infecções por *Cryptococcus gattii* e *C. neoformans*, além de avaliação ecológica das fontes da doença (FRASÉS *et al.*, 2009).

Através de grupo de trabalho (*Cryptococcal Working Group I*) vinculado à *International Society for Human and Animal Mycology* foram definidos sete *loci* para estudo global de genotipagem de cepas de *Cryptococcus* sp. pelo método *multi locus sequence typing* (MLST), capaz de distinguir cepas intimamente relacionadas, utilizando seis genes constitutivos (CAP59, GPD1, LAC1, PLB1, SO1, URA5) e um de região IGS1, com sequências e alelos disponibilizados em recente publicação (MEYER *et al.*, 2009).

2.1.2 Outras espécies de *Cryptococcus* spp.

Existem cerca de 39 espécies de *Cryptococcus* descritas que estão presentes na natureza. Contudo nenhuma espécie de *Cryptococcus* faz parte da microbiota humana e animal (MITCHELL; PERFECT, 1995; MORETTI *et al.*, 2008).

As espécies consideradas patogênicas são *C. neoformans* e *C. gattii*. Porém com o aumento de isolamentos e casos de infecção relatados, outras espécies como *C. laurentii*, *C. albidus*, *C. humicola* e *C. curvatus* podem ser considerados patógenos emergentes, principalmente em pacientes imunocomprometidos (MORETTI *et al.*, 2008).

Há relatos de casos de infecção por *C. laurentii* causando fungemia em recém-nascido prematuro (CHENG *et al.*, 2001), em pacientes com neoplasias, transplantados e em uso de terapias imunossupressoras (FURMAN-KUKLINSKA; NAUMNIK; MYSLIWIEC, 2009; JOHNSON; BRADLEY; KAUFFMAN, 1998; KRCMERY; KUNOVA; MARDIAK, 1997; KUNOVA; KRCMERY, 1999; SIMON *et al.*, 2005). Também foram descritos casos de infecções cutâneas (KAMALAM; YESUDIAN; THAMBIAH, 1977; VLCHKOVA-LASHKOSKA *et al.*, 2004), infecção pulmonar (LYNCH *et al.*, 1981), endoftalmite (CUSTIS; HALLER; JUAN, 1995), meningite (KORDOSSIS *et al.*, 1998) e pneumonia (SHANKAR *et al.*, 2006).

Bauters e colaboradores (2002) descreveram o isolamento repetido de *C. laurentii* na mucosa orofaríngea de paciente eritroleucêmico.

Há casos publicados de criptococcemia (KORDOSSIS *et al.*, 1998), pneumonia (BURNIK *et al.*, 2007; KRUMHOLZ, 1972) e meningite (CUNHA;

LUSINS, 1973) por *C. albidus*, além de relato de criptococose em receptor de transplante (RAMCHANDREN; GLADSTONE, 2004).

Cryptococcus curvatus foi descrito como agente de mieloradiculite (DROMER *et al.*, 1995) e *C. uninguttulatus* como causador de ventriculite (MCCURDY; MORROW, 2001).

2.2 Ecologia

A espécie *C. neoformans* apresenta distribuição cosmopolita e está associada a diversos habitats ecológicos, principalmente excretas de pombos, os quais são ricos em compostos nitrogenados que favorece a sobrevivência e multiplicação do fungo. Resiste bem à dessecação e sobrevive melhor protegido de altas temperaturas e sem exposição direta a luz solar (REOLON; PEREZ; MEZZARI, 2004). A umidade excessiva, entretanto, restringe sua multiplicação e aumenta a proliferação de bactérias que também acabam inibindo seu crescimento (PASSONI, 1994). O fungo não causa infecção em aves, uma vez que estas apresentam temperatura interna de 42 °C que pode inibir a multiplicação fúngica (SORRELL; ELLIS, 1997). Recente pesquisa realizada por Lugarini e colaboradores (2008a) em cloacas e inglúvios de aves demonstrou apenas colonização de excretas ressecadas. A presença do fungo em excretas de outras aves como canários, papagaios, periquitos, agapores e calopsitas também tem sido relatada (ABEGG *et al.*, 2006; FILIÚ *et al.*, 2002; PASSONI *et al.*, 1998; SORRELL; ELLIS, 1997).

Diversos trabalhos descrevem isolamento de *Cryptococcus* sp. em excretas de aves com frequência variando de 12,7% a 100%, provenientes de diferentes ambientes como igrejas, instituições de saúde, armazéns das docas do porto, edifícios comerciais, faculdades, praças, poleiros e grades de gaiolas e viveiros de aves nas cidades de Campo Grande-MS, Porto Alegre-RS, Pelotas-RS, Santa Cruz do Sul-RS, Goiânia-GO, Santos-SP e Rio de Janeiro-RJ (BARONI *et al.*, 2006; FARIA *et al.*, 2010; FILIÚ *et al.*, 2002; HORTA *et al.*, 2002; KOBAYASHI *et al.*, 2005; PASSONI *et al.*, 1998; REOLON; PEREZ; MEZZARI, 2004; SOARES *et al.*, 2005).

Outras fontes ambientais, seja sob forma de microfocos ou habitats naturais, têm sido descritas como madeira em decomposição, habitat de morcego, detritos

vegetais dentro de ocos de diversas árvores como *Syzyguim jambolanais* (LAZÉRA; WANKE; NISHIWAKA, 1993), *Cassia grandis*, *Senna multijuga*, *Ficus microcarpa* (LAZÉRA *et al.*, 1996), *Persia gratissima* (PASSONI *et al.*, 1998), *Senna siamea* (COSTA *et al.*, 2009), *Laurus* spp., *Pinus* spp. (ESCADÓN *et al.*, 2006) e em insetos (BARONI *et al.*, 2006).

A região urbana, muitas vezes está contaminada com excretas de aves, por causa da boa adaptação dos pombos aos centros urbanos e com isso ocorre o isolamento do fungo inclusive em poeira doméstica, o qual torna-se microfoco para infecções em humanos e animais (PASSONI *et al.*, 1998; SPRINGER; CHATUVERDI, 2010).

A literatura clássica documenta que *C. gattii* é prevalente em áreas tropicais e subtropicais (ELLIS; PFEIFFER, 1990; MITCHELL; PERFECT, 1995). No entanto, essa não é uma verdade absoluta principalmente porque esses relatos se restringiam a estas regiões. Recentes isolamentos em climas temperados, como o surto em Vancouver (KIDD *et al.*, 2004), têm mostrado outras áreas com a presença deste fungo e demonstra uma distribuição cosmopolita (KIDD *et al.*, 2007; SPRINGER; CHATUVERDI, 2010).

O primeiro isolamento ambiental de *C. gattii* foi de material associado às árvores de eucaliptos (*Eucalyptus camaldulensis*), sugerindo uma associação entre eucalipto e o fungo (ELLIS; PFEIFFER, 1990) e consequentemente a áreas rurais. Estes aspectos atualmente não são considerados na ecologia de *C. gattii*. Estudos realizados com mais de 54 espécies de árvores com a presença do fungo (SPRINGER; CHATUVERDI, 2010), evidenciam que provavelmente o material vegetal em decomposição seja o seu nicho ecológico primário (HAGEN; BOEKHOUT, 2010; LAZÉRA *et al.*, 1998) e não há relação entre esta espécie e uma árvore específica nem com decomposição de madeira. Contudo, outras fontes têm sido demonstradas como fezes de morcegos em sótão de casa antiga (LAZÉRA; WANKE; NISHIWAKA, 1993) e excretas de aves (ABEGG *et al.*, 2006).

Alguns trabalhos têm mostrado a presença de *C. gattii* em amostras fecais de aves (ABEGG *et al.*, 2006) ou compartilhando o mesmo biótopo (oco de árvore) com *C. neoformans* (COSTA *et al.*, 2009; LAZÉRA *et al.*, 2000). Estudo realizado por Bovers *et al.* (2006) demonstrou o isolamento de um espécime clínico híbrido BD (confirmado por AFLP), sugerindo a ocorrência natural do cruzamento entre *C. neoformans* (sorotipo D) e *C. gattii* (sorotipo B). Assim, muitas evidências sugerem

que *C. neoformans* e *C. gattii* possam ocupar o mesmo nicho ecológico relacionado à madeira e decomposição.

2.3 Epidemiologia da criptococose

A criptococose acomete mais indivíduos do sexo masculino, em torno de 78,0% (FERNANDES *et al.*, 2000; LEAL *et al.*, 2008) e principalmente adultos, todavia em áreas endêmicas como no Norte e Nordeste do Brasil, crianças também são vítimas da doença (CORRÊA *et al.*, 1999; DARZÉ *et al.*, 2000).

Cryptococcus neoformans e *C. gattii*, agentes da criptococose apresentam diferenças epidemiológicas que têm sido descritas em diferentes estudos.

Cryptococcus neoformans é a espécie mais frequentemente isolada independente de região geográfica e sítio de infecção (DROMER *et al.*, 2004; FAVALESSA *et al.*, 2009). Normalmente acomete indivíduos imunodeprimidos, principalmente com HIV, apresentando-se como agente oportunista. Outras condições predisponentes têm sido descritas incluindo tratamento com imunossupressores, transplantes de órgãos, desordens linfoproliferativas e neoplasias (MITCHELL; PERFECT, 1995; PERFECT; CASADEVALL, 2002).

Já está bem estabelecido na literatura que, com a epidemia da AIDS, houve um aumento nos casos de doenças fúngicas sistêmicas com comportamento oportunista principalmente histoplasmose e criptococose (MITCHELL; PERFECT, 1995; PRADO *et al.*, 2009). Com a introdução da terapia antiretroviral (TARV) e esquemas profiláticos com antifúngicos (principalmente fluconazol), verificou-se uma diminuição nos casos de criptococose em portadores do HIV em alguns países como Estados Unidos e França (BICANIC; HARRISON, 2004; DROMER *et al.*, 2004).

Dada à alta frequência com que é encontrada nesse grupo de pacientes, a criptococose representa uma das doenças definidoras de AIDS (BRASIL, 2005). Muitas vezes o paciente só toma ciência de que é portador do HIV após diagnóstico da doença fúngica (candidíase esofágica, histoplasmose e/ou criptococose). Em geral, a taxa de letalidade associada é bastante elevada variando de 33,0% a 62,5% em diferentes casuísticas (BICANIC *et al.*, 2006; DARZÉ *et al.*, 2000; LINDENBERG *et al.*, 2008; MICOL *et al.*, 2007; MOREIRA *et al.*, 2006).

Criptococose em pacientes HIV negativos também tem sido relatada. Entre estes, indivíduos que fazem uso de imunossupressores, como os receptores de transplante de órgãos, portadores de doenças auto-imunes e malignidades. Neste grupo de pacientes as taxas de letalidade variam de 24,2% a 42,0% (BADDLEY *et al.*, 2008; HUSAIN; WAGENER; SINGH, 2001; JONGWUTIWES; SUNGKANUPARPH; KIERTIBURANAKUL, 2008).

Nos indivíduos imunocompetentes, a doença é causada mais frequentemente por *C. gattii*, que é considerado um patógeno primário (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; MORGAN *et al.*, 2006).

Estudo regional de Lindenberg *et al.* (2008) mostrou perfil clínico-epidemiológico de 123 casos de criptococose em Mato Grosso do Sul demonstrando alta associação com HIV (84,5%) e importante ocorrência em pacientes imunocompetentes (10,6%), inclusive com alta letalidade (41,2%).

2.4 Patogênese e formas clínicas

A infecção em humanos ocorre pela inalação de propágulos infectantes, possivelmente leveduras acapsuladas dessecadas e/ou basidiósporos pequenos (menores do que 3 μ m) depositados nos alvéolos pulmonares (PERFECT; CASADEVALL, 2002; SORREL; ELLIS, 1997). Casos de inoculação direta (criptococose primária) são pouco frequentes (BIVANCO; MACHADO; MARTINS, 2006; MORETTI *et al.*, 2008; PAU *et al.*, 2010).

Os macrófagos alveolares iniciam a resposta celular por meio de uma reação inflamatória granulomatosa com liberação de citocinas. A resposta é mediada por linfócitos T *helper* (CD4) e T citotóxicos (CD8), células *natural killer* (NK), neutrófilos, eosinófilos e as citocinas (padrão de linfócito T *helper* tipo 1) Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF α), Interleucina 12 (IL-12), Interleucina 18 (IL-18) e Interferon gama (IFN- γ) (BICANIC; HARRISON, 2004; PERFECT; CASADEVALL, 2002).

A cápsula do fungo é um importante fator de virulência, pois inibe a fagocitose, impede ligação de imunoglobulina G (IgG), bloqueia fixação de C3 e da via clássica do complemento e suprime a proliferação das moléculas de adesão. A

parede celular e a produção de enzimas (urease, fosfolipases e proteases), além da termotolerância (crescimento a 37 °C) são consideradas fatores de virulência da levedura (MORETTI *et al.*, 2008; SÁNCHEZ; ESCANDÓN; CASTAÑEDA, 2008).

Outro importante mecanismo é a síntese de melanina por meio da enzima fenoloxidase utilizando compostos difenólicos. O fungo deposita a melanina e esta age com antioxidante protegendo-o das respostas oxidativas (radicais livres) do hospedeiro e pode funcionar como imunomodulador no pulmão (MITCHELL; PERFECT, 1995). A produção de manitol pela levedura também pode interferir na morte oxidativa realizada pelas células fagocíticas do hospedeiro e a produção de prostaglandinas pode modular a resposta imune (PERFECT; CASADEVALL, 2002).

A apresentação clínica depende do status imunológico do hospedeiro (SORRELL, 2001). A maioria dos pacientes HIV positivos desenvolve a forma disseminada da doença enquanto os HIV negativos a forma pulmonar (HOANG *et al.*, 2004), mas na prática, devido ao subdiagnóstico, cerca de 90,0% dos casos e os pacientes HIV negativos apresentam meningoencefalite no momento do diagnóstico.

A infecção pulmonar pode ser assintomática ou sintomática dependendo da resposta imune do hospedeiro, do tamanho do inóculo e virulência do microrganismo, e usualmente tem resolução espontânea. Algumas vezes, pode mimetizar a tuberculose, com lesões nodulares sem calcificação e eventual cavitação. Outras apresentações incluem massa localizada semelhante à neoplasia e algumas vezes manifesta-se como pneumonia que pode evoluir para insuficiência respiratória aguda. A forma pulmonar é a segunda mais frequente e acomete 35,7% dos pacientes HIV negativos (JONGWUTIWES; SUNGKANUPARPH; KIERTIBURANAKUL, 2008; MORETTI *et al.*, 2008). Na pneumopatia observa-se febre, tosse, emagrecimento, dor no peito e expectoração (MORETTI *et al.*, 2008).

A infecção pode se disseminar via hematogênica atingindo outros órgãos como olhos, ossos, pele, próstata, fígado, coração, adrenais, rins, linfonodos, articulações. O fungo apresenta tropismo pelo SNC e pode formar focos residuais que podem reativar após anos (MITCHELL; PERFECT, 1995; MORETTI *et al.*, 2008; PERFECT; CASADEVALL, 2002).

A criptococcemia geralmente acomete pacientes com infecção pelo HIV avançada ou uso de imunossupressores em grandes quantidades ou por tempo prolongado (PERFECT; CASADEVALL, 2002). A fungemia ocorre em 13,5% a

27,0% dos pacientes com criptococose oportunista (BADDLEY *et al.*, 2008; MOREIRA *et al.*, 2006).

É bem conhecido que a forma clínica mais comum da criptococose é a meningoencefalite, que varia de 73,0% (BADDLEY *et al.*, 2008) a 96,6% em portadores do HIV (JONGWUTIWES; SUNGKANUPARPH; KIERTIBURANAKUL, 2008).

Em torno de 9,0% a 12,3% de todas as meningites estudadas em hospital de referência de Fortaleza-CE e do Rio de Janeiro-RJ são causadas por *Cryptococcus* sp. (ESCOSTEGUY *et al.*, 2004; MENEZES *et al.*, 2002).

Na pesquisa realizada por Darzé e colaboradores (2000) no centro de referência de doenças infecciosas no Nordeste do Brasil foram diagnosticados 104 pacientes com meningoencefalite criptococócica no período de 25 anos de estudo. No entanto, na região Sudeste, a notificação pelo Centro de Vigilância Epidemiológica do estado do Rio de Janeiro, chegou a 696 casos de meningite criptococócica no período de 10 anos e juntamente com os dados do Sistema de Informações de Agravos de Notificação (SINAN) observaram-se AIDS em 426 destes casos (LEIMANN; KOIFMAN, 2008).

O paciente com meningoencefalite pode apresentar cefaléia, febre, letargia, perda de memória, mal estar, papiledema. Complicações podem ser comuns e incluem: aumento da pressão intracraniana, perda visual ou auditiva e menos frequente, a diminuição cognitiva e ataxia em função da hidrocefalia (BICANIC; HARRISON, 2004; MITCHELL; PERFECT, 1995; MORETTI *et al.*, 2008; PERFECT; CASADEVALL, 2002). Podem aparecer lesões focais cerebrais, simulando neoplasias. A formação de criptocomas em pacientes imunocompetentes pode estar associada com infecção por *C. gattii* (PERFECT; CASADEVALL, 2002).

De acordo com Oliveira e colaboradores (2006), 12,9% das complicações neurológicas em portadores do HIV são causados por neurocriptococose.

A criptococose ocular é rara e varia de paralisias oculares a envolvimento da retina. Em sua maioria decorre de manifestações da doença disseminada ou no SNC (MITCHELL; PERFECT, 1995; MORETTI *et al.*, 2008; PERFECT; CASADEVALL, 2002).

De acordo com alguns pesquisadores (CHANG *et al.*, 2008; MITCHELL; PERFECT, 1995; PERFECT; CASADEVALL, 2002) a próstata pode ser um

reservatório do fungo que pode contribuir para o aumento de casos de recidiva e ainda desenvolver prostatite criptocócica.

A infecção cutânea secundária pode funcionar como um marcador da disseminação da doença e apresentar manifestações na pele como papulas, púrpuras, vesículas, nódulos, tumores, abscessos, úlceras, granulomas superficiais ou placas infiltradas (BELLISIMO-RODRIGUES *et al.*, 2010; BIVANCO; MACHADO; MARTINS, 2006; MORETTI *et al.*, 2008; SEVERO; ZARDO; LONDERO, 2001).

2.5 Diagnóstico Clínico e Laboratorial

O diagnóstico clínico da criptococose depende da anamnese realizada pelos médicos e é importante também a experiência do clínico para detectar todos os sinais e sintomas e suspeitar da doença.

Os exames de imagem (radiografia, tomografia computadorizada e ressonância magnética) devem ser avaliados juntamente com outros achados laboratoriais e clínicos. Nos pacientes imunocompetentes predominam nódulos e massas pulmonares. Nos imunodeprimidos predominam infiltrados intersticiais e opacidade intersticial difusa. No SNC mostram lesões expansivas ou nódulos e podem revelar hidrocefalia (MORETTI *et al.*, 2008).

O diagnóstico laboratorial rápido da criptococose consiste em detectar a presença de antígenos capsulares polissacarídeos criptocócicos nas amostras clínicas por meio de métodos sorológicos que podem ser utilizados no início da infecção, quando os sintomas ainda são escassos ou inespecíficos. As principais metodologias são os testes de aglutinação em látex e os imunoenzimáticos (ELISA). Aglutinação em látex é um método rápido, simples e com exatidão que apresenta positividade do líquido cefaloespinal (LCE) e soro acima de 90,0% nos casos de meningoencefalite criptocócica (MORETTI *et al.*, 2008). O teste de ELISA apresenta sensibilidade maior e também pode ser utilizado para pesquisar anticorpos, entretanto a técnica é laboriosa. Ambas as metodologias servem para testes de triagem como no monitoramento da titulação de antígenos no paciente e apresentam concordância em torno de 90,0% nos resultados (FRANK *et al.*, 1993; MORETTI *et al.*, 2008; NEGRONI *et al.*, 1995). Para aumentar a sensibilidade e a

especificidade do teste, enzimas capazes de digerir anticorpos complexados, que poderiam mascarar a reação, são adicionadas (GAZZONI *et al.*, 2010; TEMTEST *et al.*, 1992). No entanto, resultado falso negativo pode ocorrer em alguns casos de infecção por *Cryptococcus* sp. com pouca cápsula ou acapsulados (GAZZONI *et al.*, 2010; MORETTI *et al.*, 2008). Na prática é usado apenas em amostras de LCE e soro (MICOL *et al.*, 2007; MORETTI *et al.*, 2008;).

Nos casos em fase avançada, com alta carga parasitária, o diagnóstico laboratorial da doença torna-se fácil devido a grande quantidade de estruturas fúngicas presentes no espécime clínico e pode ser realizado em praticamente todas as amostras biológicas como sangue, urina, secreções, biópsias, LCE, escarro, lavados, aspirados. As amostras biológicas com maior rendimento diagnóstico são o líquido cefaloespinhal, a urina e o sangue (PINTO JUNIOR *et al.*, 2006).

O diagnóstico laboratorial consiste em caracterização morfológica e bioquímica por testes fenotípicos padronizados (KONEMAN *et al.*, 2008; LARONE, 1995). O exame direto do LCE, principalmente com nigrosina apresenta sensibilidade que varia de 50,0% a 80,0% dependendo de infecção ou não pelo HIV. A cultura é considerada o método padrão ouro (PAPPALARDO; MELHEM, 2003) e apresenta positividade do LCE de 89,0% a 100,0% (MORETTI *et al.*, 2008).

Para o diagnóstico histológico é necessário o uso de colorações específicas para evidenciar a parede fúngica pelo método à prata (Grocott) e para demonstrar a cápsula pelo método da mucicarmina de Mayer (BICANIC; HARRISON, 2004).

2.5.1 Testes de suscetibilidade antifúngica

Com o aumento da incidência de infecções fúngicas graves e casos de falência terapêutica iniciou-se a preocupação em realizar testes laboratoriais com antifúngicos no intuito de determinar a suscetibilidade antimicrobiana, realizar controle terapêutico, pesquisar novos fármacos e suas combinações, além de prever o resultado clínico, como nos casos de resistência, antes da piora do paciente (REX *et al.*, 2001).

Alguns comitês foram criados como o *Clinical Laboratory Institute Standards* (CLSI), formalmente conhecido como *National Committee for Clinical Laboratory*

Standards (NCCLS), e o *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) com o intuito de desenvolver métodos de referências para avaliar a suscetibilidade antifúngica.

Em 1997 o NCCLS desenvolveu um método de diluição em caldo para leveduras publicado no documento M27-A, onde padronizou concentração do inóculo, meio de crescimento, temperatura e tempo de incubação e leitura (REX *et al.*, 2001). O princípio deste método se baseia em expor um inóculo definido do microrganismo a várias concentrações conhecidas do antifúngico em um meio que não interfira na atuação do mesmo com o objetivo de definir a menor concentração *in vitro* do antifúngico testado capaz de inibir o crescimento visível do microrganismo em questão (BIANCALANA, 2011). Este método se tornou referência e serviu de parâmetro para outras metodologias.

Outros métodos foram desenvolvidos: disco-difusão (discos impregnados com determinada concentração do antifúngico) e Etest® (tiras impregnadas com várias concentrações definidas). Além desses, existem kits comerciais que facilitam o trabalho e disponibilizam resultados mais rápidos, entretanto são poucos os estudos que comparam estes testes com o método de referência, sem contar que o custo destes kits é relativamente alto (REX *et al.*, 2001).

Pesquisadores têm comparado as diversas metodologias, utilizando vários meios de crescimento, alguns relatam boa concordância e outros obtiveram discrepâncias significativas, o que ressalta a importância de utilizar com cautela os resultados da metodologia empregada (COLOMBO *et al.*, 1995; ESPINEL-INGROFF *et al.*, 2005; LOZANO-CHIU *et al.*, 1998; RODRIGUEZ-TUDELA *et al.*, 2007; VANDENBOSSCHE *et al.*, 2002).

Na criptococose a realização dos testes de suscetibilidade antifúngica pode ser útil quando ocorre falência terapêutica, nos casos de recidiva e no desenvolvimento da criptococose com exposição anterior aos antifúngicos (MORETTI *et al.*, 2008; PERFECT *et al.*, 2010).

Apesar dos esforços, ainda não foi estabelecido um método padrão para *Cryptococcus neoformans*, uma vez que o método padronizado e consolidado do CLSI é direcionado para leveduras do gênero *Candida* e seus pontos de corte não devem ser extrapolados para o *C. neoformans* devido sua natureza fastidiosa (Dias *et al.*, 2006) e pouca correlação clínica.

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) é o ponto mais importante no teste de suscetibilidade antifúngica, pois determina visualmente a redução proeminente ou até mesmo a inibição do crescimento da levedura de acordo com o antifúngico utilizado (REX *et al.*, 2001) definindo assim um efeito inibitório mínimo, como os fungistáticos (interferem no crescimento ou replicação do fungo) ou causando a morte celular como os fungicidas (BENNETT, 2003).

Os pontos de corte (*breakpoints*) foram definidos para interpretar os resultados de CIM, baseando-se na farmacocinética do antifúngico e experiência clínica, entretanto a relevância continua incerta (CLSI, 2008).

2.6 Tratamento

A criptococose deve sempre ser tratada com antifúngicos nos pacientes sintomáticos, com cultura ou antígeno criptococócico positivo, doença disseminada e presença de imunossupressão.

A escolha do tratamento depende da imunidade do paciente, do sítio de infecção, da toxicidade do antifúngico e da doença de base do paciente (PERFECT *et al.*, 2010). De acordo com consenso de especialistas a terapia antifúngica pode ser dividida em três fases: indução, consolidação e manutenção (MORETTI *et al.*, 2008; PERFECT *et al.*, 2010).

O objetivo da fase de indução é reduzir drasticamente ou negativar a carga fúngica com período mínimo de duas semanas. Na fase de consolidação é necessário manter a negatificação fúngica e alcançar a normalização dos parâmetros clínicos e laboratoriais por pelo menos oito semanas. Já a fase de manutenção ou supressão (terapia profilática) depende do estado imunológico do paciente e compreende o período mínimo de um ano (MORETTI *et al.*, 2008).

Os antifúngicos utilizados atualmente no tratamento da criptococose são: anfotericina B (AMB) e suas formulações lipídicas, flucitosina (que não é comercializada no Brasil), fluconazol (FLC), itraconazol (ITC) e voriconazol (VRC).

A ação do antifúngico depende da concentração podendo agir como fungistático (inibindo o crescimento) ou fungicida (causando a morte da célula).

Anfotericina B, descoberta em 1956 por Gold e colaboradores, é produzida a partir do *Streptomyces nodosus* e faz parte do grupo de antibióticos macrolídeos poliênicos. Seu mecanismo de ação consiste em se ligar ao ergosterol, presente nas membranas dos fungos, e esta interação provoca a formação de poros e canais, aumentando a permeabilidade celular, interferindo nas funções de transporte, causando perturbações metabólicas e morte celular (BENNETT, 2003; RANG *et al.*, 2004; RICHARDSON; WARNOCK, 1993).

Como sua absorção gastrointestinal é insignificante, toda a administração deve ser intravenosa. Ele é complexado com desoxicolato de sódio, porém existem preparações lipídicas como a solução coloidal e o encapsulamento em lipossomas. Estas formulações lipídicas causam menos efeitos indesejáveis, entretanto o custo é consideravelmente mais alto, desta forma deve se avaliar o custo-benefício em cada caso específico (BENNETT, 2003; RANG *et al.*, 2004).

Anfotericina B encontra-se ligada às proteínas, apresenta extensa ligação aos tecidos e atravessa precariamente a barreira hematoencefálica, contudo a penetração pode aumentar quando as meninges estão inflamadas. Apresenta nefrotoxicidade dose dependente (BENNETT, 2003; RANG *et al.*, 2004).

Flucitosina é uma pirimidina fluorada, a qual nas células fúngicas é convertida no antimetabólito 5-fluorouracil, como este processo não ocorre nas células humanas, torna-a seletiva. O 5-fluorouracil é inicialmente metabolizado em ácido 5-fluorouridílico que pode ser incorporado ao RNA ou metabolizado no potente inibidor da timidilato sintetase e, portanto, da síntese de DNA. É administrado por infusão intravenosa e pode ser utilizado por via oral, distribui-se amplamente por todos os líquidos corporais, incluindo o LCE. Ocorre ligação mínima às proteínas plasmáticas e cerca de 80,0% são excretados de forma inalterados. Em virtude da excreção renal obrigatória é preciso reduzir a dose na presença de comprometimento da função renal. Quando administrada isoladamente, é comum o aparecimento de resistência ao fármaco durante o tratamento, de modo que a flucitosina é habitualmente combinada com anfotericina B (BENNETT, 2003; RANG *et al.*, 2004).

Os antifúngicos azólicos (triazólicos) constituem um grupo de agentes fungistáticos sintéticos que inibem a enzima 14- α -desmetilase do sistema do citocromo P450. Esta enzima converte lanosterol em ergosterol. Com a depleção do ergosterol da membrana ocorre interferência na ação das enzimas ligadas à

membrana, inibindo a replicação fúngica. Os triazólicos mais utilizados são fluconazol e itraconazol (BENNETT, 2003; CHEN e SORRELL, 2007; RANG *et al.*, 2004; RICHARDSON; WARNOCK, 1993).

Fluconazol apresenta boa biodisponibilidade oral, além de poder ser administrado por via endovenosa. Difunde-se rapidamente pelos tecidos atingindo concentrações elevadas inclusive no LCE e apenas 11,0% se encontra ligado às proteínas (CHEN; SORRELL, 2007; RICHARDSON; WARNOCK, 1993).

Itraconazol apresenta absorção variável pelo trato gastrointestinal, encontra-se (95,0%) ligado às proteínas, tem boa penetração nos tecidos, entretanto não penetra no LCE (CHEN; SORRELL, 2007; RANG *et al.*, 2004).

Com o aumento da resistência aos antifúngicos utilizados atualmente, principalmente frente às leveduras do gênero *Candida*, uma nova geração de azóis (2º geração) está sendo desenvolvida e entre eles, está o voriconazol que apresenta atividade de amplo espectro, ativo contra *Cryptococcus neoformans* e espécies de *Candida* resistentes ao fluconazol. Encontra-se disponível em formulações orais e intravenosas e apresenta boas concentrações no LCE (CHEN; SORRELL, 2007; RANG *et al.*, 2004).

Silva *et al.* (2010) observaram que o uso associado de anfotericina B com voriconazol diminuiu a colonização de órgãos-alvo e prolongou a sobrevivência de ratos imunodeficientes infectados por *Cryptococcus neoformans*.

De acordo com a Sociedade de Doenças Infecciosas da América (PERFECT *et al.*, 2010) a conduta nos casos de meningoencefalite criptocócica é definida em três grupos de riscos: os portadores de HIV, receptores de transplantes de órgãos e não portadores de HIV nem transplantados.

Nos casos de meningoencefalite, fungemia, doença disseminada e casos graves deve-se iniciar a fase de indução com anfotericina B desoxicolato (0,7-1,0 mg/kg/dia) associada a flucitosina (100 mg/kg/dia) por um período mínimo de duas semanas (para pacientes portadores do HIV), quatro semanas (para pacientes imunocompetentes) ou seis semanas (para pacientes com criptococomas). Seguido pela consolidação com fluconazol (400 mg/dia) por no mínimo oito semanas, podendo ser de seis a dezoito meses em casos de criptococomas. Como a flucitosina não é comercializada no Brasil, os profissionais da saúde a substituem por fluconazol (800 mg/dia) seguido pelo aumento da dose de fluconazol para 800

mg/dia na fase de consolidação ou pelo esquema alternativo de anfotericina B por seis a dez semanas.

Para os receptores de transplantes de órgãos deve ser utilizado a anfotericina B lipossomal (3,0-4,0 mg/kg/dia) no lugar da anfotericina B desoxicolato por causa do risco de nefrotoxicidade. Na fase de consolidação pode se utilizar até 800 mg/dia de fluconazol.

Nos casos de criptococose pulmonar deve ser utilizado fluconazol (400 mg/dia) em um período de seis a doze meses (MORETTI *et al.*, 2008; PERFECT *et al.*, 2010).

Com o aumento da incidência da doença, dos casos de recidiva e da persistência da carga fúngica, a comunidade científica teme pela emergência de cepas de *Cryptococcus* resistentes aos antifúngicos (Dias *et al.*, 2006).

Berg, Clancy e Nguyen (1998) encontraram dois pacientes HIV positivos que desenvolveram meningite criptococócica enquanto utilizavam a terapia profilática de fluconazol.

Brandt *et al.* (2001) observaram que 0,6% dos isolados apresentaram CIM ≥ 2 $\mu\text{g/mL}$ para a anfotericina B, 1,4% com CIM ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$ para o fluconazol e 8,6% com CIM ≥ 1 $\mu\text{g/mL}$ para o itraconazol, esses valores sugerem resistência *in vitro*.

No estudo realizado por Bicanic *et al.* (2006) dos pacientes HIV positivos que utilizaram apenas fluconazol na terapia inicial (fase de indução) e apresentaram meningite criptococócica recidiva, observou-se que 76,0% das culturas das infecções recidivas apresentaram redução da sensibilidade ao fluconazol.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Descrever a espécie, o tipo molecular e a suscetibilidade antifúngica de agentes de criptococose em casos diagnosticados em hospital universitário e investigar a presença destes agentes no domicílio dos mesmos.

3.2 Objetivos específicos

- Descrever as características epidemiológicas, clínicas e laboratoriais dos pacientes com criptococose atendidos em hospital terciário de Mato Grosso do Sul entre fevereiro de 2009 a julho de 2010.
- Investigar *Cryptococcus* spp. no ambiente domiciliar dos pacientes com criptococose.
- Conhecer o tipo molecular de *C. neoformans* e *C. gattii* de origem clínica e ambiental.
- Comparar os tipos moleculares de *Cryptococcus* sp. isolados de poeira doméstica e proveniente de amostras clínicas para verificar similaridade genética que possam fornecer subsídios à hipótese de risco de contaminação intradomiciliar pelo fungo.
- Avaliar o perfil de suscetibilidade antifúngica *in vitro* dos isolados de origem clínica.

4 MATERIAL E CASUÍSTICA

4.1 Tipo de estudo

Pesquisa de natureza descritiva quantitativa, observacional com estudo do tipo série de casos.

4.2 Casuística

No estudo foram incluídos todos os pacientes com diagnóstico laboratorial de criptococose.

4.2.1 Definição de caso

O diagnóstico laboratorial de criptococose foi definido pela cultura positiva para *C. neoformans* ou *C. gattii* independente do sítio de coleta da amostra clínica.

4.3 Período e local do estudo

O estudo foi realizado com pacientes atendidos de fevereiro de 2009 a julho de 2010 no Núcleo do Hospital Universitário “Maria Aparecida Pedrossian” da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (NHU-UFMS), Campo Grande-MS, inclusive no Hospital Dia Esterina Corsini, uma unidade especializada no atendimento a portadores de doenças infectoparasitárias, principalmente com AIDS.

O NHU-UFMS é um hospital geral de alta complexidade, credenciado pelo Sistema Único de Saúde, com 256 leitos que presta serviços ambulatoriais e hospitalares (BRASIL, 2010).

Campo Grande é a capital de Mato Grosso do Sul, localizado na região Centro-Oeste. A cidade está localizada na parte central do estado na latitude 20° 45' Sul e longitude 54° 62' Oeste, com altitude de 530 m. A temperatura média anual é de 24 °C (INMET, 2008). A população na cidade é de 787.204 habitantes (IBGE, 2010).

4.4 Caracterização epidemiológica e clínica

O levantamento de dados demográficos, epidemiológicos e clínicos foi realizado por meio de consulta aos prontuários médicos do hospital com preenchimento de um formulário específico (Apêndice A) e informações coletadas durante a visita ao paciente. As variáveis estudadas foram:

- Dados demográficos: sexo, idade, raça, naturalidade, procedência, profissão.
- Condições clínicas: sinais e sintomas apresentados no momento do diagnóstico, síndrome clínica, tempo do início das manifestações clínicas até o diagnóstico.
- Condições pré-disponentes à criptococose: uso de imunossupressores, contato com aves, trabalho em área rural.
- Doenças de base: presença de doença pulmonar, cardíaca, hepática, neoplasias, diabetes mellitus, imunodeficiência pelo HIV (inclusive tempo de diagnóstico do HIV).
- Coinfecções: diagnóstico de tuberculose, pneumocistose, candidíase oral, entre outras.
- Tratamento: se houve tratamento, antifúngicos utilizados e dosagem.
- Dados complementares: tipo de atendimento, evolução clínica, uso de terapia antirretroviral em portadores do HIV.
- Exames complementares: exames que possam demonstrar as condições clínicas do paciente, tais como os parâmetros liquóricos (proteínoorraquia, citologia global e diferencial). Nos pacientes HIV positivos foi investigado a contagem de CD4 e carga viral.

4.4.1 Conceitos e definições

As síndromes clínicas foram definidas como: meningoencefalite ao apresentar cultura de líquido cefaloespinal positiva, sinais meníngeos podendo ou não ter cultura positiva de sangue; fungemia ou criptococcemia quando somente a cultura de sangue foi positiva; disseminada ao apresentar o fungo em vários espécimes clínicos ou cultura de urina positiva; pneumopatia quando a presença fúngica era somente em espécimes respiratórios e criptococose cutânea primária quando o fungo foi isolado da biópsia de pele da lesão e a cultura de líquido cefaloespinal foi negativa (MOREIRA *et al.*, 2006).

4.5 Caracterização laboratorial

4.5.1 Coleta de amostras

As amostras clínicas foram coletadas por profissionais da saúde especialistas, a pedido médico para fins de diagnóstico e tratamento do paciente, e encaminhadas ao Laboratório de Micologia Médica da Seção de Análises Clínicas do NHU-UFMS.

As amostras ambientais intradomiciliares foram coletadas de acordo com o protocolo de coleta de amostras ambientais fornecido pela Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ (LAZÉRA *et al.*, 1996). A coleta foi realizada com espátulas previamente esterilizadas e as amostras acondicionadas em frascos estéreis previamente identificados. Em seguida os frascos foram encaminhados para o Laboratório de Microbiologia Clínica do Departamento de Farmácia e Bioquímica da UFMS.

4.5.2 Processamento das amostras

4.5.2.1 Amostras clínicas

Os espécimes clínicos foram inicialmente processados no Laboratório de Micologia Médica da Seção de Análises Clínicas do NHU-UFMS. Os exames realizados de rotina incluíram exame micológico direto com hidróxido de potássio a 20% e nigrosina. As amostras clínicas foram semeadas em agar Sabouraud Dextrose (ASD) [Oxoid, Inglaterra] e agar *Brain Heart Infusion* (BHI) [Oxoid, Inglaterra] e incubadas a 25 e 37 °C respectivamente.

4.5.2.2 Amostras ambientais

O material foi homogeneizado em gral com pistilo de porcelana previamente esterilizado. Cerca de 1,0 g do material homogeneizado foi suspenso em 50 mL de salina fisiológica 0,9% estéril contendo 0,4 g/L de cloranfenicol. Após agitação por 5 minutos e repouso por 30 minutos à temperatura ambiente, o sobrenadante foi aspirado e 0,1 mL foi semeado em cada uma das dez placas de agar níger que foram incubadas a 27 °C por uma semana e vistoriadas diariamente (LAZÉRA *et al.*, 1996). As colônias sugestivas (aspecto mucóide, coloração marrom) foram identificadas.

4.5.3 Identificação a nível de espécie

Para este fim foi utilizada metodologia convencional, incluindo caracterização morfológica e bioquímica (KONEMAN *et al.*, 2008; LARONE, 1995).

A identificação de *Cryptococcus* sp. foi feita pelo crescimento de colônias de coloração marrom no agar níger composto por semente de níger (*Guizotia*

abyssinica) e 0,2 g/L de cloranfenicol. Esse meio permitiu identificar a presença da enzima fenoloxidase que sintetiza melanina a partir de compostos fenólicos presentes na semente produzindo colônias marrons (Figura 1). Outras provas de identificação incluíram pesquisa de urease e teste do meio CGB. O crescimento no meio de CGB foi utilizado pra diferenciar as espécies de *Cryptococcus* sp. *Cryptococcus gattii* é resistente a L-cavanina e utiliza a glicina como fonte de carbono e nitrogênio provocando a alcalinização do meio mudando-o para a coloração azul cobalto, como pode ser visualizado na Figura 2 (KWON-CHUNG; POLACHEK; BENNETT, 1982).

Além das provas supracitadas foi realizada ainda a prova da assimilação de fontes de Carbono e Nitrogênio, também conhecido como auxanograma. O princípio da técnica baseia-se na capacidade da levedura assimilar diferentes carboidratos ou o nitrato de potássio como única fonte de carbono e nitrogênio, respectivamente. As leveduras foram suspensas em solução de salina 0,85% estéril e adicionadas em duas placas de Petri grandes e uma placa de Petri média. Na placa grande o meio Yeast Nitrogen Base (YNB) [Difco, EUA] foi acrescido e homogeneizado cuidadosamente com a suspensão anterior. Depois da solidificação do meio foram adicionadas pequenas alíquotas dos carboidratos dextrose (controle positivo), maltose, sacarose, lactose, galactose, melibiose, celubiose, inositol, xilose, rafinose, trealose, dulcitol.

Na placa média foi adicionado o meio N (Anexo A), isento de nitrogênio, e em seguida adicionadas uma pequena alíquota de peptona (controle positivo) e nitrato de potássio. As placas foram incubadas a 27 °C por 72h (LARONE, 1995).

4.5.4 Seleção das amostras

As cepas de origem clínica e ambiental foram mantidas em ASD a 25 °C e em microtubos de caldo BHI com glicerol a -20 °C. Antes da realização dos testes, as cepas foram cultivadas em ASD para assegurar viabilidade, pureza e otimização do crescimento.

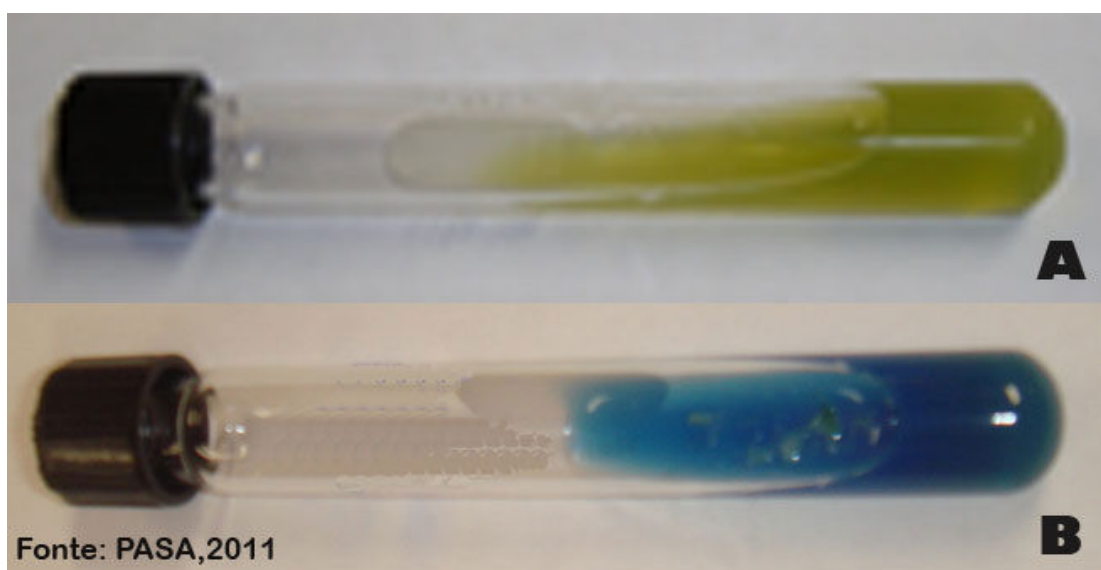
A tipagem molecular foi realizada em todas as amostras clínicas e ambientais identificadas como *C. neoformans* ou *C. gattii*. O teste de suscetibilidade antifúngica

foi realizado a partir do crescimento em cultura da primeira amostra clínica obtida de cada paciente.



Fonte: PASA,2011

Figura 1 – Aspecto mucóide e cor característica de *C. neoformans* e *C. gattii* em agar níger.



Fonte: PASA,2011

Figura 2 – Teste do meio CGB. A: resultado negativo (*C. neoformans*), B: resultado positivo (*C. gattii*).

4.5.5 Tipagem molecular

Na análise molecular foi utilizada metodologia baseada no protocolo de tipagem molecular do *Latin American Cryptococcal Network Project*.

4.5.5.1 Tipos moleculares de referência

As cepas padrões utilizadas para representar os tipos moleculares de *Cryptococcus* conhecidos foram fornecidas pelo Laboratório de Micologia Médica do Instituto de Pesquisa do Hospital Evandro Chagas da FIOCRUZ e incluem: *Cryptococcus neoformans* WM 148 (sorotipo A, VNI), WM 626 (sorotipo A, VNII), WM 628 (sorotipo AD, VNIII), WM 629 (sorotipo D, VNIV) e *Cryptococcus gattii* WM 179 (sorotipo B, VGI), WM 178 (sorotipo B, VGII), WM 175 (sorotipo B, VGIII), WM 779 (sorotipo C, VGIV) (TRILLES *et al.*, 2008).

4.5.5.2 Extração de DNA genômico

A extração de DNA genômico foi feita de acordo com Ferrer *et al.* (2001), esquematizado na Figura 3. A partir do crescimento em ASD a 25 °C por 72h uma alçada da colônia foi transferida para um tubo de microcentrifuga estéril e estocada a -20 °C por no mínimo 2h. Neste microtubo foi adicionado 500 µL de tampão de lise (Anexo A) e 5 µL de β-mercaptoetanol (Sigma, EUA) seguido de agitação vigorosa em vórtex. Posteriormente, a solução foi incubada a 65 °C sob agitação por 1h.

Após este período foi adicionado 500 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (v:v:v 25:24:1) [Sigma, EUA] e agitado em vórtex até a obtenção de suspensão homogênea e centrifugado a 16.110 xg por 20 minutos.

O sobrenadante (≈ 400 µL) foi removido e colocado em novo microtubo com igual volume de isopropanol (Synth, Brasil) com leve homogeneização. Na sequência, este microtubo foi acondicionado a -20 °C *overnight* para precipitação do

DNA. No dia seguinte, foi centrifugado a 4 °C a 15.000 xg por 15 minutos. Após descarte da fase líquida lavou-se o precipitado com 500 µL de etanol 70% (Fluka, EUA) e centrifugou a 10.000 xg por 5 minutos. Este processo foi repetido por 3 vezes. A fase líquida foi descartada e o tubo foi colocado em estufa a 50 °C até que o mesmo estivesse seco.

O precipitado contendo DNA da levedura foi então suspenso em 100 µL de água bi-distilada estéril, aquecida por 15 minutos no banho a 65 °C e em seguida acondicionada a -20 °C até a realização das outras reações.

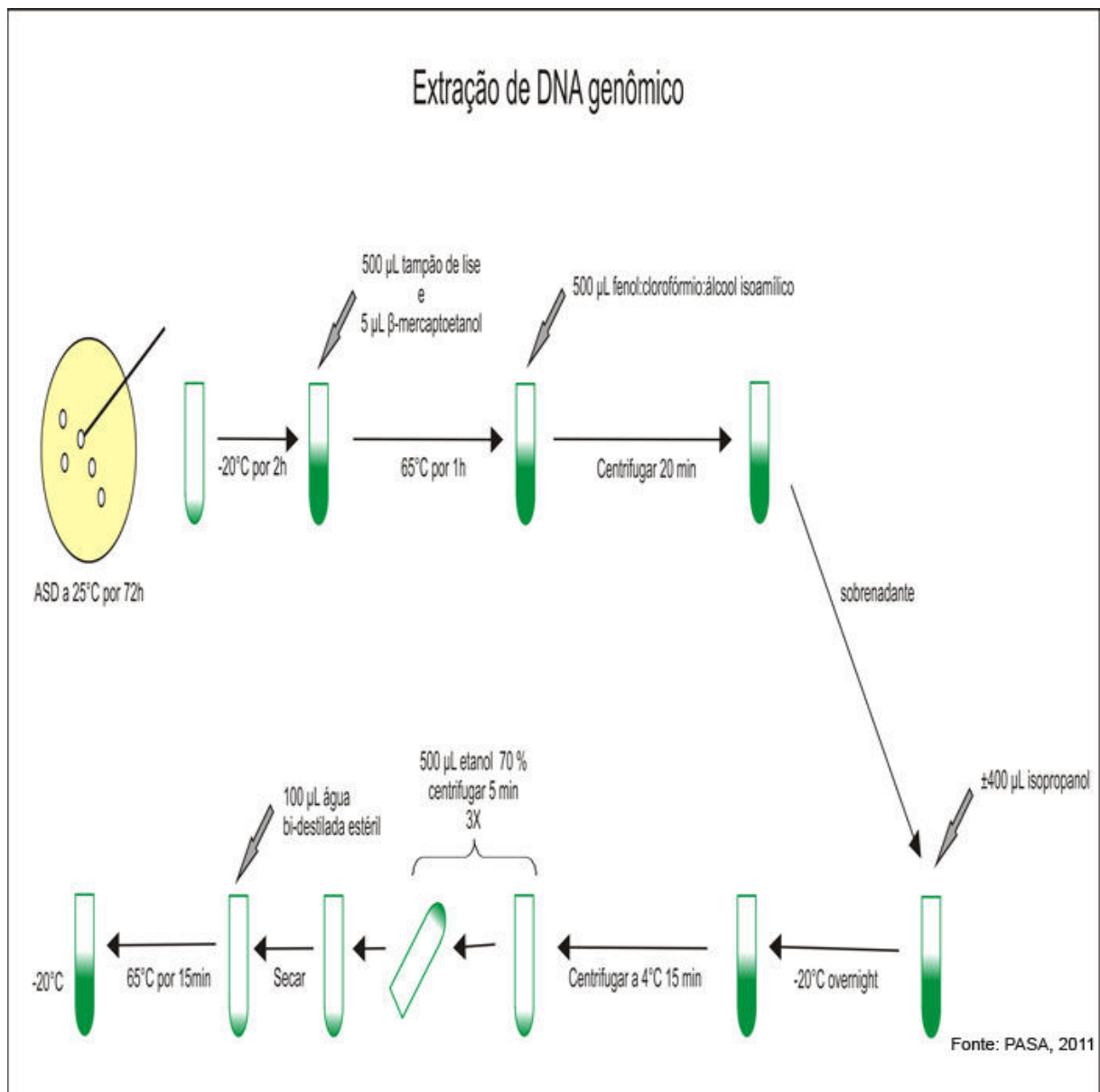


Figura 3 – Desenho esquemático da extração de DNA genômico de *Cryptococcus*.

4.5.5.3 RFLP (*restriction fragment length polymorphisms*)-URA5

A reação de RFLP do gene URA5 foi realizada conforme Meyer *et al.* (2003) com pequenas modificações¹. A Figura 4 ilustra todo o processo.

4.5.5.3.1 Reação de PCR (reação em cadeia da polimerase)

Para a realização da PCR foi preparado um mix contendo 1X tampão PCR, 1,5 mM cloreto de magnésio, 0,5 U Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen, EUA), 0,2 mM de cada dNTPs (Biotools, Espanha), 0,2 pmol de cada *primer* e água bi-distilada estéril suficiente para completar o volume de 24,5 µL. A essa mistura foi adicionado 0,5 µL de DNA total.

Os perfis de RFLP foram gerados utilizando os *primers*: URA5 (5' ATGTCCTCCCAAGCCCTCGACTCCG 3') e SJ01 (5' TTAAGACCTCTGAACACCGTACTC 3') [IDT, EUA].

A amplificação foi realizada no termociclador (XP Thermal Cycler, Bioer) por meio de um ciclo inicial de 2 minutos a 94 °C para desnaturação inicial, seguido por 35 ciclos de 45 segundos de desnaturação a 94 °C, 1 minuto de anelamento a 55,7 °C, 2 minutos de extensão a 72 °C e um ciclo de extensão final de 10 minutos a 72 °C. O produto da PCR permaneceu refrigerado a 4 °C até o uso.

4.5.5.3.2 Eletroforese da amplificação de DNA

O DNA foi separado por eletroforese em gel de agarose (Promega, EUA) a 1,4% com TBE 1X (Anexo A) para análise da amplificação do gene URA5.

O volume de 8 µL da reação de PCR foi aplicado no gel de agarose e a corrida foi realizada na fonte (300STD, GSR) a 100 volts por 40 minutos. Após a

¹ No presente estudo foi utilizado DNA total, pois um teste piloto foi realizado com DNA total e diluído na concentração de 30 ng/µL e observou-se que não houve diferença na amplificação das bandas.

corrida, o gel foi submerso em solução de brometo de etídio por 15 minutos e descorado em água destilada por 20 minutos.

A banda de DNA amplificado foi visualizada sob a luz ultravioleta pela presença da banda de ≈ 750 bp do gene *URA5* e foi fotografada por máquina digital.

4.5.5.3.3 Reação de RFLP

O produto da PCR (DNA amplificado) foi duplamente digerido pelas enzimas de restrição: *Sau96I* (5000 U/mL; Biolabs, EUA) e *HhaI* (20000 U/mL; Biolabs, EUA).

O master mix de 2,5 μ L contendo 1,5 μ L NeBH (tampão; acompanha a enzima), 0,15 μ L BSA (albumina; acompanha a enzima), 0,2 μ L *HhaI*, 0,35 μ L *Sau96I* e 0,3 μ L água estéril foi adicionado no microtubo da PCR que continha 17 μ L de reação. A incubação da reação foi feita no termociclador (Biocycler MJ96G) a 37 °C por 3h.

4.5.5.3.4 Eletroforese do RFLP

Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose (Promega, EUA) a 2,0% com TBE 1X (Anexo A) para análise dos perfis gerados pelo RFLP.

A corrida foi realizada na fonte (300STD, GSR) a 100 volts por 120 minutos e após o término, o gel foi submerso em solução de brometo de etídio por 15 minutos e descorado em água destilada por 20 minutos. Os fragmentos digeridos foram visualizados sob a luz ultravioleta e fotografados por máquina digital.

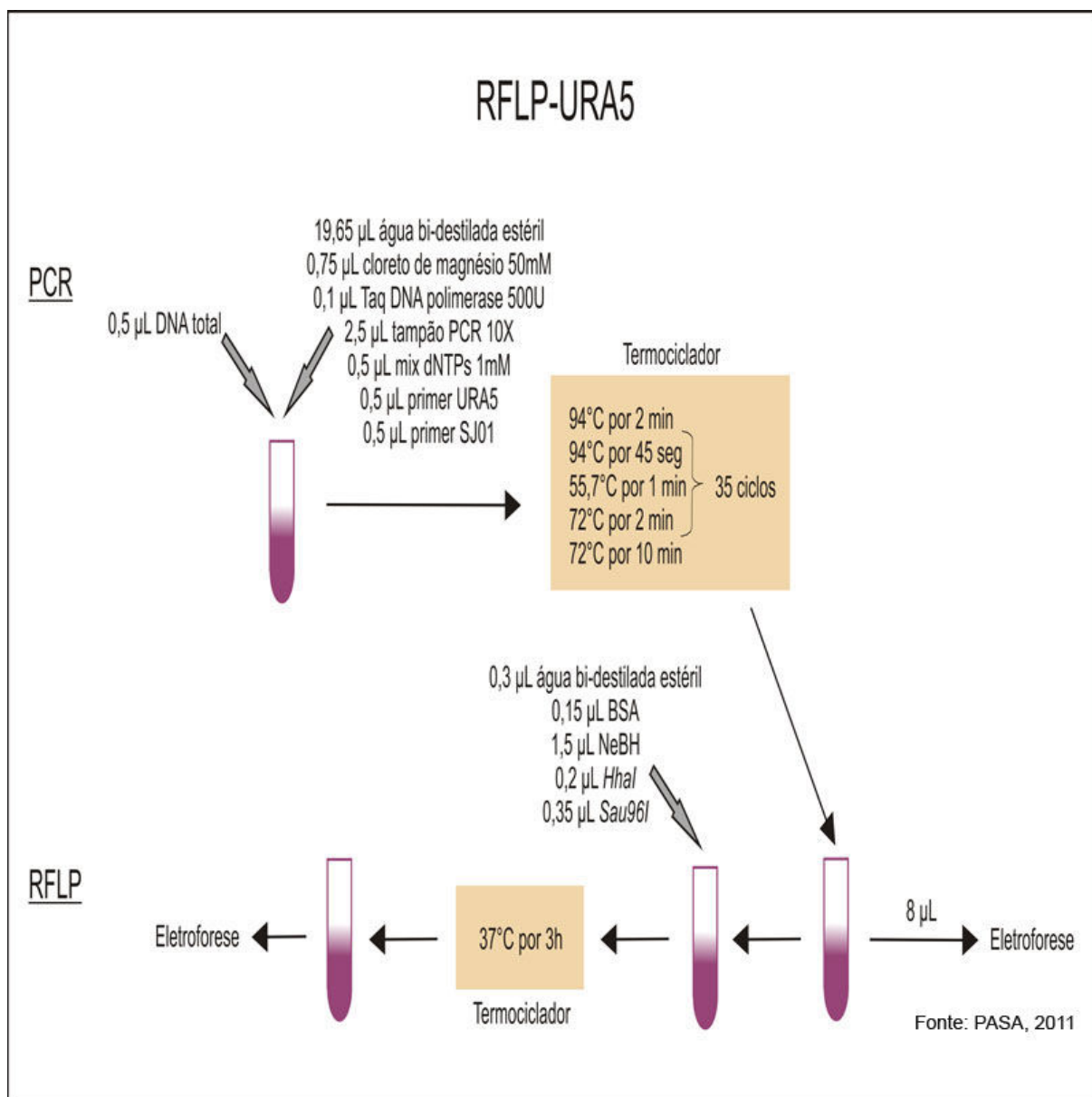


Figura 4 – Desenho esquemático da reação de RFLP (*restriction fragment length polymorphisms*)-URA5.

4.5.5.3.5 Análise dos perfis gerados pelo RFLP

As bandas de RFLP foram avaliadas visualmente pela comparação com as bandas das cepas padrão, Figura 5.

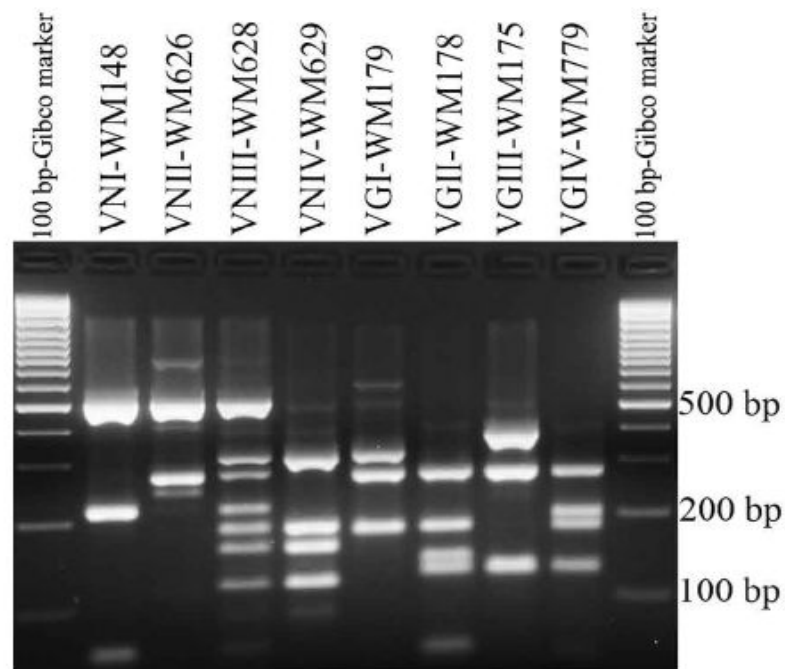


Figura 5 - Perfil Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) do gene URA5 duplamente digerido com *Sau96I* e *HhaI* das oito cepas padrão de *Cryptococcus* caracterizando os oito tipos moleculares conhecidos.

Fonte: TRILLES *et al.*, 2008

4.5.6 Determinação da suscetibilidade antifúngica

A técnica utilizada foi a microdiluição em caldo, recomendada pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* de acordo com o documento M27-A3 (CLSI, 2008).

4.5.6.1 Agentes antifúngicos

Para a realização do teste de suscetibilidade *in vitro* foram testados os seguintes antifúngicos: anfotericina B (AMB), fluconazol (FLC), itraconazol (ITC) adquiridos da Sigma Aldrich (EUA) e voriconazol (VRC) da Pfizer (EUA), doação do Dr. Eriques G. Silva da Universidade de São Paulo.

A solução estoque de cada antifúngico foi preparada por meio da fórmula:

$$\text{Volume (mL)} = \frac{\text{Peso (mg)} \times \text{Potência do antifúngico (}\mu\text{g/mg)}}{\text{Concentração (}\mu\text{g/mL)}}$$

Dimetilsulfóxido (DMSO) [Sigma, EUA] foi utilizado para preparar soluções estoque de anfotericina B, itraconazol e voriconazol com a concentração de 1600 µg/mL. O fluconazol foi dissolvido em água bi-destilada com concentração inicial de 5120 µg/mL. Estas soluções foram aliquoteadas em microtubos e estocadas a -20 °C até o uso (armazenadas por até 6 meses sem perda significativa de atividade).

Todo o processamento com anfotericina B foi protegido da luz com papel alumínio, tendo em vista a fotossensibilidade da mesma.

4.5.6.2 Preparação das microplacas com antifúngicos

Sucessivas diluições foram realizadas a partir da solução estoque de anfotericina B, itraconazol e voriconazol dissolvidos em dimetilsulfóxido. A solução estoque foi considerada o ponto de partida e identificada como nº 1. Nove tubos de ensaio previamente esterilizados e numerados foram utilizados para as diluições subsequentes. A Figura 6 ilustra um desenho esquemático de todo o processo de diluição realizada. Nos tubos nº 2, 5 e 8 foi acrescentado 0,5 mL de dimetilsulfóxido, nos tubos nº 3, 6 e 9 foi colocado 1,5 mL e nos tubos nº 4, 7 e 10 foi adicionado 3,5 mL de DMSO. A partir do tubo nº 1 foi transferido 0,5 mL da solução estoque nos tubos nº 2, 3 e 4. Após homogeneização em vórtex por 15 segundos transferiu-se 0,5 mL do tubo nº 4 para os tubos nº 5, 6 e 7. Do tubo nº 7 foi transferido 0,5 mL para os tubos nº 8, 9 e 10 a fim de se obter concentrações de 3,13 a 1600 µg/mL distribuídos nos 10 tubos. Em seguida transferiu-se 0,1 mL de cada tubo para outros novos 10 tubos de ensaio contendo 9,9 mL (diluição 1:100) do meio RPMI 1640 (com glutamina, sem bicarbonato e antibiótico, pH 7, MOPS 0,165 mM; Vitrocell, Brasil) atingindo a concentração de 0,03 a 16 µg/mL.

Para o fluconazol foram realizadas diluições com o meio RPMI 1640. A Figura 7 mostra o desenho esquemático destas diluições. Tubos de ensaio estéreis foram numerados de 1 a 10. Nos tubos de nº 1 e 4 acrescentou-se 3,0 mL do meio RPMI; no tubo nº 2 colocou-se 7,0 mL, nos tubos nº 3, 5, e 8 foi colocado 1,0 mL, nos tubos nº 6 e 9 foi colocado 1,5 mL e nos tubos nº 7 e 10 foi adicionado 3,5 mL do meio RPMI. A partir da solução estoque foi transferido 1,0 mL para os tubos nº 1 e 2. Após homogeneização em vórtex por 15 segundos transferiu-se 1,0 mL do tubo

nº 2 para os tubos nº 3 e 4. Do tubo nº 4 foi transferido 1,0 mL para o tubo nº 5 e 0,5 mL para os tubos nº 6 e 7. Do tubo nº 7 foi transferido 1,0 mL para o tubo nº 8 e 0,5 mL para os tubos nº 9 e 10 obtendo-se assim concentração de 2,5 a 1280 µg/mL, distribuídos nos 10 tubos. Na sequência transferiu-se 1,0 mL de cada tubo para outros novos 10 tubos de ensaio contendo 9,0 mL (diluição 1:10) do meio RPMI 1640 a fim de se obter concentração de 0,25 a 128 µg/mL.

As concentrações antifúngicas foram diluídas após a distribuição do inóculo na placa de modo que a concentração final dos antifúngicos no teste foi de 0,12 a 64 µg/mL para fluconazol e 0,015 a 8 µg/mL para os outros antifúngicos.

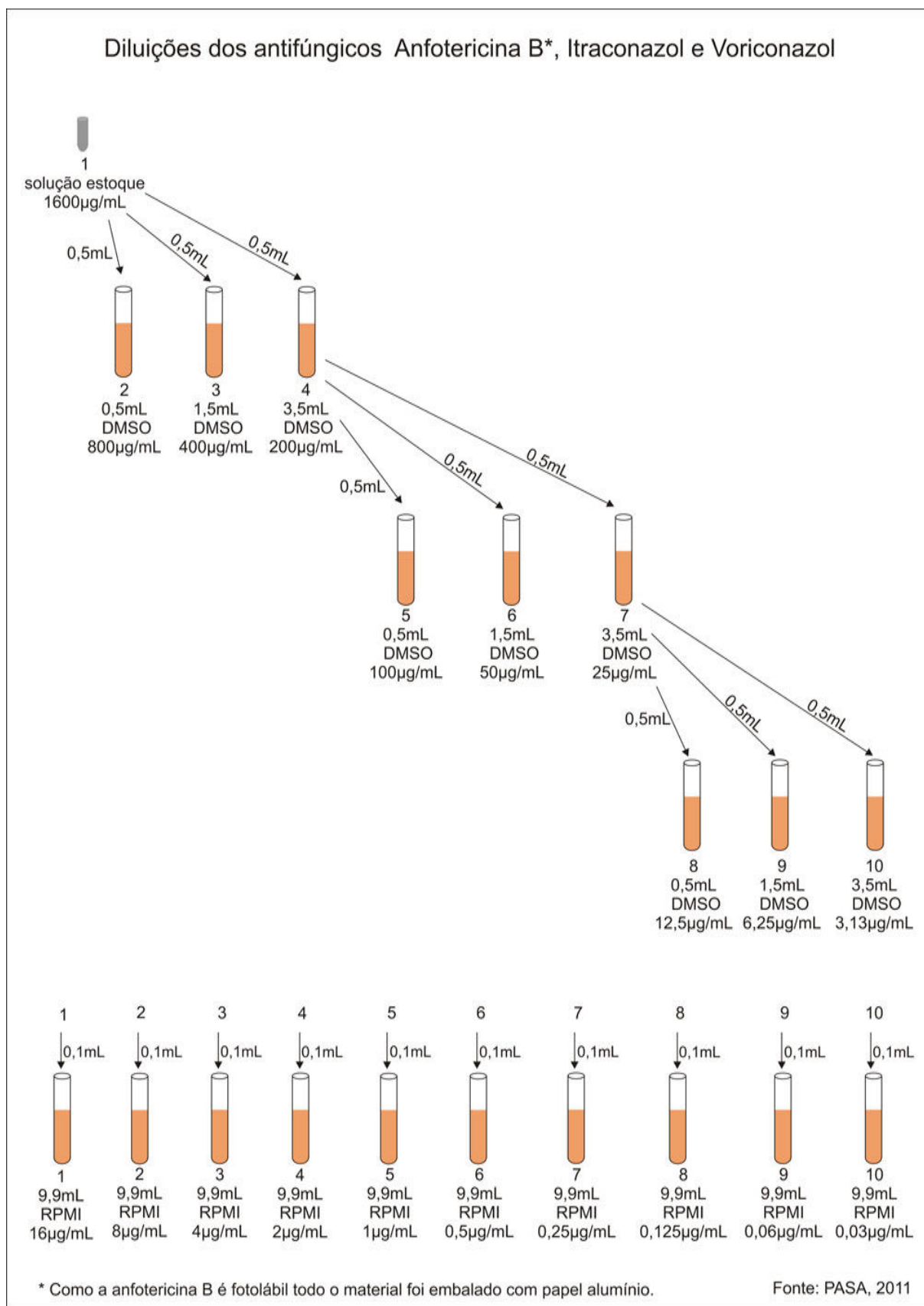


Figura 6 – Desenho esquemático das diluições para os antifúngicos anfotericina B, itraconazol e voriconazol.

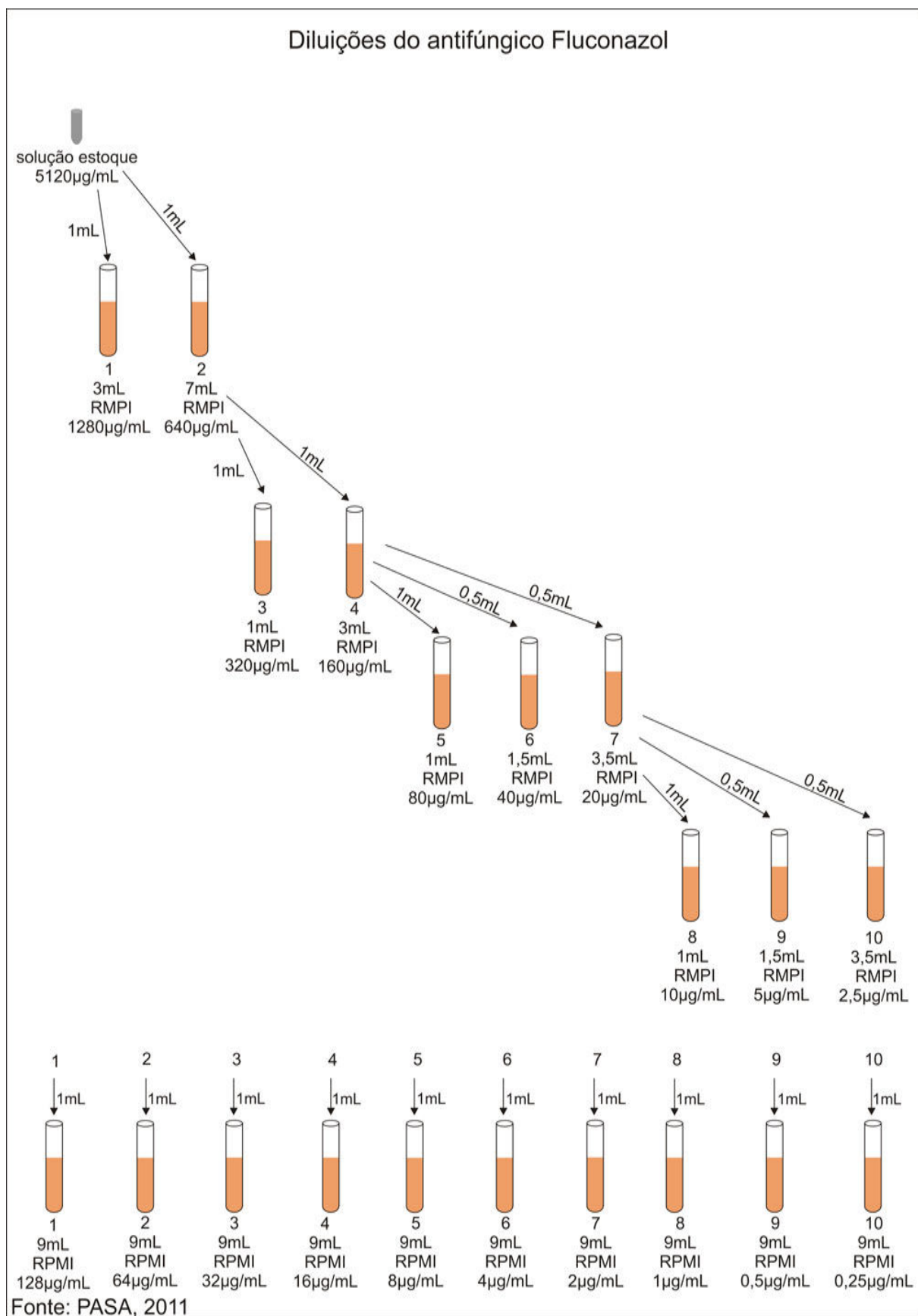


Figura 7 – Desenho esquemático das diluições do antifúngico fluconazol.

Os antifúngicos foram distribuídos (100 μ L em cada poço) com uma pipeta multicanal, em microplacas de 96 orifícios com fundo chato estéreis de acordo com o esquema da Figura 8, em que o tubo n° 1 foi distribuído na coluna n° 2, o tubo n° 2 na coluna n° 3 e assim por diante. Até este momento os orifícios 1 e 12 ficaram vazios.

As microplacas foram cobertas com parafilm® e mantidas a -20 °C até o uso.

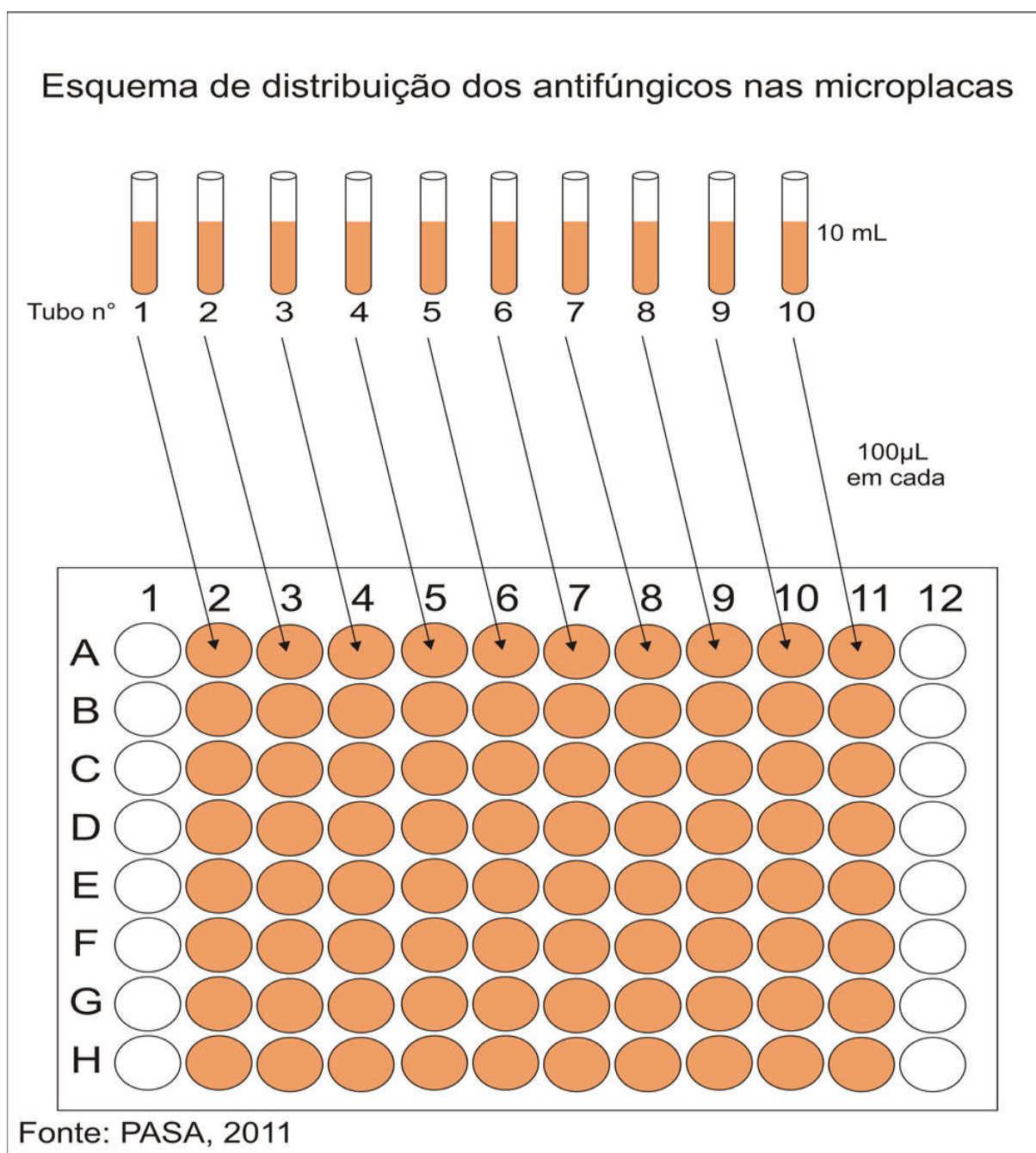


Figura 8 – Distribuição dos antifúngicos diluídos nas microplacas.

4.5.6.3 Preparação do inóculo e sua distribuição

A partir do crescimento da levedura em cultura no meio ASD a 35 °C por 48h, foi feita uma suspensão em 5 mL de NaCl 0,85% estéril e turbidez ajustada de acordo com a escala 0,5 de Mc Farland (Probac do Brasil, Brasil) que equivale a uma densidade celular variando de 1,0 a 10^5 ou 5,0 a 10^6 células/mL.

Alíquota de 100 µL da suspensão foi transferida para um tubo contendo 4,9 mL de meio RPMI 1640 (diluição 1:50) e após homogeneização em vortéx foi transferido 500 µL para um tubo contendo 9,5 mL de meio RPMI 1640 (diluição 1:20).

O inóculo diluído e homogeneizado foi distribuído (100 µL por poço) com uma pipeta multicanal nas fileiras horizontais das microplacas, exceto na coluna 1, conforme a Figura 9. Nesta fase a suspensão da microplaca foi novamente diluída (1:2).

Para assegurar a reprodutibilidade dos resultados obtidos, os testes foram realizados em duplicata. Por exemplo, linhas A e B correspondem a uma mesma cepa de *Cryptococcus* testada, bem como C e D e assim por diante. A coluna 1 funcionou como Controle de Esterilidade (CE) do teste, pois foi colocado somente 200 µL do meio RPMI 1640, sem a levedura. A coluna 12 funcionou como Controle de Crescimento (CC) em que foi distribuído 100 µL do meio RPMI e 100 µL do inóculo fúngico (Figura 9).

As microplacas foram incubadas a 35 °C por 48 a 72h.

4.5.6.4 Controle de qualidade

Como controle de qualidade dos testes realizados foram inclusas cepas de referência recomendadas pelo CLSI (CLSI, 2008): *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) e *Candida krusei* (ATCC 6258).

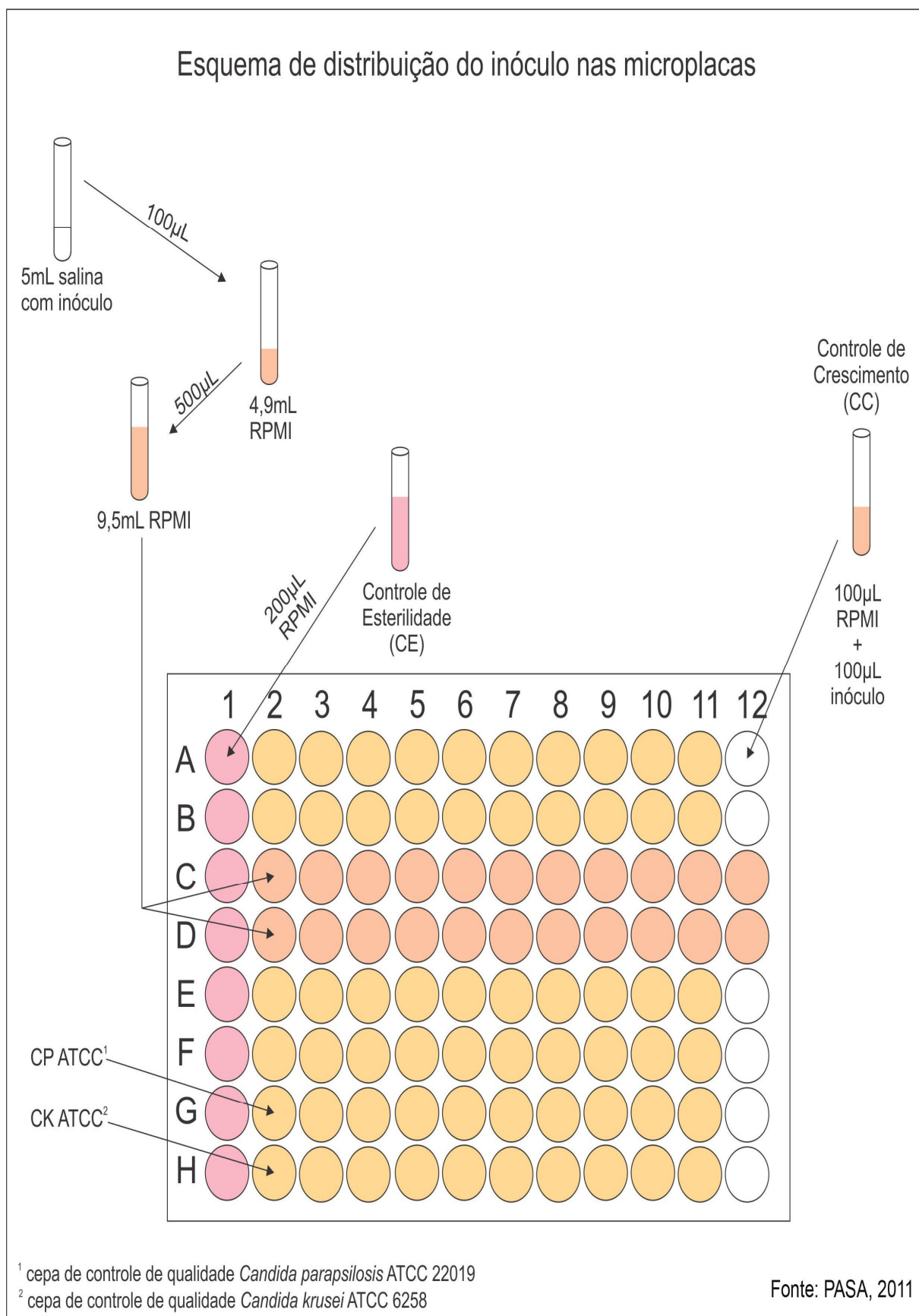


Figura 9 – Distribuição do inóculo diluído, do Controle de Esterilidade e de Crescimento na microplaca.

4.5.6.5 Leitura e interpretação da suscetibilidade antifúngica

A leitura da concentração inibitória mínima (CIM) foi feita após 48 a 72h de incubação conforme crescimento ótimo por comparação visual com o controle de crescimento (coluna 12) por meio da utilização de uma pontuação (*escore*). Assim, cada orifício com crescimento recebeu um valor numérico de acordo com a escala: 4= nenhuma redução do crescimento; 3= ligeira redução do crescimento; 2= redução proeminente do crescimento; 1= crescimento indefinido; 0= opticamente claro e límpido (CLSI, 2008).

A CIM para anfotericina B foi definida como a menor concentração do antifúngico capaz de inibir 100% (*escore* 0) do crescimento fúngico visível e a CIM dos outros antifúngicos definida como a menor concentração do antifúngico capaz de produzir inibição de 50% (*escore* 2) do crescimento visível da levedura.

Os pontos de corte (*breakpoints*) da CIM estabelecidos pelo CLSI (2008), para as cepas de referência são estão ilustrados na Tabela 1.

Tabela 1 - Variação das espécies de referência recomendada pelo CLSI (2008) segundo concentração inibitória mínima e espécie

Espécie	CIM (µg/mL) de:			
	Anfotericina B	Fluconazol	Itraconazol	Voriconazol
<i>Candida parapsilosis</i>	0,50-4,00	1,0 - 4,0	0,12-0,50	0,03-0,25
<i>Candida krusei</i>	1,0-4,0	16,0-128,0	0,5-1,0	0,12-1,0

Considerando que o documento M27-A3 (CLSI, 2008) não propôs valores limites de suscetibilidade para *Cryptococcus*, no presente estudo foram considerados resistentes as cepas que apresentaram CIM ≥ 64 µg/mL para fluconazol, CIM ≥ 1 µg/mL para itraconazol, CIM ≥ 1 µg/mL para voriconazol e CIM ≥ 2 µg/mL para anfotericina B conforme também sugerido por outros pesquisadores (NGYEN; YU, 1998; PEDROSO; FERREIRA; CANDIDO, 2006; SILVA *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2005).

4.6 Organização e análise dos dados

Os resultados laboratoriais foram tabulados juntamente com os respectivos dados clínicos e epidemiológicos no *software* Excell® 5.0 e posteriormente analisados no programa Epi-Info® 3.5.1 (CDC, 2008). A determinação da média geométrica das CIMs e sua comparação estatística entre as espécies foram feitas no programa BioEstat® 5.0 pelo teste de Mann-Whitney, considerou-se significância estatística para valores de $p \leq 0,05$. Os demais resultados foram apresentados na forma de estatística descritiva ou na forma de tabelas.

4.7 Considerações éticas

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul sob o registro nº 1383 de 2009 (Anexo B).

Todos os pacientes que concordaram em participar com o estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido – TCLE (Apêndice B) e responderam um formulário (Apêndice C).

5. RESULTADOS

No período de fevereiro de 2009 a julho de 2010 foram diagnosticados no NHU-UFMS 15 casos de criptococose. Em onze (73,3%) pacientes a doença foi causada por *Cryptococcus neoformans* e em quatro (26,7%) por *Cryptococcus gattii*. Dados demográficos destes pacientes estão descritos na Tabela 2.

A maioria dos pacientes com criptococose era do sexo masculino e 26,7% do feminino. A idade variou de 26 a 97 anos (mediana de 46 anos e média de $52,4 \pm 23,7$). A idade dos pacientes infectados por *C. neoformans* variou de 26 a 97 anos (mediana 36 anos) e por *C. gattii*, de 45 a 90 anos (mediana 73). Com relação à raça ou cor, 53,3% dos pacientes eram de cor branca e o restante (46,7%) era de cor parda ou amarela. Neste último grupo havia um (6,7%) indígena.

Tabela 2 – Características demográficas de 15 pacientes com criptococose segundo o agente etiológico, Campo Grande-MS, fevereiro de 2009 a julho de 2010

Características demográficas	Espécie				Total	
	C.neoformans (n=11)		C.gattii (n=4)			
	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%
Sexo						
Masculino	8	72,7	3	27,3	11	73,3
Feminino	3	75,0	1	25,0	4	26,7
Idade (anos)						
Mediana (variação)	36 (26-97)		73 (45-90)		-	-
21-40	6	100,0	-	-	6	40,0
≥ 41	5	55,6	4	44,4	9	60,0
Procedência						
Mato Grosso do Sul	10	71,4	4	28,6	14	93,3
Outros	1	100,0	-	-	1	6,7
Zona						
Urbana	9	75,0	3	25,0	12	80,0
Rural	2	66,7	1	33,3	3	20,0

Onze (73,3%) pacientes eram naturais do Mato Grosso do Sul, os outros eram de diferentes regiões do Brasil incluindo 6,7% de Minas Gerais, 6,7% de Pernambuco e 6,7% de São Paulo. Um (6,7%) paciente era procedente da Bolívia,

os demais (93,3%) eram do Mato Grosso do Sul. Oito (57,2%) residiam na cidade de Campo Grande e 42,8% no interior do estado: cidades de Inocência, Nioaque, Sidrolândia (n=2), Jardim e Nova Alvorada do Sul. Cerca de 80% viviam em área urbana.

Na Tabela 3 estão elencadas as profissões ou ocupações dos pacientes. Três (20,0%) eram domésticas, três (20%) aposentados, dois (13,3%) trabalhadores rurais, dois (13,3%) pedreiros, um (6,7%) técnico de contabilidade, um (6,7%) técnico de aparelho de som, um (6,7%) catador de lixo. De dois (13,3%) pacientes não foi possível obter este tipo de informação tendo em vista que um era indígena e foi a óbito antes do diagnóstico e o outro solicitou alta (mesmo sem condições) e voltou para sua cidade.

Tabela 3 – Pacientes com criptococose segundo profissão ou ocupação e o agente etiológico, Campo Grande-MS, fevereiro de 2009 a julho de 2010

Profissão/Ocupação	Espécie				Total	
	<i>C.neoformans</i> (n=11)		<i>C.gattii</i> (n=4)			
	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%
Doméstica	3	100,0	-	-	3	20,0
Aposentado	1	33,3	2	66,7	3	20,0
Trabalhador rural	2	100,0	-	-	2	13,3
Pedreiro	1	50,0	1	50,0	2	13,3
Técnico de contabilidade	1	100,0	-	-	1	6,7
Técnico de aparelho de som	1	100,0	-	-	1	6,7
Catador de lixo	1	100,0	-	-	1	6,7
Desconhecida	1	50,0	1	50,0	2	13,3

Possíveis condições de risco para os quatro casos de criptococose por *C. gattii* incluem: dois relatos de lesão cutânea provocada por inoculação traumática com madeira de lenha. O terceiro paciente residia em aldeia e o quarto relatou que realizou serviço em chácara e troca de telhado de um prédio muito antigo.

Nove (60,0%) pacientes com criptococose eram portadores do HIV e três (20,0%) soronegativos. No restante (20%) nenhum teste foi realizado. Em todos os pacientes HIV positivos o agente etiológico envolvido foi *C.neoformans*. Nos três pacientes HIV negativos o agente responsável foi *C. gattii*. Neste grupo de pacientes nenhum fator predisponente foi identificado.

Entre os HIV positivos (9) a idade variou de 26 a 49 anos (mediana 36 anos) e entre os HIV negativos (3) foi de 45 a 89 anos (mediana 57 anos). Nos pacientes em que não foi realizada sorologia para HIV, as idades variaram de 73 a 97 anos.

No que diz respeito, a síndrome clínica, meningoencefalite foi a mais encontrada (7; 46,7%) seguida da forma disseminada (4; 26,7%). Houve dois (13,3%) casos de lesão cutânea primária, um (6,7%) de criptococemia e um (6,7%) pulmonar (Tabela 4). Em um paciente HIV positivo com meningoencefalite e em dois (um HIV positivo) com a forma disseminada observou-se também fungemia.

Tabela 4 – Pacientes com criptococose segundo síndrome clínica e a infecção pelo HIV, Campo Grande-MS, fevereiro de 2009 a julho de 2010

Síndrome Clínica	Sorologia para HIV						Total	
	HIV positivo (n=9)		HIV negativo (n=3)		Sem informação (n=3)			
	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%
Meningoencefalite	6	66,7	1	33,3	-	-	7	46,7
Disseminada	3	75,0	-	-	1	25,0	4	26,7
Lesão cutânea primária	-	-	2	100,0	-	-	2	13,3
Criptococemia	-	-	-	-	1	100,0	1	6,7
Pulmonar	-	-	-	-	1	100,0	1	6,7

A forma pulmonar foi observada em paciente do sexo masculino, 97 anos, internado devido a uma fratura no fêmur e que apresentou quadro de pneumonia. Após diagnóstico laboratorial de *C. neoformans* e *Candida tropicalis* em amostra de secreção traqueal iniciou-se tratamento com fluconazol 200 mg/dia e o paciente foi a óbito no sexto dia. No caso de criptococemia, o paciente do sexo masculino de 73 anos, aposentado, chegou ao NHU-UFMS com infarto agudo do miocárdio e após uma semana de internação foi transferido para o CTI com quadro de sepse e apresentava dispnéia, emagrecimento, febre, hipóxia e eritema difuso. O paciente foi a óbito nas 24h subsequentes. A urocultura foi negativa e a hemocultura positiva para *C. neoformans*. Pesquisas sobre HIV não foram realizadas nestes casos.

A forma disseminada da criptococose causada por *C. gattii* ocorreu em uma paciente de 90 anos, indígena, chegou ao NHU-UFMS com quadro de pneumonia. A paciente apresentava dispnéia, taquicardia, tosse, hipertensão arterial, insuficiência cardíaca congestiva e diabetes. A paciente foi a óbito por choque séptico.

Cryptococcus gattii foi isolado de hemocultura e urocultura. Como o diagnóstico foi tardio, não houve tratamento antifúngico nem pesquisa sobre HIV.

O caso de meningoencefalite causado por *C. gattii* ocorreu em paciente do sexo masculino de 45 anos. Este trabalhava como pedreiro e nos últimos 6 meses realizou serviço em chácara no interior do estado e a troca do telhado de um quartel. O paciente foi encaminhado para NHU-UFMS apresentando cefaléia, febre, rigidez de nuca e vômitos. O exame micológico direto e a cultura do LCE foram positivos. No exame quimiocitológico do LCE observou-se leucocitose (predomínio de mononucleares) e hiperproteíno-rraquia. Sorologia para HIV foi negativa. Tratamento com anfotericina B (50 mg/dia) foi realizado por 13 dias. O paciente recebeu alta e continuou com acompanhamento ambulatorial no Hospital Dia.

Em um paciente do sexo masculino de 89 anos, a infecção cutânea primária foi adquirida por inoculação traumática ao carregar um pedaço de madeira encontrado em terreno baldio para realização de fogueira em sua residência e 15 dias depois, o paciente procurou o NHU-UFMS com a lesão de cerca de 8 cm ulcerada com bordos irregulares eritemato-violáceos, fundo com tecido de granulação e pequena quantidade de secreção amarelada em antebraço direito (Figura 10A). Biópsia da lesão foi encaminhada para cultura e exame histopatológico. Inicialmente foi instituído tratamento com antibióticos sulfametoxazol com trimetoprim, associado à cefalexina e ciprofloxacino. O resultado da cultura foi positivo para *C. gattii* e *Pseudomonas* sp. No retorno do paciente ao ambulatório 28 dias após a primeira consulta, observou-se melhora da infecção secundária bacteriana (Figura 10B). As sorologias para HIV, hepatite B e C foram negativas. O exame quimiocitológico do LCE apresentou-se dentro dos parâmetros normais e a cultura negativa. O tratamento antifúngico (itraconazol 400 mg/dia por 88 dias) foi iniciado após confirmação do crescimento de *C. gattii* em uma segunda biópsia. A Figura 11 mostra a resolução da lesão após 18 meses do diagnóstico.

O segundo caso de infecção cutânea primária ocorreu em paciente do sexo masculino de 57 anos, aposentado, que apresentava história de lesão no antebraço esquerdo por 30 dias. Relatou que fez uso de cefalexina, neomicina e bacitracina. A cultura da biópsia da lesão foi positiva para *C. gattii*. A cultura do LCE foi negativa e o exame quimiocitológico normal. Sorologia para HIV foi negativa. A lesão após 24 dias de tratamento antifúngico com fluconazol 300 mg/dia está demonstrada na Figura 12. O tempo de tratamento foi de 150 dias.



Figura 10 -Criptococose cutânea primária em antebraço direito. A: anterior ao tratamento com antibiótico e primeira coleta de biópsia com resultado positivo para *C. gattii*, B: após o tratamento com antibiótico e segunda coleta de biópsia positiva para *C. gattii*.

Fonte: Foto cedida pela Dra. Nayara C. Wiziack e Dr. Günter Hans Filho



Fonte: PASA, 2011



Fonte: PASA, 2011

Figura 11 – Resolução da criptococose cutânea primária em antebraço direito após dezoito meses da infecção.



Fonte: PASA, 2011

Figura 12 – Lesão cutânea primária após 24 dias do início do tratamento antifúngico.

As manifestações clínicas mais comuns foram: febre, emagrecimento e cefaléia (Tabela 5). Também foram relatadas: alteração visual, diarreia, dor abdominal, hiporexia, fotofobia, rigidez de nuca, hipoxia, hidrocefalia, perturbação mental, hipertensão intracraniana e convulsão em frequências menores.

O tempo do início das manifestações clínicas até o diagnóstico laboratorial variou de 1 a 65 dias (mediana 21). Em sete pacientes foi superior a 30 dias.

Como pode ser observado na Tabela 5, do total de 15 pacientes, oito (66,7%) apresentaram doenças de base, principalmente doença pulmonar (26,7%). Coinfecção com candidíase oral ocorreu em três (20,0%) pacientes, pneumocistose em dois (13,3%) e tuberculose em dois (13,3%).

Tabela 5 – Características clínicas de pacientes com criptococose, Campo Grande-MS, fevereiro de 2009 a julho de 2010

Características Clínicas	Total	
	Nº.	%
Sinais e sintomas		
Emagrecimento	8	53,3
Febre	8	53,3
Cefaléia	8	53,3
Vômito	7	46,7
Lesões cutâneas	7	46,7
Náusea	6	40,0
Tosse	6	40,0
Dispnéia	5	33,3
Doença de base		
Pulmonar	4	26,7
Cardíaca	2	13,3
Hepática	2	13,3
Diabetes	2	13,3
Coinfecção		
Candidíase oral	3	20,0
Tuberculose	2	13,3
Pneumocistose	2	13,3

Dos 15 pacientes com criptococose, dois foram atendidos no ambulatório de dermatologia e treze (86,7%) foram internados: na enfermaria de Doenças Infecciosas e Parasitárias (DIP) n=7, no Centro de Terapia Intensiva (CTI) n=4, na Clínica Médica n= 1 e na Unidade Coronariana n=1 do NHU-UFMS, Tabela 6. O período de internação variou de 4 a 58 dias (mediana de 23 dias).

No que diz respeito ao tratamento, treze (86,7%) pacientes com diagnóstico de criptococose foram tratados com antifúngicos padronizados na instituição. Onze (84,6%) com fluconazol (200 a 900 mg/dia), dez (76,9%) com anfotericina B (20 a 50 mg/dia) e um (7,7%) com itraconazol (400 mg/dia) como pode ser observado na Tabela 6. Os pacientes com criptococose por *C. neoformans* foram tratados com anfotericina B associada a fluconazol. Dois (13,3%) pacientes não receberam tratamento devido ao diagnóstico tardio (após o óbito).

O uso somente do fluconazol foi feito para uma infecção pulmonar por *C. neoformans* e para uma infecção cutânea por *C. gattii*. A anfotericina B sozinha foi utilizada no caso de meningoencefalite por *C. gattii*. Não foram computados nestes dados, tratamentos efetuados após a alta hospitalar.

A letalidade geral encontrada foi de 46,7% (Tabela 6). Destes, 85,7% o agente responsável pela infecção foi *C. neoformans*.

Tabela 6 – Pacientes com criptococose segundo tipo de atendimento, tratamento e evolução, Campo Grande-MS, fevereiro de 2009 a julho de 2010

Variáveis	Total	
	Nº.	%
Tipo de atendimento		
Ambulatorial	2	13,3
Hospitalar	13	86,7
Tratamento		
Sim	13	86,7
Não	2	13,3
Antifúngico (n=13)		
Anfotericina B	1	7,7
Fluconazol	2	15,4
Itraconazol	1	7,7
Anfotericina+Fluconazol	9	69,2
Evolução		
Alta	8	53,3
Óbito	7	46,7

Os dados da Tabela 7 mostram que entre os pacientes que evoluíram para o óbito 57,1% eram HIV positivos. Entre os HIV negativos não houve nenhum óbito.

Todos os pacientes não tratados foram a óbito. Quatro (44,5%) dos nove pacientes HIV positivos evoluíram para o óbito.

Tabela 7 – Pacientes com criptococose segundo tratamento, evolução e infecção pelo HIV, Campo Grande-MS, fevereiro de 2009 a julho de 2010

Variáveis	Sorologia para HIV					
	HIV positivo (n=9)		HIV negativo (n=3)		Sem informação (n=3)	
	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%
Tratamento						
Sim	9	69,2	3	23,1	1	7,7
Não	-	-	-	-	2	100,0
Evolução						
Alta	5	62,5	3	37,5	-	-
Óbito	4	57,1	-	-	3	42,9

Entre os pacientes HIV positivos, quatro (44,5%) descobriram que eram portadores do HIV na época do diagnóstico da criptococose. Três (33,3%) dos nove pacientes soropositivos faziam uso de terapia antirretroviral. A contagem de células CD4 e carga viral foi realizada em seis (66,7%) pacientes HIV positivos e todos apresentaram valores menores que 100 células/ μ L (Tabela 8). A quantidade de células CD4 variou de 2 a 68 células/ μ L (mediana 40 células/ μ L). A carga viral variou de 21.740 a 274.142 cópias/mL com mediana de 68.470 cópias/mL.

Tabela 8 – Pacientes HIV positivos com criptococose segundo tempo de diagnóstico do HIV, uso de terapia antirretroviral e contagem de células CD4, Campo Grande-MS, fevereiro de 2009 a julho de 2010 (n=9)

Características	Nº	%
Tempo de diagnóstico do HIV		
Descoberto na época do diagnóstico da criptococose	4	44,5
Menos de 1 ano	2	22,2
Mais de 8 anos	3	33,3
Terapia antirretroviral		
Sim	3	33,3
Não	6	66,7
Contagem CD4 (células/ μ L)		
< 100	6	66,7
$\geq$ 100	-	-

A punção liquórica foi realizada em dez (66,7%) pacientes. A citologia global liquórica variou de 1 a 245 leucócitos/ μ L. Em cinco (50,0%) pacientes esta citologia foi superior a 5 leucócitos/ μ L. Em quatro (80,0%) houve predominância de células mononucleares. A proteinorraquia do líquido cefaloespinhal variou de 29,9 a 299,0 mg/dL. Em cinco casos a dosagem de proteína foi superior a 50 mg/dL, como demonstrado na Tabela 9.

Em sete pacientes HIV positivos foi realizada a punção liquórica e em quatro destes a citologia global foi menor que 5 leucócitos/ μ L. Nos pacientes soronegativos a punção liquórica foi realizada em três, dos quais dois apresentaram hiper celularidade (10 a 245 leucócitos/ μ L).

Tabela 9 – Exame quimiocitológico de líquido cefaloespinhal de 10 pacientes com criptococose, Campo Grande-MS, fevereiro de 2009 a julho de 2010

Exame Quimiocitológico do LCE	Total	
	Nº.	%
Citologia global (n=10)		
≤ 5 (leucócitos/ μ L)	5	50,0
> 5 (leucócitos/ μ L)	5	50,0
Citologia diferencial, (n=5)		
Polimorfonuclares	1	20,0
Linfócitos	4	80,0
Proteinorraquia (n=10)		
≤ 50 mg/dL	5	50,0
> 50 mg/dL	5	50,0

Cryptococcus sp. foi isolado de 34 amostras clínicas proveniente de 15 pacientes. A média de isolamento por paciente foi 2,26 espécimes clínicos. Destaca-se um caso de infecção disseminada com nove amostras positivas obtidas de cinco sítios diferentes.

Os espécimes clínicos com cultura positiva para *Cryptococcus* sp. foram: líquido cefaloespinhal, urina, sangue, biópsia de pele, secreção traqueal e secreção orofaríngea.

As amostras clínicas com maior positividade na cultura foram líquido cefaloespinhal (8/9; 88,9%), sangue (4/5; 80,0%) e urina (4/6; 66,7%). O exame micológico direto foi realizado em amostras clínicas provenientes de doze (80%)

pacientes, sendo que oito (66,7%) apresentaram resultados positivos. Seis (75,0%) pacientes tiveram amostras de líquido cefaloespinal positivo para este exame.

Entre os 15 casos de criptococose diagnosticados no período, somente de seis (40%) pacientes foi realizada coleta de amostras no ambiente domiciliar. Os domicílios restantes não puderam ser visitados devido a problemas operacionais, dos quais pode se destacar a localização da residência fora dos limites da cidade de Campo Grande (Tabela 10).

Tabela 10 – Domicílios dos pacientes em que não houve coleta ambiental segundo o motivo, Campo Grande-MS, fevereiro de 2009 a julho de 2010 (n=9)

Motivo	Nº.	%
Recusou coleta em domicílio	1	11,1
Mudança de residência após internação	1	11,1
Localização fora de Campo Grande	6	66,7
Paciente foi a óbito e não foi possível contato com familiares	1	11,1

Vinte e duas amostras ambientais foram coletadas de seis domicílios de pacientes com diagnóstico de criptococose. O número de coletas variou de 2 a 6 amostras ($3,67 \pm 1,63$ por domicílio), dependendo das condições de moradia (Figura 13) e condições favoráveis (presença de aves, madeira em decomposição, oco de árvores).

As residências visitadas foram de dois pacientes com a forma disseminada da doença, dois com meningoencefalite e os dois casos de lesão cutânea.



Fonte: PASA, 2011



Fonte: PASA, 2011

Figura 13 – Domicílio de um paciente com criptococose cutânea exemplificando algumas condições de moradia observadas durante a pesquisa.

Dez *Cryptococcus* spp. foram isolados de cinco dos seis domicílios visitados. A Tabela 11 mostra a distribuição das espécies de *Cryptococcus* de acordo com o sítio de isolamento. As espécies isoladas foram: um *C. neoformans*, quatro *C. laurentii*, dois *C. terreus*, dois *C. albidus* e um *C. uniguttulatus*.

Tabela 11 – Amostras ambientais coletadas em seis domicílios segundo sítio de isolamento, positividade e espécies de *Cryptococcus* isoladas, Campo Grande-MS, fevereiro de 2009 a julho de 2010

Sítio de Isolamento	Amostras Ambientais					
	Coletadas (n=22)		Positivas (n=7)		Espécies isoladas (n=10)	
	Nº	%	Nº	%	Nome	Nº
Poeira intradomiciliar	5	22,7	1	20,0	<i>C.neoformans</i>	1
Solo/poeira peridomiciliar	5	22,7	2	40,0	<i>C.laurentii</i>	2
					<i>C.albidus</i>	1
Excretas de aves	5	22,7	2	40,0	<i>C.albidus</i>	1
					<i>C.terreus</i>	1
Madeira para lenha	4	18,2	1	25,0	<i>C.laurentii</i>	1
					<i>C.terreus</i>	1
					<i>C.uninguttulatus</i>	1
Detritos vegetais em oco de árvore	3	13,7	1	33,3	<i>C.laurentii</i>	1

Nas cinco amostras de poeira intradomiciliar pesquisadas foi encontrada uma amostra positiva para *C. neoformans* que foi coletada da poeira no forro (sótão) sobre o quarto da paciente. O forro da casa era de madeira e o domicílio de alvenaria como demonstrado na Figura 14.



Figura 14 – Domicílio do paciente com criptococose disseminada onde foi isolado *C. neoformans* na poeira intradomiciliar localizada no sótão.

A tipagem molecular foi realizada nas 34 cepas de *Cryptococcus* isoladas de amostras clínicas. Dois tipos moleculares foram identificados pelo RFLP-URA5: VNI correspondente a *C. neoformans* e VGII correspondente a *C. gattii*.

A Figura 15 ilustra o perfil da amplificação do gene URA5 (≈ 750 bp) pela técnica de PCR de 30 cepas de *Cryptococcus* e nas Figuras 16 e 17 observa-se os tipos moleculares determinados pela técnica RFLP-URA5 das cepas estudadas.

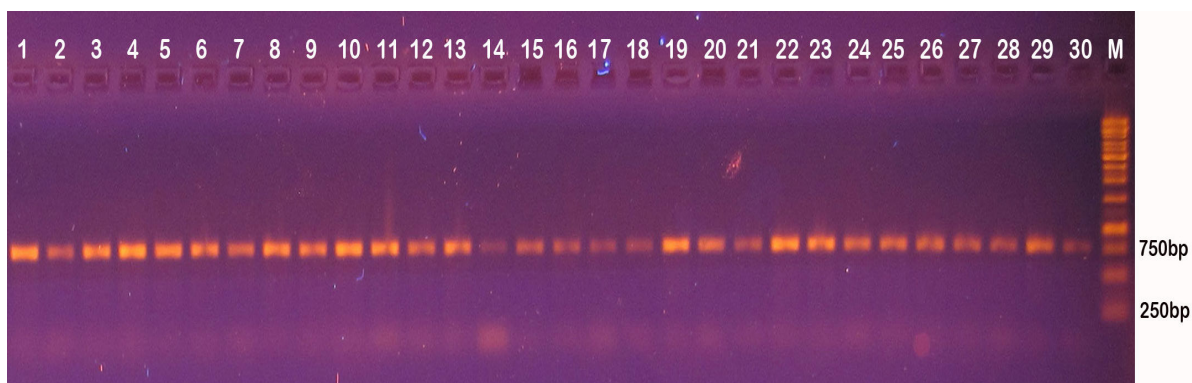


Figura 15 - Perfil da amplificação do gene URA5 (≈ 750 bp) pela técnica de PCR de *Cryptococcus* isolados de amostras clínicas. M: marcador de peso molecular de 1kb. 1-30: *Cryptococcus neoformans* ou *C. gattii*.

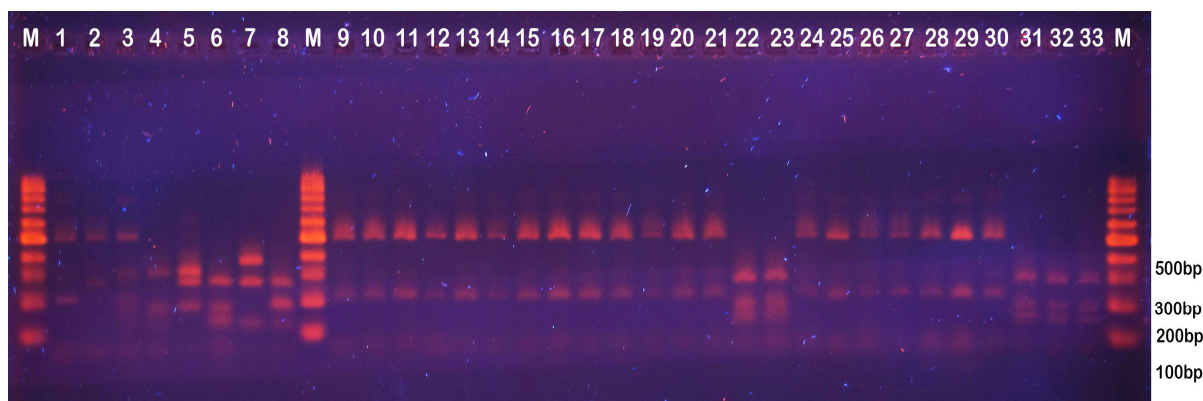


Figura 16 – Perfil *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) do gene URA5 duplamente digerido com *Sau96I* e *HhaI* de *Cryptococcus* isolados de amostras clínicas nº 1 a 25. M: marcador de peso molecular de 100bp. 1: padrão molecular VNI-WM148; 2: padrão molecular VNII-WM626; 3: padrão molecular VNIII-WM628; 4: padrão molecular VNIV-WM629; 5: padrão molecular VGI-WM179; 6: padrão molecular VGII-WM178; 7: padrão molecular VGIII-WM175; 8: VGIV-WM779; 9-21: cepas de origem clínica nº 1 a 13 com tipo molecular VNI; 22-23: cepas de origem clínica nº 14 a 15 com tipo molecular VGII; 24-30: cepas de origem clínica nº 16 a 22 com tipo molecular VNI; 31-33: cepas de origem clínica nº 23 a 25 com tipo molecular VGII.

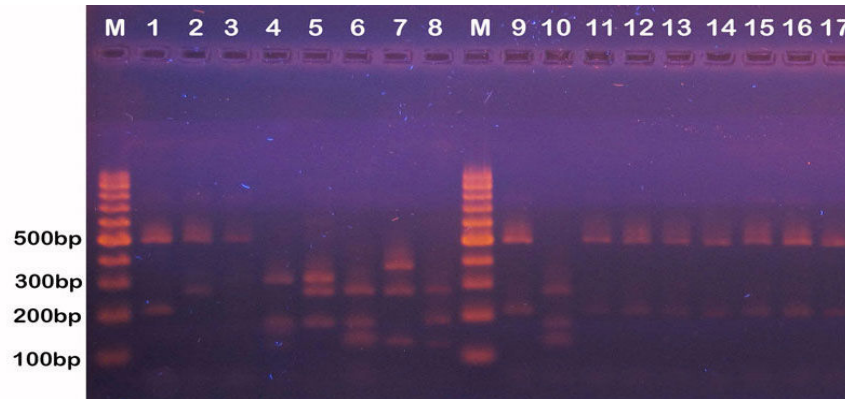


Figura 17 – Perfil *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) do gene URA5 duplamente digerido com *Sau96I* e *HhaI* de *Cryptococcus* isolados de espécimes clínicos nº 26 a 34. M: marcador de peso molecular de 100bp. 1: padrão molecular VNI-WM148; 2: padrão molecular VNII-WM626; 3: padrão molecular VNIII-WM628; 4: padrão molecular VNIV-WM629; 5: padrão molecular VGI-WM179; 6: padrão molecular VGII-WM178; 7: padrão molecular VGIII-WM175; 8: VGIV-WM779; 9: cepa de origem clínica nº 26 com tipo molecular VNI; 10: cepa de origem clínica nº 27 com tipo molecular VGII; 11-17: cepas de origem clínica nº 28 a 34 com tipo molecular VNI.

A Figura 18 ilustra que de *C. neoformans* 187UR-09 isolada de urocultura de paciente HIV positivo com criptococose disseminada apresenta o mesmo tipo molecular VNI de *C. neoformans* A17 isolada da poeira domiciliar do mesmo paciente.

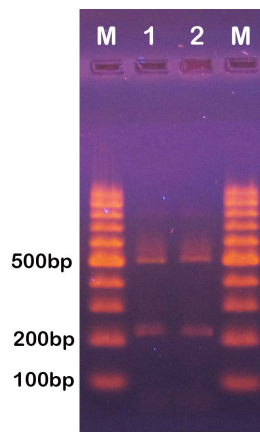


Figura 18 – Perfil *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) do gene URA5 duplamente digerido com *Sau96I* e *HhaI* de *Cryptococcus neoformans* isolado da amostra clínica 187 UR-09 e ambiental A17 de paciente com criptococose disseminada. M: marcador de peso molecular de 100bp; 1: cepa de origem clínica (VNI); 2: cepa de origem ambiental (VNI) isolada no domicílio do paciente.

Na Tabela 12, são mostrados os valores da concentração inibitória mínima (CIM), a variação e a média geométrica da CIM para os quatro antifúngicos estudados frente às espécies de *Cryptococcus* isoladas de amostras clínicas. A comparação entre as espécies em relação a cada antifúngico foi realizada por meio do teste de Mann-Whitney e os valores do p foram: AMB = 0,433; FLC = 0,004; ITC = 0,036, VRC = 0,050. As cepas de *C. neoformans* apresentaram CIMs mais sensíveis que *C. gattii* para os antifúngicos fluconazol, itraconazol e voriconazol ($p \leq 0,05$). Para a anfotericina B não foi estatisticamente significativa.

Tabela 12 – Variação e média geométrica da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de quatro agentes antifúngicos segundo as espécies de *Cryptococcus* isoladas de amostras clínicas, Campo Grande-MS, fevereiro de 2009 a julho de 2010

Espécie (n)	Parâmetro CIM	CIM (µg/mL) de:			
		Anfotericina B	Fluconazol	Itraconazol	Voriconazol
<i>C. gattii</i> (4)	Variação	0,50-1,00	4,00	0,12-0,50	0,03-0,06
	Média geométrica	0,59	4,0	0,21	0,05
<i>C. neoformans</i> (11)	Variação	0,25-1,00	0,50-2,00	0,06-0,12	0,015-0,06
	Média geométrica	0,47	1,29	0,09	0,03
Total (15)	Variação	0,25-1,00	0,50-4,00	0,06-0,50	0,015-0,06
	Média geométrica	0,50	1,74	0,11	0,03

6. DISCUSSÃO

A criptococose vem assumindo papel relevante na atualidade por ser uma das infecções mais comuns em pacientes com AIDS (DARZÉ *et al.*, 2000; ESCOSTEGUY *et al.*, 2004; FERNANDES *et al.*, 2000; PRADO *et al.*, 2009; RIBEIRO *et al.*, 2009).

As duas espécies responsáveis pela doença apresentam diferenças ecoepidemiológicas e terapêuticas. *Cryptococcus neoformans* é cosmopolita, geralmente acomete pacientes imunodeprimidos. É normalmente isolado de várias fontes ambientais, principalmente excretas de aves (ABEGG *et al.*, 2006; FILIÚ *et al.*, 2002; KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; SORRELL; ELLIS, 1997).

Cryptococcus gattii também é cosmopolita, geralmente acomete pacientes imunocompetentes e está associado a material vegetal em decomposição (HAGEN; BOEKHOUT, 2010; KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; LAZÉRA *et al.*, 1998). É considerado patógeno primário e tende a ser mais virulento, de tratamento difícil e prolongado (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; MORGAN *et al.*, 2006; SPEED; DUNT, 1995).

Estudo realizado na Europa por Viviani *et al.* (2006) demonstrou que a maioria dos casos de criptococose descritos no continente europeu teve como agente etiológico *C. neoformans*. O mesmo foi observado na África do Sul e no Canadá (HOANG *et al.*, 2004; MORGAN *et al.*, 2006).

De forma semelhante, pesquisa realizada por Meyer *et al.* (2003) com dados de países da América Latina descreve *C. neoformans* como o agente mais prevalente.

No Brasil, *C. neoformans* também é a espécie mais encontrada (FAVALESSA *et al.*, 2009; FERNANDES *et al.*, 2000; LEAL *et al.*, 2008; LINDENBERG *et al.*, 2008; MOREIRA *et al.*, 2006). Na região Norte e Nordeste, porém, a frequência de criptococose por *C. gattii* é maior do que em outras regiões do país (CORRÊA *et al.*, 1999; DARZÉ *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2008).

Corroborando com esta idéia, pesquisa de Nishikawa *et al.* (2003) demonstrou predomínio de *C. neoformans*, sorotipo A, nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste e de *C. gattii*, sorotipo B, no Norte e Nordeste brasileiro.

Leal *et al.* (2008) descreveram o perfil epidemiológico dos pacientes com meningite criptocócica no Rio Grande do Sul e 95,4% dos pacientes foram infectados por *C. neoformans* e 4,6% por *C. gattii*.

Dados da região Centro-Oeste sobre criptococose ainda são escassos. O estudo realizado por Fernandes *et al.* (2000) identificou os agentes de meningoencefalite criptocócica dos pacientes com AIDS atendidos em hospital de Goiânia e encontrou 94,0% *C. neoformans* e 6,0% *C. gattii*. Posteriormente Souza *et al.* (2010) demonstraram em amostras clínicas e ambientais coletadas na mesma cidade 95,2% de *C. neoformans* e 4,8% *C. gattii*.

Recente estudo realizado no vizinho estado do Mato Grosso conduzido por Favalessa *et al.* (2009) também citou *C. neoformans* como principal agente de criptococose naquela região.

O único estudo realizado no Mato Grosso do Sul (LINDENBERG *et al.*, 2008) que descreveu as características clínicas e epidemiológicas de 123 casos de criptococose de pacientes atendidos em hospital universitário mostrou que *C. neoformans* foi responsável por 89,6% das ocorrências. Nessa casuística a frequência de isolamento de *C. gattii* foi superior a relatada em Goiás (FERNANDES *et al.*, 2000; SOUZA *et al.*, 2010).

Apesar da pequena amostragem, os resultados obtidos na presente investigação mostram um aparente aumento no número de casos associados a *C. gattii* (26,7%), comparado aos resultados de Lindenberg *et al.* (2008) em estudo anterior no mesmo hospital. Estes dados também são superiores ao observado na região Sul e Sudeste onde foi descrito 4,6% a 11,0% de *C. gattii* (CALVO *et al.*, 2001; LEAL *et al.*, 2008; MOREIRA *et al.*, 2006).

Na presente casuística, a maioria dos pacientes com criptococose era do sexo masculino, dado este similar a de outros autores (FERNANDES *et al.*, 2000; HOANG *et al.*, 2004; LEAL *et al.*, 2008; LEIMMAN; KOIFMAN, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2006; PASQUALOTTO *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2008; VIVIANI *et al.*, 2006).

Como pode ser observado na Tabela 2, todos os pacientes com criptococose eram adultos e a maioria tinha idade acima de 41 anos. Esses dados diferem do observado nas regiões Norte e Nordeste do Brasil onde a incidência da criptococose é mais elevada em crianças e adultos jovens (CORRÊA *et al.*, 1999; DARZÉ *et al.*, 2000). Esses resultados corroboram com a idéia de que há diferenças ecoepidemiológicas dependendo da região estudada (FAVALESSA *et al.*, 2009;

FERNANDES *et al.*, 2000; LEAL *et al.*, 2008; LINDENBERG *et al.*, 2008; MOREIRA *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Cryptococcus neoformans causou criptococose, em sua maioria, em pacientes com idade entre 21 a 40 anos semelhante ao observado por Moreira *et al.* (2006) e que também coincide com a faixa etária de maior incidência de HIV no Brasil (BRASIL, 2009).

No que diz respeito à raça ou cor dos pacientes estudados, o número de casos de criptococose em pacientes de cor branca foi menor do que descrito por outros pesquisadores (BADDLEY *et al.*, 2008; FIGUEIRA-COELHO; MARTINS; MACHADO, 2010; LEAL *et al.*, 2008; PASQUALOTTO *et al.*, 2004). Sobre este aspecto faz-se importante lembrar que a raça ou cor é uma característica demográfica muito subjetiva, pois cabe ao examinador defini-la e, como na pesquisa foram utilizados dados secundários, torna-se uma variável não controlada.

Em relação à procedência dos pacientes, os resultados encontrados foram semelhantes à pesquisa anterior realizada por Lindenberg *et al.* (2008) no mesmo hospital, onde 97,6% dos pacientes eram procedentes do estado de Mato Grosso do Sul e destes 71,5% eram naturais da própria região.

Similar a outros estudos (FERNANDES *et al.*, 2000; LEIMMAN; KOIFMAN, 2008), a maioria dos pacientes residia na área urbana. Este fato reforça a idéia de que o fungo está bem adaptado às cidades. Embora não se tenha parâmetros para afirmar, acredita-se que o grande número de pombos presentes em residências, praças públicas e até em unidades hospitalares na cidade de Campo Grande pode ser uma condição favorável a essa adaptação.

Quanto aos dados de profissão e ocupação dos pacientes com criptococose (Tabela 3), não foi encontrado parâmetro na literatura que pudesse ser comparado, até porque a criptococose não é considerada uma doença ocupacional como a esporotricose que costuma ser mais prevalente entre pessoas que trabalham com a terra (KONEMAN *et al.*, 2008).

Na tentativa de verificar alguma condição que pudesse ter favorecido a infecção pelo *Cryptococcus* sp., algumas variáveis foram investigadas: contato com aves, uso de drogas imunossupressoras e trabalho em área rural. Embora não se tenha parâmetro para comprovar esta relação, algumas condições de risco relatadas pelos pacientes foram consideradas possíveis fontes de infecção: traumatismo com

madeira, residência em aldeia, trabalho em área rural e madeira do telhado em decomposição por ocasião de troca de telhas.

A criptococose é a segunda infecção fúngica mais comum em portadores do HIV após a candidíase (WANKE; LAZÉRA; NUCCI, 2000).

Estudo realizado por Viviani *et al.* (2006) na Europa mostrou que 77,0% dos casos de criptococose eram em pacientes HIV positivos. Jongwutiwes, Sungkanuparph e Kiertiburanakul (2008) na Tailândia descreveram 83,7% de criptococose em portadores do HIV.

Estudo conduzido por Pasqualotto *et al.* (2004) com pacientes que apresentaram criptococcemia na Santa Casa de Porto Alegre revelou que 89,3% eram HIV positivos. Posteriormente, Leal *et al.* (2008) analisando dados de pacientes com meningite criptocócica diagnosticados no laboratório central (LACEN) do Rio Grande do Sul descreveu que 95,0% eram portadores do vírus HIV.

A frequência de portadores do HIV com criptococose encontrada na presente casuística foi similar a relatada por Hoang *et al.* (2004) em Vancouver. Porém, foi menor do que descrita por Lindenberg *et al.*, (2008), que encontrou 84,5% de soropositivos em estudo anterior na mesma unidade de saúde em Campo Grande, Mato Grosso do Sul.

Faz-se importante lembrar que em 20,0% dos pacientes não foi realizado a sorologia para HIV, quer seja, por se tratar de pessoa idosa (n=1) ou pelo diagnóstico da doença ter ocorrido após o óbito, que inviabilizou a coleta de material para teste sorológico (n=2). Desta forma, tem-se um viés na pesquisa.

Todos os casos de criptococose em pacientes HIV positivos atendidos no NHU-UFMS no período de estudo foram causados por *C. neoformans*, enquanto que entre os soronegativos, a doença foi causada por *C. gattii*, dados esses consistentes com relatos da literatura (CALVO *et al.*, 2001; HOANG *et al.*, 2004; LEAL *et al.*, 2008; MICOL *et al.*, 2007; PASQUALOTTO *et al.*, 2004). Entretanto, a criptococose em AIDS causada por *C. gattii* também tem sido descrita (FAVALESSA *et al.*, 2009; FERNANDES *et al.*, 2000; LINDENBERG *et al.*, 2008; MOREIRA *et al.*, 2006; MORGAN *et al.*, 2006).

A síndrome clínica mais encontrada na presente investigação foi a meningoencefalite corroborando com outros estudos nacionais (MOREIRA *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2008) e internacionais (BADDLEY *et al.*, 2008; JONGWUTIWES; SUNGKANUPARPH; KIERTIBURANAKUL, 2008; MICOL *et al.*, 2007).

Segundo Escosteguy *et al.* (2004), 12,3% das meningites notificadas, confirmadas e investigadas em hospital público do Rio de Janeiro no período de 1986 a 2002 foram causados por *Cryptococcus* spp. De forma similar, em hospital de referência de Fortaleza, *Cryptococcus* sp. foi isolado em 9,25% das amostras de líquido cefaloespinal de pacientes portadores do HIV que apresentavam sinais e sintomas de meningite (MENEZES *et al.*, 2002).

Estudo realizado em Belo Horizonte por Oliveira *et al.* (2006) com pacientes HIV positivos atendidos em hospital público de referência de doenças infecciosas mostrou que 46,5% destes apresentaram algum tipo de doença neurológica, das quais 12,9% foram diagnosticadas como meningite criptocócica.

No presente estudo, meningoencefalite criptocócica também foi mais frequente em pacientes infectados pelo HIV corroborando com dados da literatura de que a forma neurológica predomina neste grupo de pacientes (HOANG *et al.*, 2004; JONGWUTIWES; SUNGKANUPARPH; KIERTIBURANAKUL, 2008; MICOL *et al.*, 2007; MOREIRA *et al.*, 2006).

Criptococose disseminada foi observada em 26,7% pacientes, destes, a maioria era HIV positivo. Neste grupo de soropositivos, a forma disseminada ocorreu em 33,3% destes pacientes. Este resultado é inferior ao encontrado por Jongwutiwes, Sungkanuparph e Kiertiburanakul (2008) na Tailândia. Estes autores descreveram esta síndrome clínica em 41,6% dos pacientes soropositivos.

Lesões de pele em pacientes com criptococose normalmente evidenciam disseminação da doença e são mais observadas em pacientes imunocomprometidos (BELLISIMO-RODRIGUES *et al.*, 2010; MORETTI *et al.*, 2008; SEVERO; ZARDO; LONDERO, 2001). Casos de criptococose cutânea primária são pouco frequentes e as lesões são de formas variadas (úlceras, nódulos, papulas entre outras) e podem ser confundidas com outras patologias (BELLISIMO-RODRIGUES *et al.*, 2010; PAU *et al.*, 2009; ZORMAN *et al.*, 2009).

Na presente investigação dois dos três pacientes HIV negativos apresentaram lesão cutânea primária (Figuras 10 e 12). Embora este tipo de apresentação clínica seja pouco descrita, esta deve ser considerada tendo em vista que há evidências na literatura de que pode ocorrer disseminação hematogênica atingindo outros sítios e evoluir para infecções mais graves (BIVANCO; MACHADO; MARTINS, 2006; LACAZ *et al.*, 2002; MORETTI *et al.*, 2008; PAU *et al.*, 2010).

A exemplo disso, cita-se o relato de caso descrito por Tilak *et al.* (2009) de um jovem HIV negativo que apresentava lesão ulcerada em pé por 5 meses. O paciente foi inicialmente tratado com antibiótico sem sucesso e posteriormente desenvolveu meningite criptocócica. A radiografia de tórax apresentou resultado normal. As culturas de escarro, sangue e urina foram negativas. Tendo em vista que *Cryptococcus gattii* foi isolado do líquido cefaloespinal e da lesão, os autores sugerem infecção cutânea primária com disseminação hematogênica. Neste relato não há descrição sobre pesquisa de antígeno polissacarídeo criptocócico em nenhuma amostra biológica, fato este que evidenciaria a infecção cutânea como foco primário, uma vez que a maioria dos relatos consiste em pacientes que após a disseminação da criptococose apresentaram lesões cutâneas (BELLISSIMO-RODRIGUES *et al.*, 2010; LACAZ *et al.*, 2002; SEVERO; BERTA; LONDERO, 2001).

Em paciente que faz uso de imunossupressores a criptococose cutânea primária pode evoluir para um quadro mais severo. Zorman *et al.* (2009) descrevem um caso de criptococose cutânea primária em paciente transplantado que teve parte do braço amputado por necrose tecidual.

Casos de criptococcemia são mais frequentes em pacientes imunocomprometidos (PASQUALOTTO *et al.*, 2004). Na presente investigação, fungemia foi observada em quatro pacientes, dos quais dois eram portadores do HIV e apresentaram meningoencefalite ou disseminação da doença. Nos outros dois pacientes não foi investigado HIV e um deles apresentou a forma disseminada da doença e o outro apresentou somente fungemia como forma clínica. Trata-se de um paciente cardiopata com sepse que teve isolamento de *Cryptococcus* sp. em hemocultura e a urocultura foi negativa.

Apesar do trato respiratório ser a porta de entrada para os propágulos infectantes do *Cryptococcus* sp., o diagnóstico de criptococose pulmonar na presente investigação foi pouco frequente. Isso pode estar relacionado ao fato de que a primoinfecção pode ser assintomática (HOANG *et al.*, 2004; MITCHELL; PERFECT, 1995; MORETTI *et al.*, 2008; PAPPALARDO; MELHEM, 2003). Somente um caso com forma pulmonar foi documentado no presente estudo. Trata-se de um paciente de 97 anos que foi internado por fratura de fêmur e apresentou pneumonia durante a hospitalização. *Cryptococcus neoformans* foi isolado de secreção traqueal. Não houve pesquisa de agentes infecciosos em outras amostras

biológicas. O paciente evoluiu para óbito tendo em vista a gravidade do caso e a idade avançada.

As manifestações clínicas da criptococose dependem do sítio envolvido (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992) e do estado imunológico do paciente (MORETTI *et al.*, 2008). No presente estudo os sinais e sintomas mais encontrados (Tabela 5) foram similares aos observados em outros relatos (BADDLEY *et al.*, 2008; CORRÊA *et al.*, 1999; DARZÉ *et al.*, 2000; LEAL *et al.*, 2008; LINDENBERG *et al.*, 2008; MICOL *et al.*, 2007). Faz-se importante lembrar que febre e cefaléia são manifestações clínicas inespecíficas e não podem ser diretamente relacionadas com a criptococose, necessitando assim de outras avaliações clínicas e laboratoriais. Além disso, a descrição de perda de peso observada na maioria dos pacientes pode estar mais relacionada à AIDS do que a doença fúngica.

O tempo decorrido do início das manifestações clínicas até o diagnóstico da criptococose foi similar ao relatado por outros autores (DARZÉ *et al.*, 2000; MICOL *et al.*, 2007). A sintomatologia apresentada pelos pacientes era inespecífica, o que pode ter favorecido o diagnóstico laboratorial tardio. Sete dos quinze pacientes só tiveram a doença diagnosticada após 30 dias do início dos sinais e sintomas. Entre estes, dois apresentaram lesões cutâneas que mimetizavam outras patologias. Esses, assim como os outros pacientes inicialmente procuraram atendimento em unidades básicas de saúde ou outros hospitais, inclusive em outras cidades e somente depois da piora do quadro clínico é que foram encaminhados para o NHU-UFMS.

A criptococose tem sido considerada na atualidade uma doença oportunista, na maioria das vezes está relacionada a pacientes imunodebilitados ou com alguma doença de base (BADDLEY *et al.*, 2008; HOANG *et al.*, 2004; MOREIRA *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2008). A este respeito, 66,7% dos pacientes estudados apresentavam pelo menos uma doença de base na ocasião do diagnóstico da criptococose, fato este também observado por Jongwutiwes, Sungkanuparph e Kiertiburanakul (2008).

A imunodeficiência causada pelo HIV favorece também outras infecções oportunistas como candidíase oral e esofágica, pneumocistose, tuberculose entre outras (MICOL *et al.*, 2007; MORGAN *et al.*, 2006). Estas comorbidades também foram observadas no presente estudo.

O tempo de hospitalização de pacientes com doença infectoparasitária depende de inúmeros fatores, mas principalmente das condições clínicas apresentadas e de alterações nos exames complementares. A mediana (23 dias) do tempo de hospitalização dos pacientes com criptococose encontrada neste estudo foi similar ao descrito por Micol *et al.* (2007).

No que diz respeito a tratamento, o Consenso de Criptococose e a Sociedade de Doenças Infecciosas da América recomendam que o tratamento da criptococose seja iniciado com anfotericina B associado a flucitosina (MORETTI *et al.*, 2008; PERFECT *et al.*, 2010).

A avaliação da eficácia de antifúngicos administrados para tratamento é de difícil interpretação. Muitos pacientes evoluíram a óbito em curto espaço de tempo e não completaram o tratamento recomendado. De um modo geral, as doses administradas ficaram abaixo ou dentro da faixa recomendada pelo Consenso de Criptococose (MORETTI *et al.*, 2008) e pela Sociedade de Doenças Infecciosas da América (PERFECT *et al.*, 2010).

O diagnóstico tardio da criptococose implica em complicações clínicas e o paciente pode evoluir para o óbito rapidamente, principalmente em casos com envolvimento neurológico ou se tratando de pacientes imunodeficientes (MORETTI *et al.*, 2008).

Dados da literatura mostram que a letalidade em pacientes com criptococose varia de 23,0% a 72,9% em diferentes casuísticas (CORRÊA *et al.*, 1999; HOANG *et al.*, 2004; JONGWUTIWES; SUNGKANUPARPH; KIERTIBURANAKUL, 2008; LEIMMAN; KOIFMAN, 2008; MOREIRA *et al.*, 2006). O resultado obtido neste estudo (Tabela 6) é similar ao relatado por outros autores (DARZÉ *et al.*, 2000; LINDENBERG *et al.*, 2008; PASQUALOTTO *et al.*, 2004).

A maioria dos pacientes acometidos pela criptococose costuma ser imunodeprimidos e essa deficiência imunológica leva a um pior prognóstico (SEVERO *et al.*, 1998), que muitas vezes evoluem para o óbito.

De acordo com alguns pesquisadores, 50,0% da mortalidade de pacientes com AIDS têm associação direta com a criptococose (PRADO *et al.*, 2009; RIBEIRO *et al.*, 2009). Essa alta taxa de mortalidade atribuída a criptococose é expressiva na região sul-matogrossense tendo em vista que a incidência de portadores do HIV no estado de 19,6 casos por 100.000 habitantes é mais alta do que a média nacional que é de 18,2 casos por 100.000 habitantes (BRASIL, 2009). Assim como a

mortalidade associada a AIDS (6,6 por 100.000 habitantes) é maior no Mato Grosso do Sul do que a média nacional que é de 6,1 (BRASIL, 2009).

Com base em relatos da literatura a letalidade associada à criptococose em pacientes HIV positivos varia de 22,2% a 76,9% (BICANIC *et al.*, 2006; JONGWUTIWES; SUNGKANUPARPH; KIERTIBURANAKUL, 2008; LINDENBERG *et al.*, 2008; MICOL *et al.*, 2007; MOREIRA *et al.*, 2006). O resultado obtido na presente investigação encontra-se dentro da frequência descrita por alguns pesquisadores neste grupo de pacientes.

No que diz respeito a tratamento e evolução do paciente, todos os pacientes não tratados foram a óbito (Tabela 7). Este fato reforça a idéia de que a criptococose é uma doença infectoparasitária de grande impacto em saúde pública na região, deve ser diagnosticada precocemente e o tratamento instituído o quanto antes na tentativa de minimizar seu curso fatal.

De acordo com o Ministério da Saúde, criptococose é uma das doenças definidoras de AIDS (BRASIL, 2005). Os dados descritos na Tabela 8 reforçam essa informação, como também observada por outros pesquisadores (JONGWUTIWES; SUNGKANUPARPH; KIERTIBURANAKUL, 2008; VIVIANI *et al.*, 2006). O desconhecimento da infecção pelo HIV por 44,5% dos pacientes justifica o pequeno número (3/9) dos que faziam uso de terapia antirretroviral antes do diagnóstico da criptococose.

Todos os pacientes HIV positivos tinham contagem de células CD4 abaixo de 100 células/ μ L, similar ao observado em alguns estudos (JONGWUTIWES; SUNGKANUPARPH; KIERTIBURANAKUL, 2008; MICOL *et al.*, 2007). Este dado é importante, pois a contagem de células CD4 juntamente com a determinação do número de cópias virais do HIV permite o monitoramento da progressão da AIDS.

Em pacientes com meningite criptocócica a celularidade líquórica costuma apresentar valores acima de 10 leucócitos/ μ L, com predomínio de células linfomonocíticas (MORETTI *et al.*, 2008). A realização do exame quimiocitológico do líquido cefaloespinal nos pacientes com neurocriptococose mostrou hiperproteinorraquia e hipercelularidade com predomínio de células mononucleares, conforme também observado por outros pesquisadores (JONGWUTIWES; SUNGKANUPARPH; KIERTIBURANAKUL, 2008; LINDENBERG *et al.*, 2008). Faz se importante destacar que quatro pacientes HIV positivos apresentaram citologia global do líquido cefaloespinal com valores normais ($\leq$ 5 leucócitos/ μ L). Esse dado

mostra a importância de se investigar agentes infecciosos nos pacientes imunodeprimidos, mesmo quando a citologia encontra-se normal (LINDENBERG *et al.*, 2008).

Cryptococcus sp. foram isolados em cultura de diferentes amostras clínicas, principalmente de líquido cefaloespinal e de sangue. A positividade do LCE foi superior ao relatado por Jongwutiwes, Sungkanuparph e Kiertiburanakul (2008) e Viviani *et al.* (2006), sendo similar ao descrito por especialistas (MORETTI *et al.*, 2008). A positividade encontrada nas hemoculturas foi superior à descrita em outros estudos (HOANG *et al.*, 2004; JONGWUTIWES; SUNGKANUPARPH; KIERTIBURANAKUL, 2008; MICOL *et al.*, 2007; VIVIANI *et al.*, 2006). O crescimento de *Cryptococcus* sp. na urocultura foi oito vezes superior do que descrito por Micol *et al.* (2007). De acordo com Pinto Junior *et al.* (2006) a cultura de urina é um excelente método para o diagnóstico laboratorial da criptococose disseminada e considerando que é um material de fácil obtenção, deve ser sempre realizada.

O exame micológico direto com nigrosina representa um bom método para investigar *Cryptococcus* spp. em amostras clínicas (MORETTI *et al.*, 2008) e no presente trabalho a positividade deste teste em amostras de líquido cefaloespinal foi menor que a cultura deste espécime clínico.

Um ponto crucial no diagnóstico laboratorial é que alguns exames complementares como o de imagens evidenciam a presença de nódulos pulmonares, que algumas vezes mimetizam tumores sólidos e na maioria das vezes é necessária a realização da biópsia pulmonar. Em algumas unidades hospitalares esta amostra costuma ser enviada somente para o laboratório de histopatologia. Assim, nos casos de criptococose pode ocorrer um diagnóstico tardio e em algumas situações inadequado, tendo em vista que no exame histopatológico normalmente não é possível definir o gênero do agente causal (HOANG *et al.*, 2004; MORETTI *et al.*, 2008). Com base nesse conhecimento, é imprescindível o envio de nódulo ou massa pulmonar para o laboratório de microbiologia com solicitação de cultura, que é considerada padrão ouro para diagnóstico de micoses sistêmicas (PAPPALARDO; MELHEM, 2003).

A investigação de espécies de *Cryptococcus* no ambiente é importante para o conhecimento da ecoepidemiologia da criptococose e pode ajudar na determinação das fontes de infecção, contribuindo para a minimização da exposição de pacientes suscetíveis.

Swinne, Kayembe e Niyimi (1986) pesquisaram amostras de poeira ambiental provenientes de residências de pacientes HIV positivos com criptococose e de pessoas saudáveis residentes em Kinshasa/África. Em 5 das 79 casas investigadas os autores isolaram *C. neoformans*.

Em estudo posterior, Swinne *et al.* (1989) observaram aumento no número (7/20) de isolamentos de *C. neoformans* provenientes do ambiente doméstico de pacientes HIV positivos com criptococose na República do Congo, país vizinho.

No Brasil, pesquisadores da FIOCRUZ/RJ realizaram investigação de *Cryptococcus* sp. de diferentes fontes ambientais e foram um dos pioneiros em documentar a presença desta levedura em casa abandonada (LAZÉRA; WANKE; NISHIWAKA, 1993).

Passoni *et al.* (1998) isolaram *C. neoformans* em 15,6% das casas de pacientes HIV positivos com criptococose, 14,3% no grupo de domicílios de pessoas aparentemente saudáveis e 8,9% nas residências de pacientes HIV positivos sem criptococose. Os autores sugerem que a presença de *C. neoformans* no ambiente doméstico de portadores do HIV pode favorecer a infecção.

Apesar da pequena amostragem utilizada no presente estudo o isolamento de *C. neoformans* em amostras ambientais pesquisadas na poeira doméstica, apresentou resultado similar ao observado por Passoni *et al.* (1998). Ao comparar-se apenas as amostras de poeira intradomiciliar, a frequência observada na presente pesquisa foi superior ao 3,4% encontrado por mesmo autor.

O baixo índice de positividade em cultura para *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* nas amostras ambientais pesquisadas em Campo Grande-MS pode ser devido ao rápido crescimento de fungos filamentosos contaminantes que consequentemente favorece resultado falso negativo (KOBAYASHI *et al.*, 2005; LUGARINI *et al.*, 2008a). Por outro lado, de acordo com Passoni *et al.* (1998), o resultado de cultura negativo não exclui a possibilidade do fungo estar presente no ambiente. Para minimizar este viés seria interessante realizar coletas dos mesmos sítios em diferentes ocasiões.

Como era de se esperar, outras espécies de *Cryptococcus* foram isoladas (Tabela 11) no ambiente incluindo: *C. laurentii*, *C. terreus*, *C. albidus* e *C. uniguttulatus*, espécies essas consideradas não patogênicas. Contudo, com o aumento de relatos de casos de infecção (CHENG *et al.*, 2001; CUNHA; LUSINS, 1973; RAMCHANDREN; GLADSTONE, 2004; VLCHKOVA-LASHKOSKA, 2004) por

C. laurentii e *C. albidus*, o Consenso de Criptococose considera estas duas espécies de *Cryptococcus* como patógenos emergentes (MORETTI *et al.*, 2008).

A maioria dos relatos acima citados descreve casos de criptococose em pacientes imunocomprometidos, daí a importância de se valorizar neste grupo de pacientes o isolamento destes microrganismos.

Com o intuito de melhor caracterizar os fungos *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* têm sido realizados estudos com utilização de técnicas de biologia molecular que permitem mostrar diferentes graus de heterogeneidade genética entre os isolados, possibilitando dados para melhor entendimento da epidemiologia da doença (MARTINS *et al.*, 2007; MEYER *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2008; TRILLES *et al.*, 2008).

No estudo realizado por Meyer *et al.* (2003), os autores encontraram predomínio do tipo molecular VNI na Argentina, Colômbia, Guatemala, Venezuela, Peru e México. Na Espanha, VNIII foi o mais encontrado, enquanto que no Chile foram os tipos moleculares VNI, VNII, VNIII sem predomínio de nenhum deles.

A partir do surto de criptococose causado por *Cryptococcus gattii* que ocorreu no Canadá entre 1999 a 2002, no qual humanos e animais tanto domésticos quanto selvagens foram infectados, foi feita investigação molecular dos isolados. Os resultados obtidos mostraram que 95,2% dos isolados clínicos, 83,3% dos isolados veterinários e todos os isolados ambientais eram *C. gattii* do tipo VGII (KIDD *et al.*, 2004).

Kidd *et al.* (2007) encontraram VGII como o tipo molecular de *Cryptococcus gattii* mais prevalente em fontes ambientais do Canadá e noroeste dos Estados Unidos.

Na pesquisa realizada por Loperena-Alvarez *et al.* (2010) com amostras ambientais da região sudoeste de Porto Rico observou-se predomínio de VGII.

Estudo realizado por Escadón *et al.* (2006) mostrou que VNI é o mais prevalente na Colômbia. Pesquisa recente conduzida por Frasés *et al.* (2009) na Espanha revelou que *Cryptococcus* isolados de amostras clínicas e ambientais pertenciam aos seguintes tipos moleculares: VNI (33%), VNIII (28,9%), VGI (14,4%), VNIV (12,4%) e VNII (11,3%).

No mesmo estudo multicêntrico realizado por Meyer *et al.* (2003) com *Cryptococcus* isolados de amostras clínicas provenientes de algumas regiões do Brasil (Rio Grande do Sul, São Paulo e Piauí) foi observado predomínio do tipo

molecular VNI (87,5%), seguido por VGII (8,9%) e VNII (3,6%). Esta pesquisa, entretanto, não reflete a realidade nacional.

Na região Norte do Brasil, por exemplo, Santos *et al.* (2008) descrevem *Cryptococcus* isolados de pacientes atendidos em hospital público em Belém – PA com elevada frequência de VGII (44,6%) e também a presença de VGI em 5,4% das cepas estudadas. Posteriormente, Costa *et al.* (2009) observaram o tipo molecular VGII em amostras ambientais coletadas na mesma região. Estes resultados reforçam a idéia que os tipos moleculares circulantes podem ser diferentes dependendo da região estudada como também referido por outros pesquisadores (LUGARINI *et al.*, 2008b; TRILLES *et al.*, 2008).

Outro estudo conduzido na região Sul do Brasil mostrou que em 26 pacientes com criptococose atendidos em um hospital universitário de Curitiba, 25 eram VNI e apenas um VGI (LUGARINI *et al.*, 2008b).

Estudo mais amplo foi conduzido por Trilles *et al.* (2008) que investigaram tipos moleculares entre 443 isolados de origem clínica e ambiental provenientes de onze estados brasileiros. Os autores descrevem que os tipos moleculares mais frequentemente encontrados nestas regiões foram: VNI (64,0%) e VGII (21,0%). Na região Norte e Nordeste do país houve predomínio de VGII (63,6%) e os tipos VGIII, VNI e VNIV também foram observados. Nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul foi mais frequente o VNI (75,4%). Todos os outros tipos foram encontrados em menor proporção. No estado de Mato Grosso do Sul em particular, os autores observaram (n=8) apenas dois tipos moleculares VNI e VGII.

Semelhante ao observado por Trilles *et al.* (2008), os resultados obtidos no presente estudo mostram dois tipos moleculares de *Cryptococcus* de origem clínica e são concordantes com outros autores em relação aos tipos prevalentes no país (LUGARINI *et al.*, 2008b; MEYER *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2008).

O tipo molecular VGII encontrado na presente pesquisa é predominante na região Norte e Nordeste do Brasil (COSTA *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2008; TRILLES *et al.*, 2008), em Porto Rico (LOPERENA-ALVAREZ *et al.*, 2010), no noroeste dos Estados Unidos (KIDD *et al.*, 2007) e coincide com o tipo responsável pelo surto no Canadá (KIDD *et al.*, 2004), sugerindo assim a possibilidade de dispersão do *Cryptococcus gattii* VGII pelo continente americano partindo do Canadá e estando presente até mesmo na região Centro-Oeste do Brasil.

Nos pacientes HIV positivos foi observado apenas o tipo VNI, corroborando com o descrito por outros pesquisadores (ESCADÓN *et al.*, 2006; LUGARINI *et al.*, 2008b; SANTOS *et al.*, 2008; TRILLES *et al.*, 2008).

Apesar do grande interesse, existem poucos trabalhos sobre a tipagem molecular com utilização da técnica de RFLP-URA5 com cepas de *Cryptococcus* isolados do ambiente. Escadón *et al.* (2006) descreveram os tipos moleculares de *Cryptococcus* isolados de detritos vegetais e excretas de aves na Colômbia encontrando predomínio de VNI. Os tipos VGIII e VGIV também foram relatados.

Dados nacionais de caracterização genotípica de *Cryptococcus* de amostras ambientais são escassos (ABEGG *et al.*, 2006; ANDRADE-SILVA *et al.*, 2010; LUGARINI *et al.*, 2008b; SOUZA *et al.*, 2010).

Alguns estudos demonstram a prevalência de VNI e VGII mesmo em fontes ambientais (LUGARINI *et al.*, 2008b; SOUZA *et al.*, 2010; TRILLES *et al.*, 2008). Entretanto outros tipos como o VGI e VNII também tem sido descritos (ABEGG *et al.*, 2006; ANDRADE-SILVA *et al.*, 2010).

Estudo realizado por Souza *et al.* (2010) em Goiânia, região Centro-Oeste do Brasil, descreve predomínio de VNI em amostras ambientais.

A única amostra ambiental positiva para *Cryptococcus* sp. encontrada no presente estudo foi caracterizada como VNI e apesar de se tratar de apenas uma amostra, o tipo molecular encontrado corresponde ao mais prevalente e citado por outros pesquisadores (ABEGG *et al.*, 2006; ANDRADE-SILVA *et al.*, 2010; ESCADÓN *et al.*, 2006; FRASÉS *et al.*, 2009; LUGARINI *et al.*, 2008b; MEYER *et al.*, 2003; SOUZA *et al.*, 2010; TRILLES *et al.*, 2008). Trata-se de uma amostra de poeira intradomiciliar que foi coletada da parte superior do forro de madeira (sótão) da casa de uma paciente HIV positivo com criptococose disseminada em que a porta do sótão era exatamente em cima da cama desta paciente.

Este foi o primeiro trabalho realizado em Mato Grosso do Sul utilizando técnicas de biologia molecular para caracterizar *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* isolados de pacientes com criptococose e de amostra ambiental coletada nesta região. Os resultados encontrados irão contribuir para o mapeamento dos tipos moleculares dos agentes de criptococose na região Centro-Oeste e também a nível nacional. Futuros estudos incluindo o uso de novas metodologias moleculares poderão ser vislumbrados a partir deste estudo pioneiro.

Cryptococcus neoformans e *Cryptococcus gattii* tem sido isolados de diferentes nichos ecológicos (BARONI *et al.*, 2006; COSTA *et al.*, 2009; ESCADÓN *et al.*, 2006; LAZÉRA *et al.*, 1996). O isolamento do fungo de poeira intradomiciliar sugere a presença deste agente em material facilmente aerossolizado que favorece a inalação de elementos fúngicos (PASSONI *et al.*, 1998; SWINNE; KAYEMBE; NIYIMI, 1986; SWINNE *et al.*, 1989).

Em levantamento recente realizado no PubMed (NCBI, 2011) e Biblioteca Virtual de Saúde (BIREME, 2011) não foi encontrado nenhum estudo que tenha comparado o perfil genético de levedura do complexo *Cryptococcus neoformans* isolado do ambiente e de amostra clínica para verificar a similaridade genética dos mesmos, determinando assim a fonte de infecção do paciente.

Diante do exposto, faz-se importante destacar que no presente trabalho foi encontrada uma cepa de *C. neoformans* isolada de urocultura com o mesmo perfil genético (Figura 18) da cepa de *C. neoformans* isolada do domicílio do paciente. A presença deste fungo na poeira doméstica pode ter favorecido a infecção como descrito por outros autores (PASSONI *et al.*, 1998; SWINNE; KAYEMBE; NIYIMI, 1986; SWINNE *et al.*, 1989). A fim de determinar se o fungo encontrado na poeira doméstica foi a fonte de infecção para o paciente é necessário a realização da determinação da identidade genética destes isolados por meio de sequenciamento molecular e a comparação destes resultados.

O grande desafio dos testes de suscetibilidade antifúngica é desenvolver um método *in vitro* que possa determinar a suscetibilidade da cepa no paciente prevendo o resultado clínico (LARSEN *et al.*, 2007), mas isto ainda está por ser alcançado com relação aos agentes da criptococose.

Na presente investigação optou-se pela utilização do documento M27-A3 do CLSI por ser um método padronizado de reconhecimento internacional proposto por equipe multiprofissional especializada que desenvolvem diretrizes consensuais no intuito de melhorar os testes clínicos e serviços de atenção à saúde. Segundo o CLSI a avaliação da farmacocinética do antifúngico e dos casos de candidíase orofaríngea, candidemia e infecções invasivas por *Candida* sp. tem sido correlacionados com o resultado *in vitro* dos testes de suscetibilidade antifúngica.

A utilização somente da primeira cepa isolada de cada paciente deve-se ao fato de que no período estudado só houve casos novos de criptococose e o curto período de estudo restringiu a investigação de casos de recidivas. Além disso,

relatos da literatura têm mostrado que durante o tratamento antifúngico pouca mudança nos valores de CIMs tem sido observada e sua variação ocorre somente nos casos de relapso (ARECHAVALA *et al.*, 2009; BRANDT *et al.*, 2001).

Todos os isolados de *Cryptococcus* foram sensíveis *in vitro* aos antifúngicos fluconazol, itraconazol, voriconazol e anfotericina B. Os valores das CIMs encontrados (Tabela 12) são concordantes com outros relatos da literatura nacional e internacional (COLOMBO *et al.*, 1995; ILLNAIT-ZARAGOZI *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2010; TORRES-RODRÍGUEZ *et al.*, 2008; TRILLES *et al.*, 2008).

As cepas de *C. gattii* apresentaram CIMs maiores que os isolados de *C. neoformans* para os antifúngicos azólicos. De acordo com relatos anteriores, essa espécie costuma apresentar CIMs mais elevadas e a terapia tende ser mais difícil e prolongada (CALVO *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2005; TRILLES *et al.*, 2008). Por outro lado, estudo realizado por Thompson III *et al.* (2009) mostrou que não houve diferença nas CIMs das espécies de *Cryptococcus* por meio da técnica de microdiluição em caldo descrita no documento do CLSI, o M27-A2.

Os resultados encontrados das CIMs dos antifúngicos azólicos para os isolados de *C. gattii* reafirmam pesquisas brasileiras (CALVO *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2005; TRILLES *et al.*, 2008). Especula-se que possa estar relacionado ao tipo molecular VGII predominante no Brasil, uma vez que em outros países há o predomínio de VGI (FRASÉS *et al.*, 2009; MEYER *et al.*, 2003). Estudos mais amplos devem ser conduzidos e também correlacioná-los com os tipos moleculares a fim de caracterizá-los, inclusive sobre a suscetibilidade antifúngica.

Anfotericina B é o antifúngico mais antigo e utilizado no tratamento de micoses sistêmicas (BENNETT, 2003; MORETTI *et al.*, 2008; RANG *et al.*, 2004; RICHARDSON; WARNOCK, 1993). Os casos de resistência a este antifúngico são pouco frequentes (BRANDT *et al.*, 2001; LOZANO-CHIU *et al.*, 1998). Entretanto, a sua utilização deve ser administrada com cautela e precisa ser monitorada no paciente devido sua nefrotoxicidade (BENNETT, 2003; RANG *et al.*, 2004).

No teste de suscetibilidade *in vitro* as CIMs para o fluconazol foram menores do que as relatadas em outros estudos (ARECHAVALA *et al.*, 2009; FAVALESSA *et al.*, 2009; MORAES; PRÍMOLA; HAMDAN, 2003; SOUZA *et al.*, 2010; TRILLES *et al.*, 2008). De acordo com dados da literatura sua excelente farmacocinética no SNC torna-o uma boa opção durante a fase de consolidação e de manutenção do tratamento da neurocriptococose (BENNETT, 2003; PERFECT; CASADEVALL,

2002; RANG *et al.*, 2004; RICHARDSON; WARNOCK, 1993). Além disso, o fluconazol é um dos mais utilizados porque apresenta boa disponibilidade oral, baixa toxicidade e difunde-se rapidamente nos líquidos corporais (BENNETT, 2003; RANG *et al.*, 2004).

Outro aspecto importante a ser discutido é a emergência de *Cryptococcus* resistentes ao fluconazol, documentado por alguns pesquisadores associado ao uso profilático ou monoterapia na fase de indução em pacientes com AIDS (ALLER *et al.*, 2000; BERG; CLANCY; NGUYEN, 1998; BICANIC *et al.*, 2006; BRANDT *et al.*, 2001). A resistência *in vitro* também tem sido relacionada a casos de recidiva da criptococose (ILLNAIT-ZARAGOZI *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2005).

Os valores de CIM para o itraconazol foram menores quando comparado ao fluconazol, entretanto, a pobre penetração no SNC torna-o pouco utilizado, exceto em casos de criptococose cutânea primária devido ao fato de ter uma boa penetração nos tecidos (CHEN; SORRELL, 2007). Um dos pacientes com criptococose cutânea primária foi tratado com este antifúngico e teve resolução completa da lesão.

Segundo Nguyen e Yu (1998), o voriconazol é mais potente que o itraconazol contra isolados de *Cryptococcus* sensíveis ao fluconazol e tão potente quanto o itraconazol contra as cepas sensíveis dose dependente e resistentes ao fluconazol.

Voriconazol é um dos azólicos mais novos disponíveis no mercado brasileiro. Todos os *Cryptococcus* estudados na presente pesquisa foram sensíveis *in vitro* a este antifúngico e a média geométrica encontrada foi menor que relatado por Souza *et al.* (2010). Os baixos valores de CIM observados no presente estudo mostram que os isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* ainda são bem sensíveis a este antifúngico, o que pode estar associado ao pouco tempo de comercialização do voriconazol.

Alguns pesquisadores sugerem a utilização de antifúngicos combinados no intuito de minimizar o surgimento de cepas resistentes. Silva *et al.* (2010) estudaram o uso do voriconazol associado com a anfotericina B em ratos imunodeficientes com criptococose e evidenciaram eficácia terapêutica em infecção experimental por *Cryptococcus neoformans* resistente ao fluconazol.

Infelizmente poucos são os estudos que correlacionam o resultado da suscetibilidade *in vitro* com evolução clínica no paciente. Aller *et al.* (2000) pesquisaram correlação dos resultados dos testes de suscetibilidade antifúngica ao fluconazol com o resultado clínico de pacientes HIV positivos com criptococose. Os autores referem falha terapêutica nos casos em que os isolados apresentaram CIMs maiores que 16 µg/mL. Sob este aspecto acredita-se que o teste de suscetibilidade antifúngica é importante para auxiliar no tratamento clínico mais adequado, entretanto sua correlação clínica ainda é incerta (CLSI, 2008).

O fato de não ter sido observado *Cryptococcus* resistentes aos antifúngicos utilizados no NHU-UFMS demonstra que a resistência antimicrobiana a estes agentes ainda não é um problema significativo na região sul matogrossense. Entretanto, como os testes de suscetibilidade antifúngica tendem a indicar mudanças no perfil dos isolados, estudos de vigilância devem ser conduzidos para detectar a emergência de cepas resistentes. Pesquisas mais ampla com maiores amostragens deve ser realizado no intuito de correlacionar o resultado *in vitro* com o clínico a fim de determinar limites confiáveis de CIMs, podendo assim evitar a falha terapêutica antes da piora clínica do paciente.

7. CONCLUSÕES

As espécies responsáveis pelos casos de criptococose diagnosticados durante o presente estudo no hospital público de ensino e referência no diagnóstico e tratamento de doenças infecciosas no estado de Mato Grosso do Sul são *Cryptococcus gattii* VGII e *Cryptococcus neoformans* VNI, esta espécie também está presente no ambiente domiciliar.

Com base nos resultados observados, pode-se concluir que as características epidemiológicas dos pacientes com criptococose refletem o consenso mundial: ocorre em pacientes adultos, em maior número do sexo masculino, procedentes da própria região e residentes na área urbana.

A ecoepidemiologia da criptococose no estado do Mato Grosso do Sul assemelha-se a dos estados Sudeste e Sul com relação ao expressivo predomínio de VNI.

Criptococose associada a AIDS é causada por VNI e reproduz o padrão mundial. Por outro lado, na ecoepidemiologia, uma fração de casos de criptococose em HIV negativo (em torno de 20%) mostra o predomínio do tipo VGII, prevalente no Norte e Nordeste do Brasil e causa de epidemia no Canadá e na região oeste dos Estados Unidos.

Em relação às características clínicas e laboratoriais, observa-se similaridade com a literatura, com predomínio de meningoencefalite, elevada letalidade em portadores do HIV e alta positividade da cultura do líquido cefaloespinhal, tornando-o o espécime clínico com melhor rendimento para diagnóstico laboratorial.

A investigação ambiental de residências de seis pacientes com criptococose mostra a presença de *C. neoformans* VNI na poeira intradomiciliar de um paciente.

A identificação de *C. neoformans* isolado de urocultura com o mesmo perfil molecular (VNI) do *C. neoformans* isolado do domicílio do paciente sugere a possibilidade de infecção neste ambiente, mas ainda necessita de estudos moleculares para verificar a identidade ou não dos dois isolados.

Os isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* obtidos de amostras clínicas mostram sensibilidade *in vitro* aos antifúngicos fluconazol, itraconazol,

voriconazol e anfotericina B no teste de microdiluição em caldo recomendado pelo CLSI, o qual também tem sido observado em outros estudos realizados no Brasil e no mundo.

REFERÊNCIAS²

- Abegg MA, Cella FL, Faganello J, Valente P, Schrank A, Vainstein MH. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolated from the excreta of Psittaciformes in a Southern Brazilian Zoological Garden. *Mycopathologia*. 2006; 161: 83-91.
- Abreu SRO. Comparação genotípica e fenotípica de isolados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* de caprinos e ovinos do sertão de Pernambuco [Tese]. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco; 2007.
- Aller AI, Martin-Mazuelos E, Lozano F, Gomez-Mateos J, Steele-Moore L, Holloway WJ, *et al*. Correlation of fluconazole MICs with clinical outcome in cryptococcal infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000; 44 (6): 1544-1548.
- Andrade-Silva L, Ferreira-Paim K, Silva-Vergara ML, Pedrosa AL. Molecular characterization and evaluation of virulence factors of *Cryptococcus laurentii* and *Cryptococcus neoformans* strains isolated from external hospital areas. *Fungal Biology* 2010; 114: 438-445.
- Arechavala AI, Ochiuzi MA, 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.

² Conforme *International Committee of Medical Journal Editors (Vancouver Style)*. Parte textual conforme Associação Brasileira de Normas Técnicas. Diretrizes recomendadas pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste (ZÁRATE, 2008).

Baddley JW, Perfect JR, Oster RA, Larsen RA, Pankey GA, Henderson H, *et al.* Pulmonary cryptococcosis in patients without HIV infection: factors associated with disseminated disease. *Eur J Clin Microbiol.* 2008; 27: 937-943.

Baroni FA, Paula CR, Silva EG, Viani FC, Rivera ING, Oliveira MTB, *et al.* *Cryptococcus neoformans* strains isolated from church towers in Rio de Janeiro city, RJ, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo.* 2006; 48 (2): 71-75.

Bauters TG, Swinne D, Boekhout T, Noens L, Nelis HJ. Repeated isolation of *Cryptococcus laurentii* from the oropharynx of an immunocompromized patient. *Mycopathologia.* 2002; 153 (3): 133-135.

Bellisimo-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(2): 211-212.

Bennett JE. Antimicrobianos: agentes antifúngicos. In: Goodman LS, Gilman AG, Hardman JG, Limbird LE. Goodman; Gilman As bases farmacológicas da terapêutica. 10 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill; 2003. p. 971-983.

Berg J, Clancy CJ, Nguyen MH. The hidden danger of primary fluconazole prophylaxis for patients with AIDS. *Clin Infect Dis.* 1998; 26: 186-187.

Biancalana FSC. Avaliação da suscetibilidade aos antifúngicos anfotericina B, itraconazol e voriconazol, individualmente e em combinação com terbinafina frente a conídios e hifas de fungos demáceos [tese]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2011.

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

Bicanic T, Harrison T, Niepieklo A, Dyakopu N, Meintjes G. Symptomatic relapse of HIV-associated cryptococcal meningitis after initial fluconazole monotherapy: the role of fluconazole resistance and immune reconstitution. Clin Infect Dis. 2006; 43: 1069-1073.

Bireme. Biblioteca Virtual em Saúde (BVS) [homepage na Internet]. São Paulo: Centro Latino Americano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde; 2011 [acesso em 10 jan 2011]. Disponível em: <http://regional.bvsalud.org/php/index.php?lang=p>

Bivanco FC, Machado CAS, Martins EL. Criptococose cutânea. Arq Med ABC. 2006; 31 (2): 102-109.

Boekhout T, Belkum AV, Leenders AP, Verbrugh HA, Mukamurangwa P, Swinne D, *et al.* Molecular typing of *Cryptococcus neoformans*: taxonomic and epidemiological aspects. Inst J Syst Bacteriol. 1997; 47 (2): 432-442.

Boekhout T, Theelen B, Diaz M, Fell JW, Hop WCJ, Abeln ECA *et al.* Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. Microbiology. 2001; 147: 891-907.

Bovers M, Hagen F, Kuramae EE, Diaz MR, Spanjaard L, Dromer F, *et al.* Unique hybrids between the fungal pathogens *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. FEMS Yeasts Res. 2006: 599-607.

Brandt ME, Pfaller MA, Hajjeh RA, Hamill RJ, Pappas PG, Reingold AL *et al.* Trends in antifungal drug susceptibility of *Cryptococcus neoformans* isolates in the United States: 1992 to 1994 and 1996 to 1998. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45 (11): 3065-3069.

Brasil. Ministério da Saúde, Secretária de Vigilância em Saúde. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso. 6 ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2005.

Brasil. Ministério da Saúde, Secretária de Vigilância em Saúde. Boletim epidemiológico - AIDS e DST (ano VI n 1). Brasília: Ministério da Saúde; 2009.

Brasil. Ministério da Saúde, Secretária de Atenção à Saúde. Cadastro Nacional de Estabelecimento de Saúde. Brasília: Ministério da Saúde; 2010 [atualizado em 22 nov 2010; acesso 24 nov 2010]. Disponível em:
http://cnes.datasus.gov.br/Exibe_Ficha_Estabelecimento.asp?VCo_Unidade=5002700009709&VEstado=50&VCodMunicipio=500270

Burnik C, Altintas ND, Ozkaya G, Serter T, Selcuk ZT, Firat P, *et al.* Acute respiratory distress syndrome due to *Cryptococcus albidus* pneumonia: case report and review of the literature [abstract]. *Med Mycol.* 2007; 45 (5): 469-473.

Calvo BM, Colombo AL, Fischamn O, Santiago A, Thompson L, Lazera M, *et al.* Antifungal susceptibilities, varities, and electrophoretics karyotypes of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* from Brazil, Chile, and Venezuela. *J Clin Microbiol.* 2001; 39 (6): 2348-2350.

Casadevall A, Fan M. URA5 gene of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*: evidence for a close phylogenetic relationship between *C. neoformans* var. *gattii* and *C. neoformans* var. *neoformans*. J Gen Appl Microbiol. 1992a; 38 (5): 491-495.

Casadevall A, Freundlich LF, Marsh L, Scharff MD. Extensive allelic variation in *Cryptococcus neoformans*. J Clin Microbiol. 1992b; 30 (5): 1080-1084.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Epi Info 2008, versão 3.5.1: programs for use by public health professionals. Atlanta: CDC, 2008. Disponível em: <http://wwwn.cdc.gov/epiinfo/>

Chang MR, Paniago AMM, Silva MM, Lazéra MS, Wanke B. Prostatic cryptococcosis – a case report. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis. 2008; 14 (2): 378-385.

Chen SCA, Sorrell T. Antifungal agents. Med J Aust. 2007; 187 (7): 404-409.

Cheng MF, Chiou CC, Liu YC, Wang HZ, Hsieh KS. *Cryptococcus laurentii* fungemia in a premature neonate. J Clin Microbiol. 2001; 39 (4): 1608-1611.

Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI): Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: Approved Standard – Third Edition. CLSI document M27-A3. Wayne: Clinical Laboratory Standards Institute; 2008.

Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI): Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Third Informational Supplement. CLSI document M27-S3. Wayne: Clinical Laboratory Standards Institute; 2008.

Colombo AL, Barchiesi F, McGough DA, Rinaldi M. Comparison of Etest and National Committee for Clinical Laboratory Standards Broth Macrodilution Method for azole antifungal susceptibility testing. J Clin Microbiol. 1995; 33 (3): 535-540.

Corrêa MPSC, Oliveira EC, Duarte RRS, Pardal PPO, Oliveira FM, Severo LC. Criptococose em crianças no estado do Pará, Brasil. Rev Soc Bra Med Trop. 1999; 32 (5): 505-508.

Costa SPSE, Lazéra MS, Santos WRA, Morales BP, Bezerra CCF, Nishiwaka MM, et al. First isolation of *Cryptococcus gattii* molecular type VGII and *Cryptococcus neoformans* molecular type VNI from environmental sources in the city Belém, Pará, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104 (4): 662-664.

Cunha T, Lusins J. *Cryptococcus albidus* meningitis. South Med J. 1973; 66 (11): 1230.

Custis PH, Haller JÁ, Juan E. An unusual case of cryptococcal endophthalmitis [abstract]. Retina. 1995; 15 (4): 300-304.

Darzé C, Lucena R, Gomes I, Melo A. Características clínicas laboratoriais de 104 casos de meningencefalite criptocócica. Rev Soc Bras Med Trop. 2000; 33 (1): 21-26.

Dias ALT, Matsumoto FE, Melhem MSC, Silva EG, Auler ME, Siqueira AM et al. Comparative analysis of Etest and broth microdilution method (AFST-EUCAST) for trends in antifungal drug susceptibility testing of Brazilian *Cryptococcus neoformans* isolates. J Medical Microbiol. 2006; 55: 1693-1699.

Diaz MR, Boekhout T, Theelen B, Fell JW. Molecular sequence analyses of the intergenic spacer (IGS) associated with rDNA of the two varieties of the pathogenic yeast, *Cryptococcus neoformans* [abstract]. Syst Appl Microbiol. 2000; 23 (4): 535-545.

Dromer F, Moulignier A, Dupont B, Gueho E, Baudrimont M, Improvisi L, *et al.* Myeloradculitis due to *Cryptococcus curvatus* in AIDS [abstract]. AIDS. 1995; 9 (4): 395-396.

Dromer F, Mathoulin-Pélissier S, Fontanet A, Ronin O, Dupont B, Lortholary O, *et al.* Epidemiology of HIV-associated cryptococcosis in France (1985-2001): comparison of the pre- and post- HAART eras. AIDS. 2004; 18: 555-562.

Ellis DH, Pfeiffer TJ. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. J Clin Microbiol. 1990; 28 (7): 1642-1644.

Escadón P, Sánchez A, Martínez M, Meyer W, Castañeda E. Molecular epidemiology of clinical and environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex reveals a high genetic diversity and the presence of the molecular type VGII mating type in Colombia. FEMS Yeast Res. 2006: 625-635.

Escosteguy CC, Medronho RA, Madruga R, Dias HG, Braga RC, Azevedo OP. Vigilância epidemiológica e avaliação da assistência às meningites. Rev Saúde Pública. 2004; 38 (5): 657-663.

Espinel-Ingroff A, Barchiesi F, Cuenca-Estrella M, Pfaller MA, Rinaldi M, Rodriguez-Tudela JL, *et al.* International and multicenter comparison of EUCAST and CLSI M27-A2 broth microdilution methods for testing susceptibilities of *Candida* spp. to fluconazole, itraconazole, posaconazole and voriconazole. J Clin Microbiol. 2005; 43 (8): 3884-3889.

Faria RO, Nascente PS, Meinerz ARM, Cleff MB, Antunes TA, Silverira ES, *et al.* Ocorrência de *Cryptococcus neoformans* em excretas de pombos na cidade de Pelotas, estado do Rio Grande do Sul. Rev Soc Bras Med Trop. 2010;43(2):198-200.

Favalessa OC, Ribeiro LC, Tadano T, Fontes CJF, Dias FB, Coelho BPA, *et al.* Primeira descrição da caracterização fenotípica e susceptibilidade *in vitro* a drogas de leveduras do gênero *Cryptococcus* spp isoladas de pacientes HIV positivos e negativos, estado de Mato Grosso. Rev Soc Bras Med Trop. 2009; 42 (6): 661-665.

Fernandes OFL, Costa TR, Costa MR, Soares AJ, Pereira AJSC, Silva MRR. *Cryptococcus neoformans* isolados de pacientes com AIDS. Rev Soc Bras Med Trop. 2000; 33 (1): 75-78.

Ferrer C, Colom F, Frasés S, Mulet E, Abad JL, Alió JL. Detection and identification of fungal pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S ribosomal DNA typing in ocular infections. J Clin Microbiol. 2001; 39 (8): 2873-2879.

Figueira-Coelho J, Martins T, Machado J. Cryptococcosis in HIV-infected patients: a reported of 84 cases. Eur J Intern Med. 2010; 21 (3): e16.

Filiú WFO, Wanke B, Agüena SM, Vilela VO, Macedo RCL, Lazéra M. Cativeiro de aves como fonte de *Cryptococcus neoformans* na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. Rev Soc Bras Med Trop. 2002; 35: 591-595.

Frank UK, Nishimura SL, Li NC, Sugai K, Yajko DM, Hadley WK *et al.* Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of cryptococcal capsular polysaccharide antigen in serum and cerebrospinal fluid. J Clin Microbiol. 1993; 31: 97-101.

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): 838-840.

Frasés S, Ferrer C, Sánchez M, Colom-Valiente MF. Molecular epidemiology of isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex from Spain. Rev Iberoam Micol. 2009; 26 (2): 112-117.

Furman-Kuklinska K, Naumnik B, Mysliwiec M. Fungaemia due to *Cryptococcus laurentii* as a complication of immunosuppressive therapy-a case report [abstract]. Adv Med Sci. 2009; 54 (1): 116-119.

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

Hagen F, Boekhout T. The search for the natural habitat of *Cryptococcus gattii*. Mycopathologia. 2010.doi: 10.1007/s11046-010-9313-6.

Hoang LMN, Maguire JA, Doyle P, Fyfe M, Roscoe DL. *Cryptococcus neoformans* infections at Vancouver Hospital and Health Sciences Centre (1997-2002): epidemiology, microbiology and histopathology. J Medical Microbiol. 2004; 53: 935-940.

Horta JA, Staats CC, Casali AK, Ribeiro AM, Schrank IS, Schrank A, *et al.* Epidemiological aspects of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. Med Mycol. 2002; 40: 565-571.

Husain S, Wagener MM, Singh N. *Cryptococcus neoformans* infection in organ transplant recipients: variables influencing clinical characteristics and outcome. Emerg Infect Dis. 2001; 7 (3): 375-379.

Illnait-Zaragozi MT, Martínez GF, Curfs-Breuker I, Fernández CM, Boekhout T, Méis JF. In vitro activity of the new azole isavuconazole (BAL4815) compared with six other antifungal agents against 162 *Cryptococcus neoformans* isolates from Cuba. Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52 (4): 1580-1582.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Brasília; 2010 [atualizada em 03 de dezembro 2010; acesso em 06 de dez 2010]. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>

Instituto Nacional de Meteorologia (INMET). Brasília; 2008 [atualizada em 17 de março de 2008; acesso em 06 de dez 2010]. Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/html/clima/mapas/?mapa=tmed>

Johnson LB, Bradley SF, Kauffman CA. Fungaemia due to *Cryptococcus laurentii* and a review of non-neoformans cryptococcaemia. *Mycoses*. 1998; 41 (7-8): 277-280.

Jongwutiwes U, Sungkanuparph S, Kiertiburanakul S. Comparison of clinical features and survival between cryptococcosis in Human Immunodeficiency Virus (HIV)-positive and HIV-negative patients. *Jpn J Infect Dis*. 2008; 61: 111-115.

Kamalam A, Yesudian P, Thambiah AS. Cutaneous infection by *Cryptococcus laurentii* [abstract]. *Br J Dermatol*. 1977; 97 (2): 221-223.

Kidd SE, Hagen F, Tschärke RL, Huynh M, Bartlett KH, MacDougall L, *et al*. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *PNAS*. 2004; 101 (49): 17258-17263.

Kidd SE, Chow Y, Mak S, Bach PJ, Chen H, Hingston AO, *t al*. Characterization of environmental sources of the human and animal pathogen *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and the Pacific Northwest of the United States. *Appl Environ Microbiol*. 2007; 73 (5): 1433-1443.

Kobayashi CCBA, Souza LKH, Fernandes OFL, Brito SCA, Sila AC, *et al*. Characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated from urban environmental sources in Goiânia, Goiás state, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2005; 47 (4): 203-207.

Koneman. EW, Winn Jr. W, Allen S, Janda W, Procop G, Schereckenberger P *et al*. Micologia. In: Diagnóstico microbiológico texto e atlas colorido. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. p.1145-1236.

Kordossis T, Avlami A, Velegraki A, Sefanou I, Georgakopoulos G, Papalambrou C *et al.* First report of *Cryptococcus laurentii* meningitis and a fatal case of *Cryptococcus albidus* cryptococcaemia in AIDS patients [abstract]. Med Mycol. 1998; 36 (5): 335-339.

Krcmery V, Kunova A, Mardiak J. Nosocomial *Cryptococcus laurentii* fungemia in a bone marrow transplant patient after prophylaxis with ketoconazole successfully treated with oral fluconazole [abstract]. Infection. 1997; 25 (2): 130.

Krumholz RA. Pulmonary cryptococcosis: a case due to *Cryptococcus albidus* [abstract]. Am Rev Respir Dis. 1972; 105 (3): 421-424.

Kunova A, Krcmery V. Fungaemia due to thermophilic cryptococci: 3 cases of *Cryptococcus laurentii* bloodstream infections in cancer patients receiving antifungals [abstract]. Scand J Infect Dis. 1999; 31 (3): 328.

Kwon-Chung KJ, Polacheck I, Bennett JE. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (Serotype A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotype B and C). J Clin Microbiol. 1982; 15 (3): 535-537.

Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Cryptococcosis. In:_____. Medical mycology. Philadelphia: Lea; Febiger; 1992. p. 397-446.

Kwon-Chung KJ, Boekhout T, Fell JW, Diaz M. Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurians* and *C. bacillisporus* (*Basidiomycota*, *Hymenomycetes*, *Tremellomycetidae*). Taxon. 2002; 51: 804-806.

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

Lacaz CS, Heins-Vaccari EM, Hernández-Arriagada GL, Martins EL, Prearo CAL, Corim SM, *et al.* Primary cutaneous cryptococcosis due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* serotype B, in an immunocompetent patient. Rev Inst Med Trop S Paulo. 2002; 44 (4): 225-228.

Larone DH. Medical Important Fungi: a guide to identification. 3 ed. Washington: American Society for Microbiology; 1995.

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

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

Lazéra MS, Pires DA, Camillo-Coura L, Nishiwaka MM, Bezerra CCF, Trilles L, *et al.* Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in decaying wood forming hollows in living trees. J Vet Med Mycol. 1996; 34: 127-131.

Lazéra MS, Cavalcanti MA, Trilles L, Nishiwaka MM, Wanke B. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* – evidence for a natural habitat related to decaying wood in a porttery tree hollow. Med Mycol. 1998; 36 (2): 119-122.

Lazéra MS, Cavalcanti MAS, Londero AT, Trilles L, Nishikawa MM, Wanke B. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. Med Mycol. 2000; 38 (5): 379-383.

Leal AL, Faganello J, Fuentefria AM, Boldo JT, Bassanessi MC, Vainstein MH. Epidemiological of cryptococcal meningitis pacientes in Rio Grande do Sul, Brazil. Mycopathologia. 2008; 166 (2): 71-75.

Leimman BCQ, Koifman RJ. Cryptococcal meningitis in Rio de Janeiro State, Brazil, 1994-2004. Cad Saúde Pública. 2008; 24 (11): 2582-2592.

Lengeler KB, Cox GM, Heitman J. Serotype AD strains of *Cryptococcus neoformans* are diploid or aneuploid and are heterozygous at the mating-type locus. Infect Immun. 2001; 69 (1): 115-122.

Lindenberg ASC, Chang MR, Paniago AMM, Lazéra MS, Moncada PMF, Bonfim GF, *et al*. Clinical and epidemiological features of 123 cases of cryptococcosis in Mato Grosso do Sul, Brazil. Rev Inst Med Trop S Paulo. 2008; 50 (2): 75-78.

Litvintseva AP, Kestenbaum L, Vilgalys R, Mitchell TG. Comparative analysis of environmental and clinical populations of *Cryptococcus neoformans*. J Clin Microbiol. 2005; 43 (2): 556-564.

Loperena-Alvarez Y, Ren P, Li X, Schoonmaker-Bopp DJ, Bopp DJ, Ruiz A, *et al*. Genotypic characterization of environmental isolates of *Cryptococcus gattii* from Puerto Rico. Mycopathologia. 2010; 170 (4): 279-285.

Lozano-Chiu M, Paetznick VL, Ghannoum MA, Rex JH. Detection of resistance to amphotericin B among *Cryptococcus neoformans* clinical isolates: performances of three different media assessed by using E-test and National Committee for Clinical Laboratory Standards M27-A methodologies. J Clin Microbiol. 1998; 36 (10): 2817-2822.

Lugarini C, Condas LAZ, Soresini GCG, Santos RCF, Muro MD, Farias MR, *et al.* Screening of antigenemia and isolation of *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* from cloaca and crop of birds in the state of Paraná, Brazil. Pesq Vet Bras. 2008a; 28 (7): 341-344.

Lugarini C, Goebel CS, Condas LAZ, Muro MD, Farias MR, *et al.* *Cryptococcus neoformans* isolated from Passerine and Psittacine bird excreta in the state of Paraná, Brazil. Mycopathologia. 2008b; 166: 61-69.

Lynch JP, Schaberg DR, Kissner DG, Kauffman CA. *Cryptococcus laurentii* lung abscess [abstract]. Am Rev Respir Dis. 1981; 123 (1): 135-138.

Martins MA, Pappalardo MCSM, Melhem MSC, Pereira-Chioccia 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): 777-784.

Menezes EA, Monteiro MNR, Angelo MRF, Santos D, Freire CCF, Cunha FA. *Cryptococcus neoformans* causing meningitis in AIDS patients. Rev Soc Bras Med Trop. 2002; 35 (5): 537-539.

Meyer W, Marszewska K, Amirmostofian M, Igreja RP, Hardtke C, Methling K, *et al.* Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA - pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. *Electrophoresis*. 1999; 20 (8): 1790-1799.

Meyer W, Castañeda A, Jackson S, Huynh M, Castañeda E, the Iberoamerican Cryptococcal Study Group. Molecular typing of Iberoamerican *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerg Infect Dis*. 2003; 9 (2): 189-195.

Meyer W, Aanensen DM, Boekhout T, Cogliati M, Diaz MR, Esposto MC, *et al.* Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Med Mycol*. 2009; 47: 561-570.

McCurdy LH, Morrow JD. Ventriculitis due to *Cryptococcus uniguttulatus* [abstract]. *South Med J*. 2001; 94 (1): 65-66.

Micol R, Lortholary O, Sar B, Laureillard D, Ngeth C, Dousset JP, *et al.* Prevalence determinants of positivity, and clinical utility of cryptococcal antigenemia in Cambodian HIV-infected patients. *Acquir Immune Defic Syndr*. 2007; 45 (5): 555-559.

Mitchell TG, Perfect JR. Cryptococcosis in the era of AIDS – 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Microbiol Rev*. 1995; 8 (4): 515-548.

Moraes EMP, Prímola NS, Hamdan JS. Antifungal susceptibility of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* to four antifungal drugs determined by two techniques. *Mycoses*. 2003; 46 (5-6): 164-168.

Moreira TA, Ferreira MS, Ribas RM, Borges AS. Cryptococcosis: clinical epidemiological laboratorial study and fungi varieties in 96 patients. Rev Soc Bras Med Trop. 2006; 39 (3): 255-258.

Moretti ML, Resende MR, Lazéra MS, Colombo AL, Shikanai-Yasuda MA. Consenso em criptococose. Rev Soc Bras Med Trop. 2008; 41 (5): 524-544.

Morgan J, McCarthy KM, Gould S, Fan K, Arthington-Skaggs B, Iqbal N, *et al.* *Cryptococcus gattii* infection: characteristics and epidemiology of cases identified in a South African province with high HIV seroprevalence, 2002-2004. Clin Infect Dis. 2006; 43: 1077-1080.

National Center of Biotechnology Information (NCBI). PubMed.gov [homepage da Internet]. National Center of Biotechnology Information: 2011 [acesso 10 jan 2011]. Acesso em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

Negróni R, Cendoya C, Arechavala AI, Robles AM, Bianchi M, Bava AJ, *et al.* Detection of *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide antigen asymptomatic HIV-infected patients. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1995; 37 (5): 385-389.

Nguyen MH, Yu C. In vitro comparative efficacy of voriconazole and itraconazole against fluconazole-susceptible and resistant *Cryptococcus neoformans* isolates. Antimicrob Agents Chemother. 1998; 42 (2): 471-472.

Nishikawa MM, Lazera MS, Barbosa GG, Trilles L, Balassiano BR, Macedo RCL, *et al.* Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Brazil: analysis of host and regional patterns. J Clin Microbiol. 2003; 41 (1): 73-77.

Oliveira JF, Greco DB, Oliveira GC, Christo PP, Guimarães MDC, Corrêa-Oliveira R. Neurological disease in HIV-infected patients in the era of highly active antiretroviral treatment: a Brazilian experience. Rev Soc Bras Med Trop. 2006; 39 (2): 146-151.

Pappalardo CSM, Melhem MSC. Cryptococcosis: a review of the brazilian experience for the disease. Rev Inst Med Trop S Paulo. 2003; 45 (6): 299-305.

Pasqualotto AC, Severo CB, Oliveira FM, Severo LC. Cryptococchemia. An analysis of 28 cases with emphasis on the clinical outcome and its etiologic agent. Rev Iberoam Micol. 2004; 21: 143-146.

Passoni LFC. *Cryptococcus neoformans* no ambiente domiciliar: estudo de residências de aidéticos com e sem criptococose e de indivíduos aparentemente saudáveis na região metropolitana do Rio de Janeiro [Dissertação]. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 1994.

Passoni LFC, Wanke B, Nishiwaka MM, Lazera MS. *Cryptococcus neoformans* isolated from human dwellings in Rio de Janeiro, Brazil: an analysis of the domestic environment of AIDS patients with and without cryptococcosis. Med Mycol. 1998; 36: 305-311.

Pau M, Lallai C, Aste N, Aste , Atzori L. Primary cutaneous cryptococcosis in an immunocompetent host. Mycoses. 2010; 53 (3): 256-258.

Pedroso RS, Ferreira JC, Candido RC. In vitro susceptibility to antifungal agents of environmental *Cryptococcus* spp. isolated in the city of Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006; 101 (3): 239-243.

Perfect JR, Casadevall A. Cryptococcosis. Infect Dis Clin N Am. 2002; 16: 837-874.

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: 291-322.

Pinto Junior VL, Galhardo MCG, Lazéra M, Wanke B, Reis RS, Perez M. Criptococose associada à AIDS: a importância do cultivo da urina no seu diagnóstico. Rev Soc Bras Med Trop. 2006; 39 (2): 20-232.

Prado M, Silva MB, Laurenti R, Travassos LR, Taborda CP. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104 (3): 513-521.

Ramchandren R, Gladstone DE. *Cryptococcus albidus* infection in a patient undergoing autologous cell transplant. Transplantation. 2004; 77 (6): 956.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. Fármacos antifúngicos. In: _____. Farmacologia. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2004. p. 758-764.

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; 40 (5): 293-298.

Rex JH, Pfaller MA, Walsh TJ, Chaturvedi V, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, *et al.* Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. Clin Microbiol Rev. 2001; 14 (4): 643-658.

Ribeiro LC, Hahn RC, Favalessa OC, Tadano T, Fontes JF. Micoses sistêmicas: fatores associados ao óbito em pacientes com infecção pelo vírus da imunodeficiência humana, Cuiabá, estado de Mato Grosso, 2005-2008. Rev Soc Bras Med Trop. 2009; 42 (6): 698-705.

Richardson MD, Warnock DW. Antifungal Drugs. In: _____. Fungal Infection: diagnosis and management. Oxford: Blackwell; 1993. p. 17-42.

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 Standards methods set forth by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (E.Dis. 7.1) and CLSI (M27-A2). J Clin Microbiol. 2007; 45 (1): 109-111.

Sánchez A, Escandón P, Castañeda E. Determinación in vitro de la actividad de los factores asociados con la virulência de aislamientos clínicos del complejo *Cryptococcus neoformans*. Rev Iberoam Micol. 2008; 25: 145-149.

Shankar EM, Kumarasamy N, Bella D, Renuka S, Kownhar H, Suniti S, *et al.* Pneumonia and pleural effusion due to *Cryptococcus laurentii* in a clinically proven case of AIDS [abstract]. Can Respir J. 2006; 13 (5): 275-278.

Santos WRA, Meyer W, Wanke B, Costa SPSE, Trilles L, Nascimento JLM, *et al.* Primary endemic cryptococcosis *gattii* by molecular type VGII in the state of Pará, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2008; 103 (8): 813-818.

Severo LC, Oliveira FM, Silva VB. Diferenças clínicas, epidemiológicas e ecológicas entre as duas variedades de *Cryptococcus neoformans* [abstract]. Rev Med St Casa. 1998; 9 (16): 1672-1686.

Severo LC, Zardo IB, Londero AT. Cutaneous cryptococcosis due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. Rev Iberoam Micol. 2001; 18: 200-201.

Silva PR, Rabelo RAS, Terra APS, Teixeira DNS. Suscetibilidade a antifúngicos de variedades de *Cryptococcus neoformans* isoladas de pacientes em hospital universitário. Rev Soc Bras Med Trop. 2008; 41 (2): 158-162.

Silva EG, Paula CR, Dias ALT, Chang MR, Ruiz LS, Gambale V, *et al.* Combination efficacy of voriconazole and amphotericin B in the experimental disease in immunodeficient mice caused by fluconazole-resistant *Cryptococcus neoformans*. Mycopathologia. 2010; doi 10.1007/s11046-010-9375-5.

Simon G, Simon G, Erdos M, Marodi L. Invasive *Cryptococcus laurentii* disease in a nine-year-old boy with X-linked hyper-immunoglobulin M syndrome [abstract]. Pediatr Infect Dis J. 2005; 24 (10): 935-937.

Soares MCB, Paula CR, Dias ALT, Caseiro MM, Costa SOP. Environmental strains of *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* in the city of Santos, SP, Brazil. Rev Inst Med Trop S Paulo. 2005; 47 (1): 31-36.

Sorrell TC, Ellis DH. Ecology of *Cryptococcus neoformans*. Rev Iberoam Micol. 1997; 14: 42-43.

Sorrell TC. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. Med Mycol. 2001; 39: 155-168.

Souza LKH, Fernandes OFL, Kobayashi CCBA, Passos XS, Costa CR, Lemos JA, *et al*. Antifungal susceptibilities of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* in Goiânia city, Goiás, Brazil. Rev Inst Med Trop S Paulo. 2005; 47: 253-256.

Souza LKH, Souza Junior AH, Costa CR, Fagnello J, Vainstein MH, Chagas ALB, *et al*. Molecular typing and antifungal susceptibilities of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* species complex isolates in Goiania, Brazil. Mycoses. 2010; 53: 62-67.

Speed B, Dunt D. Clinical and host differences between infections with two varieties of *Cryptococcus neoformans*. Clin Infect Dis. 1995; 21: 28-34.

Springer DJ, Chatuverdi V. Projecting global occurrence of *Cryptococcus gattii*. Emerg Infect Dis. 2010; 16 (1): 14-20.

Swinne D, Kayembe K, Niyimi M. Isolation of saprophytic *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in Kinshasa, Zaire. Ann Soc Belge Méd Trop. 1986; 66: 57-61.

Swinne D, Deppner M, Laroche R, Floch JJ, Kadende P. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from houses of AIDS-associated cryptococcosis patients in Bujumbura (Burundi). AIDS. 1989; 3: 389-390.

Temtest A, Roux P, Poirot JL, Ronin O, Dromer F. Evaluation of a monoclonal antibody-based latex agglutination test for diagnosis of cryptococcosis: comparison with two tests using polyclonal antibodies. *J Clin Microbiol.* 1992; 30: 2544-2550.

Thompson III GR, Wiederhold NP, Fothergill AW, Vallor AC, Wickes BL, Patterson TF. Antifungal susceptibilities among different serotypes of *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53 (1): 309-311.

Tilak R, Prakash P, Nigam C, Tilak V, Gambhir IS, Gulati AK. Cryptococcal meningitis with an antecedent cutaneous cryptococcal lesion. *Dermatol online J.* 2009; 15(9): 12.

Torres-Rodríguez JM, Alvarado-Ramírez E, Murciano F, Sellart M. MICs and minimum fungicidal concentrations of posaconazole, voriconazole and fluconazole for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *J Antimicrob Chemother.* 2008; 62: 205-206.

Trilles L, Lazéra 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): 455-462.

Vandenbossche I, Vaneechoutte M, Vandevenne M, Baere T, Verschraegen G. Susceptibility testing of fluconazole by the NCCLS broth macrodilution method, E-Test, and disk diffusion for application in the routine laboratory. *J Clin Microbiol.* 2002; 40 (3): 918-921.

Viviani MA, Cogliati M, Esposto MC, Lemmer K, Tintelnot K, Valiente MFC, *et al.* Molecular analysis of 311 *Cryptococcus neoformans* isolates from a 30-month ECMM survey of cryptococcosis in Europe. FEMS Yeast Res. 2006; 6: 614-619.

Vlchkova-Lashkoska M, Kamberova S, Starova A, Goleva-Mishevskia L, Tsatsa-Bilijanovska N, Janevska V, *et al.* Cutaneous *Cryptococcus laurentii* infection in a human immunodeficiency virus-negative subject. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2004; 18 (1): 99-100.

Xu J, Vilgalys R, Mitchell TG. Multiple gene genealogies reveal recent dispersion and hybridization in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. Mol Ecol. 2000; 9: 1471-1481.

Wanke B, Lazera MS, Nucci M. Fungal infections in the immunocompromised host. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2000; 95 (suppl 1): 153-158.

Zárate P. Diretrizes para elaboração de teses e dissertações. Campo Grande,MS: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste; 2008.

Zorman JV, Zupanc TL, Parac Z, Cucek I. Primary cutaneous cryptococcosis in a renal transplant recipient: case report. Mycoses. 2009; 53: 535-537.

ANEXO A – Composição de meios e soluções

Meio N

Sulfato de magnésio heptahidratado (Sigma,EUA).....	0,5 g
Fosfato de potássio monobásico (Synth,Brasil).....	1,0 g
Dextrose (Synth,Brasil).....	20,0 g
Agar (Isofar,Brasil).....	2,0 g
Água destilada q.s.p.....	1000 mL

Tampão de Lise

Dodecil sulfato de sódio (USB, EUA)[detergente, lisa membrana celular].....	0,50 g
Cloreto de Sódio (Sigma,EUA)[mantém concentração salina tecido].....	1,40 g
EDTA (Bioagency,Brasil) [quelante, inativa nucleases].....	0,73 g
Tris-HCl 1 M (Sigma,EUA) [tamponante].....	20 mL
Água bi-destilada estéril q.s.p.....	100 mL
Homogeneizar até completa dissolução e filtrar com filtro Millex [®] (poro de 0,22 µm).	

Tampão TBE 10X

Ácido Bórico (USB,EUA).....	55,00 g
Tris Base (Promega,EUA).....	108,00 g
EDTA (Sigma, EUA).....	7,44 g
Água bi-destilada estéril q.s.p.....	1000 mL

TBE 1X

Tampão TBE 10x.....	100 mL
Água bi-destilada estéril q.s.p.....	1000 mL

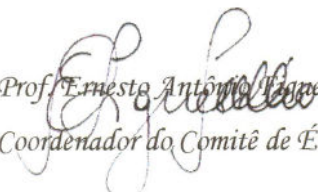
ANEXO B – Aprovação do Comitê de Ética



Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Comitê de Ética em Pesquisa /CEP/UFMS

*Carta de Aprovação*

A minha assinatura neste documento, atesta que o protocolo nº 1383 da Pesquisadora Chrystiane Rodrigues Pasa intitulado "Investigação de Cryptococcus spp no ambiente domiciliar de pacientes com criptococose em Mato Grosso do Sul", e o seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foram revisados por este comitê e aprovados em reunião extraordinária no dia 19 de março de 2009, e seu título emendado para "Tipagem molecular e suscetibilidade de Cryptococcus isolados de pacientes em Hospital Universitário com investigação domiciliar", em reunião ordinária no dia 28 de abril de 2011, encontrando-se de acordo com as resoluções normativas do Ministério da Saúde.


Prof. Ernesto Antônio Viqueiró Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS

Campo Grande, 6 de maio de 2011.

Comitê de Ética da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
<http://www.propp.ufms.br/bioetica/cep/>
bioetica@propp.ufms.br
fone 0XX67 345-7187

APÊNDICE A – Continuação

Culturas realizadas para identificação do agente etiológico:

() hemocultura, () urocultura, () coprocultura, () líquido pleural, () escarro
 () lavado _____, () biópsia _____, () aspirado _____,
 () ascite, () secreção traqueal, () sec. ferida cirúrgica, () outros _____

Agentes etiológicos isolados: _____

Micológico: Amostra: _____ () Direto: () raros () alguns () numerosos,

() Nanquim: () raros () alguns () numerosos, Cultura: _____ CGB: _____

Antifungigrama: Anfo B _____, Fluconazol _____, Itraconazol _____, Voriconazol _____

Micológico: Amostra: _____ () Direto: () raros () alguns () numerosos,

() Nanquim: () raros () alguns () numerosos, Cultura: _____ CGB: _____

Antifungigrama: Anfo B _____, Fluconazol _____, Itraconazol _____, Voriconazol _____

Hemograma ____/____/____: () Leucopenia, () Leucocitose, () Plaquetopenia () Anemia

Leucócitos: _____ Meta: _____ Bast _____ Seg _____ Eos _____ Linf _____ Mono _____

Plaquetas: _____ Erit: _____ Hb: _____ Ht: _____

Parâmetros líquidos: ____/____/____:

Citologia global: leucócitos: _____ e hemácias: _____; Glicose: _____, Proteínas: _____,

Citologia diferencial: PMN _____% e MN _____%; LDH: _____, Cloretos: _____

Exames complementares:

RX: () tórax, () crânio, () abdômen. R: () normal () alterado: _____

TC: () tórax, () crânio, () abdômen. R: () normal () alterado: _____

US: () tórax, () crânio, () abdômen. R: () normal () alterado: _____

Evolução: dias de internação: ____ () alta () óbito, causa principal: _____

APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa. Você precisa decidir se quer participar ou não. Por favor, não se apresse em tomar a decisão. Leia cuidadosamente o que se segue e pergunte ao responsável pelo estudo qualquer dúvida que você tiver. Este estudo está sendo conduzido pela farmacêutica-bioquímica Chrystiane Rodrigues Pasa.

Título da Pesquisa: Investigação de *Cryptococcus* spp no ambiente domiciliar de pacientes com criptococose em Mato Grosso do Sul.

Objetivo, justificativa e procedimento de pesquisa: A finalidade deste estudo é investigar as características clínicas e ambientais da criptococose. A criptococose é causada por um fungo presente no ambiente e pode ser adquirido através da inalação de estruturas fúngicas. Um outro propósito é descobrir a fonte de infecção desta doença para tentar diminuir o risco de outras pessoas se infectarem.

Todas as pessoas com diagnóstico laboratorial de criptococose poderão participar deste estudo e quando estiverem impossibilitadas ou forem incapazes será necessária a autorização do representante legal.

Você foi submetido a exame de coleta de material biológico pra diagnosticar a doença criptococose. Esta amostra será utilizada pelo pesquisador no laboratório da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul para definir características pertencentes ao fungo causador da doença. Você será entrevistado sobre sua rotina, procedência, ocupação, possível contato com aves e/ou madeira em decomposição, viagens principalmente para área rural, sintomas, antecedentes clínicos, uso de medicamentos até um mês antes do diagnóstico, frequência em ambiente hospitalar. Você deverá autorizar para que o pesquisador entre no seu domicílio e colete amostras de poeira, material em decomposição e fezes de aves e/ou morcegos.

Este estudo se aplica a todos os casos diagnósticos de criptococose ocorridos no HU no período de 2009 a 2010.

Desconfortos e riscos possíveis e benefícios esperados: Você poderá experimentar constrangimento ao responder algumas perguntas e ao receber o pesquisador em seu domicílio.

Métodos alternativos existentes: Não existem métodos alternativos para esta pesquisa.

Forma de acompanhamento, assistência e garantia de esclarecimentos: Você receberá informações sobre o seu estado geral de saúde e orientações sobre a doença. Também será notificado dos aspectos mais importantes do ensaio que você participou. E será informado periodicamente de qualquer nova informação que possa modificar a sua vontade em continuar participando do estudo. Para perguntas ou problemas referentes ao estudo poderá falar com a coordenadora do projeto a Farmacêutica-Bioquímica Chrystiane Rodrigues Pasa pelos telefones (67) 3342-2557 ou (67) 9902-8589. Para perguntas sobre seus direitos como participante no estudo chame o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFMS, no telefone (67) 3345-7187.

Liberdade de participação do sujeito da pesquisa: Sua participação no estudo é voluntária. Você pode escolher não fazer parte do estudo, ou pode desistir a qualquer momento. Você não será proibido de participar de novos estudos. Você poderá ser solicitado a sair do estudo se não cumprir os procedimentos previstos ou atender as exigências estipuladas. Você receberá uma via assinada deste termo de consentimento.

Garantia de sigilo, privacidade e confidencialidade: Se você concordar em participar do estudo, seu nome e identidade serão mantidos em sigilo. A menos que requerido por lei, somente o pesquisador, a equipe do estudo, Comitê de Ética independente e inspetores de agências regulamentadoras do governo (quando necessário) terão acesso a suas informações para verificar as informações do estudo.

Formas de ressarcimento e indenização: Não há previsão de ressarcimento, compensação e/ou indenização pela sua participação neste estudo.

Eu, _____ declaro que fui suficientemente informado (a) a respeito da pesquisa e que li, ou foram lidas para mim, as premissas éticas e condições deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). E concordo em participar da pesquisa, de forma livre e autônoma, proposta por intermédio das condições aqui expostas e a mim apresentadas pelo (a) pesquisador (a)

Campo Grande, ____ de _____ de _____,

Assinatura do sujeito da pesquisa

Declaro que obtive o presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) do sujeito da pesquisa em questão, conforme os preceitos da Ética em Pesquisa em Seres Humanos.

Campo Grande, ____ de _____ de _____,

Assinatura do (a) pesquisador (a) responsável

