

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

PAULA AUGUSTA DIAS FOGAÇA DE AGUIAR

**CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRAS DE *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS*
E ASPECTOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DA CRIPTOCOCOSE DE
PACIENTES DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DE UBERLÂNDIA**

**UBERLÂNDIA
2016**

PAULA AUGUSTA DIAS FOGAÇA DE AGUIAR

**CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRAS DE *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS*
E ASPECTOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DA CRIPTOCOCOSE DE
PACIENTES DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DE UBERLÂNDIA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Diagnóstico, Tratamento e Prognóstico das Doenças e Agravos à Saúde.

Orientadora: Prof. Dra. Denise Von Dolinger de Brito Röder

Coorientador: Prof. Dr. Reginaldo dos Santos Pedroso

UBERLÂNDIA
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- A282c
2016 Aguiar, Paula Augusta Dias Fogaça de, 1976
Caracterização de amostras de *Cryptococcus neoformans* e aspectos clínicos e epidemiológicos da criptococose de pacientes do Hospital de clínicas de Uberlândia / Paula Augusta Dias Fogaça de Aguiar. - 2016.
89 f. : il.
- Orientadora: Denise Von Dolinger de Brito Röder.
Coorientador: Reginaldo dos Santos Pedroso.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.
Inclui bibliografia.
1. Ciências Médicas - Teses. 2. *Cryptococcus neoformans* - Teses. 3. Criptococose - Teses. I. Röder, Denise Von Dolinger de Brito. II. Pedroso, Reginaldo dos Santos. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

PAULA AUGUSTA DIAS FOGAÇA DE AGUIAR

**CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRAS DE *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS*
E ASPECTOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DA CRIPTOCOCOSE DE
PACIENTES DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DE UBERLÂNDIA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Data da Defesa: 29 de Abril de 2016

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Mário Léon Silva-Vergara (UFTM)

Prof. Dr. Orlando César Mantese (UFU)

Prof. Dra. Denise Von Dolinger de Brito Röder (UFU)

Prof. Dr. Geraldo Batista de Melo (UFU-suplente)



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE



Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia.

Defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico Nº 013/PPCSA

Área de concentração: Ciências da Saúde

Linha de Pesquisa: Infecção Hospitalar

Projeto de vinculação: Epidemiologia das infecções hospitalares.

Discente: **PAULA AUGUSTA DIAS FOGAÇA DE AGUIAR** – Matrícula nº 11412CSD023

Título do Trabalho: **"Caracterização de amostras de *cryptococcus neoformans* e aspectos clínicos e epidemiológicos da criptococose de pacientes do hospital de clínicas de Uberlândia."** Às 14:00 horas do dia 29 de abril do ano de 2016, no anfiteatro do bloco 2H - Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia reuniu-se a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, assim composta: Professores Doutores: Mário León Silva Vergara (UFTM) , Orlando Cesar Mantese (UFU) e Denise Von Dolinger de Brito Röder (UFU) – orientadora da discente. Iniciando os trabalhos, a presidente da mesa Profa. Dra. Denise Von Dolinger de Brito Röder apresentou a Comissão Examinadora e a discente, agradeceu a presença do público e concedeu à discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A seguir a presidente concedeu a palavra aos examinadores que passaram a argüir a candidata. Ultimada a argüição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, em sessão secreta, em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata aprovada. Esta defesa Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU, em especial do artigo 55 da resolução 12/2008 do Conselho de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos às 18:00 horas. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.

Profa. Dra. Denise Von Dolinger de Brito Röder

Prof. Dr. Mário León Silva Vergara

Prof. Dr. Orlando Cesar Mantese

*Dedico este trabalho às minhas filhas
Gabriela e Giovana, que, embora sejam
tão pequeninas, tomam conta de todo o
meu coração.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me conceder o dom da vida e por permitir estar viva.

Ao meu marido Alexandre, amor da minha vida, pelos anos de felicidade, companheirismo, carinho, afeto e apoio diário.

Às minhas filhas, Gabriela e Giovana, minha razão de viver. São elas que me mantêm de pé frente às adversidades; fazem-me valorizar e amar meu trabalho; ter vontade de aprender diariamente. Elas são a minha força e a minha fraqueza. São a minha riqueza.

Aos meus pais, Luiz Américo e Maria Helena, pelo apoio e amor durante toda a minha vida.

À equipe médica dos serviços de alto risco em obstetrícia e de neonatologia do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, por manter a mim e a minha filha Giovana vivas.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Reginaldo dos Santos Pedroso, pesquisador extremamente competente, pela paciência, oportunidade e confiança. Hoje o considero mais que orientador; é um amigo que levarei para o resto da vida em meu coração.

À minha orientadora Prof. Dra. Denise Von Dolinger de Brito Röder, pelo apoio e confiança.

Aos meus irmãos, Patrícia e Júnior, pelo apoio.

Ao Dr. Aécio Sebastião Borges, pelo interesse e incentivo na realização deste trabalho.

Aos amigos dos setores de Micologia e Bacteriologia do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas de Uberlândia (HCU), em especial ao Tomaz de Aquino Moreira, pela cooperação e auxílio na execução desta pesquisa.

À bióloga Érica Bezerra de Melo Riceto, que durante o estágio de Iniciação Científica do curso de Graduação em Biologia da UFU, realizado no Curso Técnico em Análises Clínicas da Escola Técnica de Saúde, auxiliou na etapa do experimento de biologia molecular.

Ao Prof. Dr. Lúcio Borges de Araújo, FAMAT-UFU, pelo auxílio com as análises estatísticas.

Aos pacientes, pela cooperação pelo avanço da ciência.

À Viviane e Gisele, secretárias do programa de pós-graduação, por toda a ajuda nestes dois anos.

Aos Laboratórios de Análises Clínicas do HCU e do Curso Técnico em Análises Clínicas da ESTES, pela cessão do espaço físico e a doação de insumos para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Mario León Silva-Vergara e aos pesquisadores Prof. Dr. Délio José Mora Amador Júnior e Dr. Leonardo Eurípedes de Andrade e Silva, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, UFTM, pelas trocas de experiência e cessão das cepas controle VNI e VGI.

Aos Prof. Dr. Orlando Cesar Mantese, Mário Paulo Amante Penatti e Geraldo Batista de Melo, pelos valiosos conselhos durante a fase de qualificação do mestrado.

À UFU e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, pela oportunidade concedida para a realização de uma pesquisa de qualidade.

“Deus nos concede, a cada dia, uma página de vida nova no livro do tempo. Aquilo que colocarmos nela, corre por nossa conta.”

Chico Xavier

RESUMO

Cryptococcus é um fungo leveduriforme, capsulado, que apresenta a capacidade de infectar e causar doença em uma larga variedade de hospedeiros; é o agente causador da Criptococose, doença sistêmica, subaguda ou crônica, cuja ocorrência antes da epidemia da AIDS era esporádica e geralmente associada a pacientes com baixa imunidade celular. Duas espécies são as principais patogênicas para o homem: *C. neoformans* e *C. gattii*; de modo geral, *C. neoformans* causa doença em indivíduos imunocomprometidos, enquanto a doença manifestada em indivíduos imunocompetentes geralmente tem como agente *C. gattii*. O diagnóstico laboratorial da Criptococose é geralmente realizado através de exames microbiológicos (pesquisa direta e cultura) de diversas amostras clínicas e também através de métodos sorológicos (reação de látex). Técnicas moleculares também podem ser utilizadas, porém ainda apresentam aplicação restrita no diagnóstico clínico. O tratamento é realizado com a Anfotericina B na fase de indução e com o Fluconazol nas fases de consolidação e manutenção. Os objetivos deste estudo foram investigar as características fenotípicas e moleculares, e determinar a sensibilidade antifúngica de amostras de *Cryptococcus neoformans* isoladas de pacientes atendidos no Hospital de Clínicas de Uberlândia, no período de 2004 a 2013; e também analisar as características demográficas dos pacientes. As características fenotípicas foram estudadas através do uso de provas bioquímicas convencionais, como a produção de melanina e urease e a sensibilidade à canavanina; já para as características moleculares, foram utilizadas reações de PCR convencional e pesquisa do gene *URA-5*, através de RFLP-PCR. A susceptibilidade antifúngica foi realizada tanto pela técnica de disco-difusão em ágar quanto pela técnica de diluição em caldo através do sistema VITEK® 2. As características demográficas dos pacientes acometidos pela criptococose foram obtidas através da análise dos prontuários. No período foram armazenadas 41 amostras de *Cryptococcus* identificados como *C. neoformans*. Durante a análise molecular constatou-se que 40 isolados eram *C. neoformans* var. *grubii* (VNI) e uma *C. gattii* (VGI). Todas as amostras eram *mating type* α . Todos os

isolados apresentaram sensibilidade frente aos antifúngicos testados pela metodologia automatizada de microdiluição em caldo (Vitek[®] 2, Biomerieux). Os pacientes acometidos pela Criptococose eram, em sua maioria, homens de 31 a 40 anos, procedentes da zona urbana. A meningoencefalite foi a forma predominante da doença; a maioria era imunodeprimido, sendo a AIDS a doença de base predominante. A maioria deles recebeu tratamento adequado de acordo com os *guidelines* propostos; entretanto, 58% destes pacientes evoluíram para o óbito.

Palavras-chaves: *Cryptococcus* spp.; Criptococose; Genotipagem (URA-5+ RFLP); Teste de sensibilidade antifúngica.

ABSTRACT

Cryptococcus is a yeast-like fungus, capsuled, which has the ability to infect and cause disease in a wide variety of hosts; is the causative agent of cryptococcosis, systemic disease, subacute or chronic, occurring before the AIDS epidemic was sporadic and usually associated with patients with low cellular immunity. Two species are the main pathogenic to humans: *C. neoformans* and *C. gattii*; generally *C. neoformans* cause disease in immunocompromised individuals, manifested as a disease in immunocompetent individuals generally have as *C. gattii* agent. The laboratory diagnosis of cryptococcosis is usually performed by microbiological examinations (direct and culture research) in various clinical specimens and also by serological methods (latex reaction). Molecular techniques may also be used, but still have limited application in clinical diagnostics. Treatment is with amphotericin B in the induction phase and with fluconazole in the phases of consolidation and maintenance. The objectives of this study were to investigate the phenotypic and molecular characteristics and determine the antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* isolated from samples from patients treated at Uberlândia Clinical Hospital in the 2004-2013 period; and also examine the demographic characteristics of the patients. The phenotypic characteristics have been studied through the use of conventional biochemical tests, such as melanin production and urease and sensitivity to canavanine; to have the molecular characteristics, conventional PCR reactions and research have been used in the *URA-5* gene by PCR-RFLP. The antifungal susceptibility was performed either by disk diffusion technique and the dilution technique broth through VITEK[®] 2 system. The demographic characteristics of patients suffering from cryptococcosis were studied by analyzing the records. Between 41 samples were stored *Cryptococcus* identified as *C. neoformans*. During molecular analysis it was found that 40 were *C. neoformans* var. *grubii* (VNI) and one was *C. gattii* (VGI). All strains were *mating type* α . All isolates were susceptible to antifungals front tested by automated method of broth microdilution (Vitek[®] 2, Biomerieux). Patients affected by cryptococcosis were mostly men 31-40 years old, coming from urban areas. The meningoencephalitis was the predominant form of the disease; most were

immunocompromised, AIDS being the predominant underlying disease. Most of them receive appropriate treatment according to the proposed guidelines; however, 58% of patients progressed to death.

Keywords: *Cryptococcus* spp.; Cryptococcosis; Genotyping (URA-5+RFLP); Antifungal susceptibility testing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Células leveduriformes capsuladas.....	22
Figura 2: Cultura de <i>Cryptococcus neoformans</i> em ágar Sabouraud	32
Figura 3: Produção de melanina em ágar L-dopa.....	42
Figura 4: Gel evidenciando qualidade do DNA extraído.....	46
Figura 5: Gel PCR <i>Mating types</i>	49
Figura 6: Gel PCR <i>URA-5</i> (antes da restrição)	50
Figura 7: Gel RFLP-PCR <i>URA-5</i> (VNI e VGI)	50
Figura 8: Gel RFLP-PCR <i>URA-5</i> : Cepas Controles	51

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1: Critérios de interpretação dos halos dos discos de antifúngicos.....	43
Quadro 2: Critérios de interpretação das CIMs dos antifúngicos.....	44
Quadro 3: Evolução dos casos dos pacientes com Criptococose.....	57
Tabela 1: Espécies, sorotipos, variedades e tipos moleculares do complexo <i>Cryptococcus</i> sp.	23
Tabela 2: Espécies atuais e propostas do complexo <i>C. gattii/ C. neoformans</i>	23
Tabela 3: Características das amostras de <i>Cryptococcus</i> sp	52
Tabela 4: Sensibilidade <i>in vitro</i> aos antifúngicos pelas metodologias de disco difusão em ágar e microdiluição em caldo dos isolados de <i>Cryptococcus</i> sp.....	53
Tabela 5: Distribuição por faixa etária e sexo dos pacientes acometidos pela Criptococose atendidos no HCU, 2004-2013.....	54
Tabela 6: Frequência das manifestações clínicas de pacientes com Criptococose.....	55
Tabela 7: Distribuição da infecção por outros micro-organismos isolados dos pacientes com Criptococose durante a internação no HCU, 2004-2013.....	56
Tabela 8: Características dos pacientes com criptococose atendidos no HCU, 2004-2013.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
ASD	Ágar Sabouraud Dextrose
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
ATCC	American Type Culture Collection
Bp	Base pair
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CGB	Canavanina-glicina-azul de bromotimol
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DAI	Doença autoimune
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
dNTP	desoxinucleotídeo fosfato
dATP	desoxiAdenosina Trifosfatada
dCTP	desoxiCitidina Trifosfatada
dGTP	desoxiGuanosina Trifosfatada
dTTP	desoxiTimidina Trifosfatada
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
GACA ₄	Sequências microsatélites
GTG	Sequências microsatélites
GMX	Glucoroxilomananas
HAART	Highly Active Anti-retroviral Therapy
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica

HIV	Human Immunodeficiency Virus
ICCC	The Conference on <i>Cryptococcus</i> and Cryptococcosis
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Kb	Kilopares de bases de nucleotídeos, Kb=103 pares de bases
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LEMP	Leucoencefalopatia Multifocal progressiva
M13	Sequências minissatélites
Mb	Megapares de bases de nucleotídeos, Mb=106 pares de bases
MIC	Minimal Inhibitory Concentration
MRSA	Meticilin Resistent <i>Staphylococcus aureus</i>
MSE	Membro Superior Esquerdo
PBS	Phosphate Buffered Saline
PM	Peso Molecular
PCR	Reação em cadeia da polimerase (Polymerase chain reaction)
RAPD	Random amplification of polymorphic DNA
rDNA	DNA ribossômico
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
RPMI	Meio de cultura desenvolvido no Instituto Roswell Park Memorial
RNA	Ácido ribonucléico
rRNA	RNA ribossômico
SNC	Sistema Nervoso Central
sp	Espécie determinada; representa formas que foram sujeitas a uma classificação ao nível da espécie, mas que por variadas razões não foi possível atribuí-las a nenhuma das espécies conhecidas
spp.	Espécies indeterminadas; o conjunto de formas em estudo comporta representantes de várias espécies que, por alguma

razão, não se considerou necessário explicitá-las

SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TBE	Tris borato EDTA
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
URA5	Gene para produção da enzima oritidina monofosforilase
var.	Variedade
VG	Variedade <i>gattii</i>
VN	Variedade <i>neoformans</i>
v/v	Volume/volume
WHO	World Health Organization

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
dL	Decilitros
G	Gravitacional
M	Molar
µg	Microgramas
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	miliMol
mm	Milímetros
µL	Microlitros
ng	Nanogramas
V	Volt

SUMÁRIO

1- Introdução	21
1.1- Microbiologia e ecologia de <i>Cryptococcus</i> spp.....	21
1.2- Criptococose: aspectos históricos, epidemiologia e patogenicidade do agente, formas clínicas, diagnóstico laboratorial e tratamento.....	25
1.2.1- Aspectos Históricos.....	25
1.2.2- Epidemiologia e Patogenicidade do Agente.....	27
1.2.3- Formas Clínicas.....	29
1.2.4- Diagnóstico Laboratorial.....	31
1.2.5- Tratamento.....	35
2- Justificativa.....	38
3- Objetivos.....	39
3.1- Objetivos gerais.....	39
3.2- Objetivos específicos.....	39
4- Materiais e Métodos.....	40
4.1- Amostra de estudo.....	40
4.2- Identificação dos isolados.....	40

4.3- Caracterização fenotípica dos isolados.....	41
4.4- Determinação da susceptibilidade às drogas antifúngicas.....	42
4.4.1- Técnica de disco-difusão em agar	42
4.4.3- Técnica de microdiluição automatizada pelo sistema Vitek® 2 Compact 60.....	43
4.5- Técnicas moleculares.....	44
4.5.1- Extração de DNA.....	44
4.5.2- Determinação do tipo sexual (<i>Mating type</i>).....	46
4.5.3- Determinação do sorotipo e do genótipo por <i>URA-5-RFLP</i>	47
4.6- Análises Estatísticas.....	48
5- Resultados.....	49
6- Discussão.....	59
7- Conclusão.....	71
8- Referências.....	72
9- Anexos.....	82
9.1- Anexo 1: Aprovação CEP-UFU.....	82
10- Apêndices	87

10.1- Apêndice 1: Ficha de levantamento de dados de prontuários	87
---	----

1- INTRODUÇÃO

1.1 – Microbiologia e ecologia de *Cryptococcus* spp.

Cryptococcus spp. são fungos leveduriformes, capsulados, que podem apresentar a capacidade de infectar e causar doença em uma larga variedade de hospedeiros, incluindo mamíferos, insetos e aves. É agente causador da criptococose, doença sistêmica, subaguda ou crônica, cosmopolita, descrita inicialmente no fim do século XIX, cuja ocorrência antes da epidemia da aids (*acquired immunodeficiency syndrome*) era esporádica e geralmente associada a pacientes com baixa imunidade celular (PAPPALARDO; MELHEM, 2003).

Taxonomicamente, *Cryptococcus* spp. é um eucarioto do reino Fungi, pertence à classe *Tremellomycetes*, família *Tremellaceae*, gênero *Cryptococcus*. Duas espécies são as principais patogênicas para o homem: *C. neoformans* e *C. gattii* (LAZERA; IGREJA; WANKE, 2004). De modo geral, *C. neoformans* é agente da criptococose em indivíduos imunocomprometidos (pacientes com aids ou outras doenças de base que cursam com imunossupressão, pacientes que são submetidos a terapia prolongada drogas imunossupressoras). A doença manifestada em indivíduos imunocompetentes geralmente tem como agente *C. gattii* (BICANIC; HARRISON, 2005; LEVITZ; BOEKHOUT, 2006).

A célula de *Cryptococcus* spp. possui uma forma esférica ou globular característica, com diâmetro aproximado de dois a oito micrômetros e apresenta uma cápsula constituída por mucopolissacarídeos, sendo 90% glucoronoxilomananos (GXM): ácido glucurônico, xilose e manose (Figura 1).

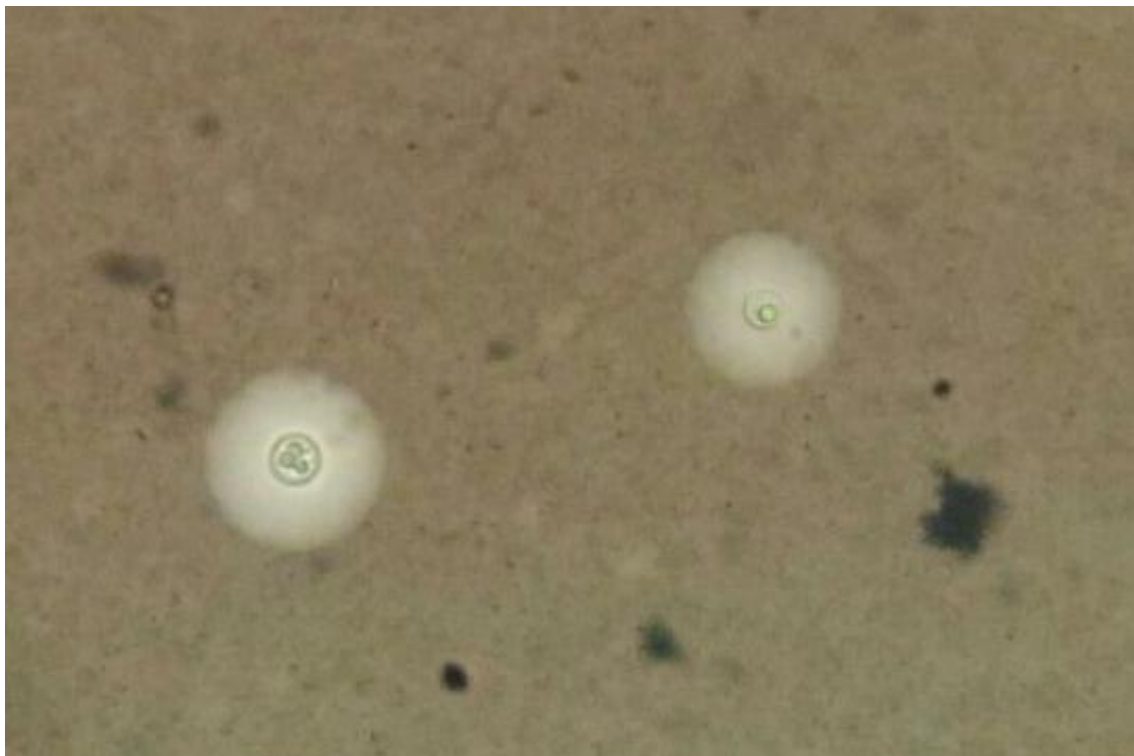


Figura 1: Microscopia evidenciando células leveduriformes; cápsulas visualizadas através da coloração com Tinta da China (Fotografia do Setor de Micologia do Laboratório de Análises Clínicas da UFU, 2016)

As estruturas dos polissacarídeos da cápsula diferenciam os cinco sorotipos de *Cryptococcus*: A, D e AD correspondendo à espécie *C. neoformans* e B e C à espécie *C. gattii*. *C. neoformans* apresenta ainda duas variedades, com correspondência aos sorotipos: var. *grubii* com o sorotipo A e var. *neoformans* com o sorotipo D (DEL POETA; CASADEVALL, 2012; KWON-CHUNG; VARMA, 2006).

A classificação do complexo *Cryptococcus* baseada em estudos sobre a homologia do DNA e da análise de sequências de RNA ribossômico é atualmente a mais aceita pela comunidade científica e encontra-se esquematizada na Tabela 1 (MEYER et al., 2003).

Tabela 1: Correspondência de espécies, sorotipos, variedades e tipos moleculares do complexo *Cryptococcus* sp., conforme Meyer et al. (2003)

Espécies	Sorotipos e Variedades	Tipos Moleculares
<i>C. neoformans</i>	A (var. <i>grubbi</i>)	VN I e VN II
	D (var. <i>neoformans</i>)	VN IV
	AD	VN III
<i>C. gattii</i>	B	
	C	VG I, VG II, VG III e VG IV

Fonte: AGUIAR, 2015

Recentemente, Hagen e colaboradores (2015) propuseram o reconhecimento de sete espécies para o complexo *C. gattii/C. neoformans*, como mostrado na Tabela 2. Entretanto, esta classificação ainda não está completamente aceita pela literatura.

Tabela 2: Espécies atuais e propostas do complexo *C. gattii/C. neoformans*

Espécies atuais	Genotipagem (RFLP)	Espécies propostas
<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	VNI, VNII	<i>Cryptococcus neoformans</i>
<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	VNIV	<i>Cryptococcus deneoformans</i>
<i>C. neoformans</i> híbrido (AD)	VNIII	<i>C. neoformans</i> x <i>C. deneoformans</i> híbrido
	VGI	<i>Cryptococcus gattii</i>
	VGII	<i>Cryptococcus deuterogattii</i>
<i>C. gattii</i>	VGIII	<i>Cryptococcus bacillisporus</i>
	VGIV	<i>Cryptococcus tetragattii</i>
	VGIV/VGIII	<i>Cryptococcus decagattii</i>

Fonte: Adaptado de Hagen et al., 2015

Cryptococcus neoformans e *C. gattii* podem apresentar reprodução sexuada e assexuada no seu ciclo de vida. Na fase assexuada ou anamorfa, as leveduras se apresentam como células haploides, normalmente com envoltório capsular, formato arredondado ou ovalado, sem presença de hifas ou pseudo-hifas

(LACAZ et al., 2002). Durante a reprodução, observam-se brotamentos singulares ou múltiplos, surgindo de qualquer local da parede celular, podendo os blastoconídios resultantes permanecer ligados à célula-mãe por um colo estreito. Isolados de *Cryptococcus* spp. crescidos em meios de cultura clássicos, como ágar Sabouraud, após 48 horas de incubação a temperaturas de 25 a 37°C, geralmente apresentam colônias de coloração creme, aspecto brilhante, textura mucoide e margem lisa (LAZERA et al., 2004). A fase teleomórfica ou sexuada ainda não foi observada na natureza, mas é bem demonstrada em condições de laboratório, sendo designadas de *Filobasidiella neoformans* e *F. bacillispora*, correspondente a *C. neoformans* e *C. gattii*, respectivamente (KWON-CHUNG; BENNET, 1992). Esta fase se caracteriza por apresentar hifas dicarióticas (presença de dois núcleos de origens diferentes) e, para que a reprodução sexuada ocorra, é necessária uma compatibilidade bipolar, ou seja, a existência de alelos opostos no *locus* sexual, *MAT α* e *MATa* (KWON-CHUNG; EDMAN; WICKES, 1992; MITCHELL, 2003; OKABAYASHI et al., 2006). Estes *mating types* ou tipos sexuais apresentam papel importante na epidemiologia e virulência do micro-organismo (ESPOSTO et al., 2004). *C. neoformans* e *C. gattii* podem realizar *mating* intra-variedades (sorotipo A x sorotipo D), assim como inter-espécies (B x D, C x D), mas observa-se que, nestes casos, a viabilidade dos basidiósporos é reduzida, com muitas progênies diploides e aneuploides resultantes desses cruzamentos, indicando, portanto, que a divergência genômica diminui a taxa de meiose (LENGELER; COX; HEITMAN, 2001). O produto do cruzamento entre dois isolados de *mating type* opostos é o basidiósporo (CAMPBELL; CARTER, 2006). Em *C. neoformans* e *C. gattii* o *locus* sexual contém 20 genes. Os isolamentos clínicos e ambientais de *C. neoformans* e de *C. gattii* são, na sua maioria, de *MAT α* (KWON-CHUNG; EDMAN; WICKES, 1992; MITCHELL, 2003; OKABAYASHI et al., 2006).

Cryptococcus neoformans é encontrado em todas as regiões do mundo, sendo que o sorotipo A predomina em isolamentos clínicos e ambientais na maioria das áreas, com exceção em países do Norte Europeu, onde o sorotipo D corresponde a 50% dos isolamentos (CASADEVALL; PERFECT, 1998). Estas diferenças geográficas na prevalência destes sorotipos têm sido relacionadas a

diferenças na tolerância climática e na virulência do microrganismo (HORTA et al., 2005; KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; MARTINEZ; GARCIA-RIVERA; CASADEVALL, 2001). O sorotipo AD foi isolado do ambiente e em pacientes na América do Norte e Europa, com manifestações clínicas similares às descritas para os outros sorotipos (LENGLER; COX; HEITMAN, 2001).

A distribuição geográfica de *C. gattii* também apresenta variação conforme os sorotipos. A ecologia deste agente começou a ser compreendida quando o sorotipo B foi isolado de *Eucalyptus camaldulensis* e *E. tereticornis* na Austrália (ELLIS; PFEIFFER, 1990; PFEIFFER; ELLIS, 1992). Posteriormente, esta levedura foi isolada de insetos, fezes de morcegos, bem como de espécies de árvores em várias regiões do mundo (GEZUELE et al., 1993; LAZERA; WANKE; NISHIKAWA, 1993; LAZERA et al., 2000). O sorotipo C é raramente encontrado, entretanto, foram relatados casos clínicos no Sul da Califórnia e isolamentos ambientais na Colômbia (CALLEJAS et al., 1998). Até o final do século passado acreditava-se que *C. gattii* fosse restrito às áreas tropicais e subtropicais. Porém, um surto ocorrido em Vancouver Island, Canadá, relatado em 2002, mudou o conceito relacionado ao padrão de distribuição desta espécie (KIDD et al., 2004).

1.2 – Criptococose: aspectos históricos, epidemiologia e patogenicidade do agente, formas clínicas, diagnóstico laboratorial e tratamento

1.2.1- Aspectos Históricos

Em 1894, Otto Busse e Abrham Buschke descreveram o primeiro caso de criptococose humana ao relatar o episódio de uma paciente de 31 anos com lesão na tíbia (LAZERA; IGREJA; WANKE, 2004). O microrganismo isolado desta lesão foi identificado como um Blastomiceto e recebeu o nome de *Saccharomyces hominis*. Ainda neste ano, na Itália, Sanfelice isolou leveduras capsuladas em suco de pêssago fermentado, e denominou de *Saccharomyces neoformans*, demonstrando sua patogenicidade através da inoculação em

animais de laboratório (CASADEVALL; PERFECT, 1998). Curtis, em 1896, estudou outro caso de um paciente com lesão tumoral no quadril, e o agente isolado desta lesão foi denominado *Saccharomyces tumefasciens* (LAZERA et al., 2004). Todos esses fungos foram depois identificados como semelhantes à levedura previamente descrita por Sanfelice (LACAZ et al., 2002). Em 1901, Vuillemin demonstrou que o termo *Saccharomyces* era inadequado, pois não havia formação de ascósporos nem fermentação nesses isolados, sugerindo tratar-se de um novo gênero, denominando-o de *Cryptococcus* (LAZERA et al., 2004).

Em 1905, foi descrito o primeiro caso humano de meningoencefalite, em que as lesões eram císticas e gelatinosas, com leveduras em abundância. Sucederam-se outras descrições de meningoencefalites e, em 1923, Stoddard e Cutler, nos EUA, denominaram o agente de *Torula histolytica* e a doença, torulose, desconsiderando toda a literatura europeia sobre o assunto. Já em 1917 a 1927 há publicações sugerindo o emprego da tinta nanquim para a visualização da cápsula do micro-organismo.

No ano de 1935, Benham estudou os isolados classificados como *Saccharomyces*, *Torula* e *Cryptococcus*, por meio de sua morfologia, patogenicidade e reatividade ante a fatores séricos, concluindo que todos pertenciam a um só gênero e espécie. Posteriormente, essa mesma autora propôs a designação *Cryptococcus neoformans*, a qual se tornou definitiva, e a doença denominada criptococose (LAZERA et al., 2004). Evans, em 1949, encontrou diferenças sorológicas entre isolados clínicos de *C. neoformans* e identificou os sorotipos A, B e C. Mais tarde, Vogel (1966) descreveu o sorotipo D em um isolado (KWON-CHUNG e BENNETT, 1992). Já em 1955, Emmons demonstrou a relação saprobiótica de *C. neoformans* com matéria orgânica rica em excretas de aves, principalmente fezes secas de pombos, ninhos e solos contaminados, constituindo habitat natural do fungo. Staib, em 1962, utilizando extrato de fezes de aves em meios de cultura observou que *C. neoformans* produzia colônias de coloração marrom com produção de melanina que, provavelmente, ocorria devido à presença das sementes de *Guizotia abyssinica* que estes pássaros utilizavam em sua alimentação (KWON-CHUNG;

BENNETT, 1992). O extrato desta semente acrescido ao ágar é utilizado como meio seletivo e denominado *niger-seed-agar* (ágar níger), o que possibilitou a maioria dos estudos ambientais em diferentes locais (LAZERA et al., 1996).

O ciclo de vida completo de *C. neoformans* foi descrito por Kwon-Chung em 1975. Esta autora observou que o fungo apresentava dois *mating types*, α e *a*, e que quando cruzados reproduziam a fase teleomorfa basidiomicética; nesta fase o fungo foi classificado como sendo pertencente ao gênero *Filobasidiella* (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992). A partir deste estudo, foram descritas duas espécies: *Filobasidiella neoformans* (correspondente a *C. neoformans*) e *Fillobasidiella bacillispora* (correspondente a *C. gattii*), porém diante do cruzamento sexuado entre as duas espécies propostas levando a produção de uma progênie fértil, *C. neoformans* foi reduzido a uma só espécie e duas variedades: *C. neoformans* var. *neoformans* e *C. neoformans* var. *gattii*.

A descoberta do ciclo sexuado possibilitou a aplicação de estudos genéticos, que tiveram seu início na década de 80 e que propiciaram a revisão taxonômica do agente; em 2002, Kwon-Chung et al., analisando os isolados de *Cryptococcus* tanto clínicos quanto ambientais, propuseram novamente a divisão em duas espécies *C. neoformans* e *C. gattii*.

No Brasil, os primeiros casos de criptococose foram relatados por Lacaz e colaboradores, em 1941 e 1944 (PAPPALARDO; MELHEM, 2003).

1.2.2- Epidemiologia e Patogenicidade do Agente

A criptococose é uma infecção subaguda ou crônica que pode envolver os pulmões, a pele e outros sítios anatômicos, mas tem predileção pelo cérebro e meninges; é fatal em aproximadamente 20% dos casos, mesmo o paciente recebendo terapia antifúngica adequada (DESNOS-OLLIVIER et al., 2010). A doença causada por *C. neoformans* ocorre com maior frequência em pacientes imunocomprometidos, como aqueles com aids, transplantados ou portadores de doença de base como neoplasias, diabetes e hemopatia grave. A meningoencefalite criptocócica é diagnosticada em aproximadamente 1 milhão

de pacientes ao ano, acarretando mais de 600.000 mortes anualmente (PARK et al., 2009).

No Brasil, ocorre como a primeira manifestação oportunista em 4,4% dos pacientes com aids (CONSENSO, 2008), predominando nas regiões sul, sudeste e centro-oeste do país, sendo considerada uma das suas doenças definidoras. A história natural da doença fúngica em geral está diretamente relacionada com a suscetibilidade do hospedeiro, pois é esta que geralmente determina a gravidade da infecção. A via de entrada no hospedeiro se dá pela inalação de propágulos do micro-organismo, que se depositam no alvéolo pulmonar. A disseminação pode ocorrer para outros sítios, provavelmente por via hematogênica, com especial tropismo para cérebro e meninges (DEL POETA; CHATUVERDI, 2012).

A patogênese do *C. neoformans* é determinada por três fatores: as defesas do hospedeiro, a virulência do micro-organismo e o tamanho do inóculo. Considerando a grande exposição humana, devido à ubiquidade deste fungo na natureza e à facilidade de inalação de esporos, pode-se comprovar que o fator defesa do hospedeiro é determinante, uma vez que é baixa a prevalência de infecção sintomática na população em geral (PAPPALARDO; MELHEM, 2003).

De modo geral, o primeiro aspecto microbiológico importante para a patogenicidade de *Cryptococcus* spp. parece ser a aderência à superfície do hospedeiro, seguida pela colonização do tecido. *C. neoformans* é um patógeno intracelular facultativo, portanto, capaz de sobreviver em macrófagos e permanecer na vesícula ácida fagossômica, mantendo sua capacidade de multiplicação. Essa permanência intracelular parece ser um elemento importante na persistência da infecção, disseminação por via hematogênica e estabelecimento no sistema nervoso central. O mecanismo pelo qual *C. neoformans* evita a morte depois da ingestão por fagócitos permanece pouco compreendido, mas há evidências de que a sobrevivência intracelular pode ser dada pela produção de pigmentos melanoides (CASADEVALL, 2000; SANTANGELO et al., 2004).

Os fatores de virulência do fungo parecem ter grande importância na invasão tecidual, manutenção, multiplicação e disseminação do micro-organismo, e também na gravidade da doença (CASADEVALL, 2000; SALLAS et al., 1996; SANTANGELO et al., 2004; OLSZEWSKI et al., 2004). A entrada da levedura no sistema nervoso central pode ocorrer através do cruzamento direto dos pequenos capilares da barreira hematoencefálica. Este cruzamento pode ocorrer também por extravasamento direto ou o micro-organismo pode cruzar essas barreiras no interior de fagócitos mononucleares, o que alguns pesquisadores têm chamado de cavalo de troia. É possível que diferentes rotas levem a levedura ao sistema nervoso central, e em cada caso, diferentes fatores de virulência do micro-organismo estejam envolvidos (BARLUZZI et al., 2000; CASADEVALL, 2000; CHRETIEN et al., 2002; LEE; DICKSON; CASADEVALL, 1996; OLSZEWSKI et al., 2004; SALAS et al., 1996). Outro mecanismo emergente de virulência que parece contribuir para a persistência da infecção é a plasticidade fenotípica (*phenotypic switching*), que promove a geração de mutantes que escapam do sistema imune, e que foi descrito para os sorotipos A, B e D. A plasticidade fenotípica é observada *in vitro* pela presença de variantes de colônias, que mudam de lisas e mucoides a secas e enrugadas (GUERREIRO et al., 2010; MARTINEZ et al., 2008).

1.2.3- Formas Clínicas

A apresentação clínica depende do *status* imunológico do hospedeiro; a maioria dos pacientes com aids desenvolve a forma disseminada da doença enquanto os demais desenvolvem a forma pulmonar (HOANG et al., 2004).

A infecção pulmonar pode ser assintomática ou sintomática, dependendo da resposta imune do hospedeiro, do tamanho do inóculo e virulência do micro-organismo, 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 pode se manifestar como pneumonia, com

possibilidade de evoluir para insuficiência respiratória aguda. A forma pulmonar é a segunda mais frequente e acomete cerca de 40% dos pacientes HIV negativos (PERFECT; CASADEVALL, 2002). Na pneumopatia observa-se febre, tosse, emagrecimento, dor no peito e expectoração (SEVERO; GAZZONI; SEVERO, 2009).

Pode haver disseminação pela 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; PERFECT; CASADEVALL, 2002).

A principal e mais grave manifestação clínica da criptococose é a meningoencefalite, que geralmente ocorre em indivíduos imunocomprometidos e é potencialmente fatal (DESNOS-OLLIVIER, 2010). Os sintomas são variados; o paciente pode apresentar cefaleia, febre, letargia, perda de memória, mal estar, papiledema. As complicações podem ser comuns e incluem o aumento da pressão intracraniana, perda visual ou auditiva e menos frequente, a diminuição cognitiva e ataxia em função da hidrocefalia (SLOAN; PARRIS, 2014).

A criptococose ocular é rara e varia de paralisias oculares a envolvimento da retina. Em sua maioria decorre de manifestações da doença disseminada ou do sistema nervoso central. De acordo com alguns pesquisadores, a próstata pode ser um reservatório do fungo que pode contribuir para o aumento de casos de recidiva e ainda desenvolver prostatite criptococócica (CHANG et al., 2008; MITCHELL; PERFECT, 1995; PERFECT; CASADEVALL, 2002).

A infecção cutânea secundária pode funcionar como um marcador da disseminação da doença e apresentar manifestações na pele como pápulas, púrpuras, vesículas, nódulos, tumores, abscessos, úlceras, granulomas superficiais ou placas infiltradas (CONSENSO, 2008).

1.2.4- Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico laboratorial da criptococose pode ser feito a partir de uma grande variedade de materiais clínicos: LCR (líquido cefalorraquidiano ou líquor), urina, fragmentos de tecido, aspirados de lesões cutâneas, escarro e demais amostras do trato respiratório, entre outras. São realizados exame direto, cultura, histologia e sorologia. Técnicas moleculares também podem ser utilizadas, porém ainda apresentam aplicação restrita no diagnóstico clínico (MITCHELL; PERFECT, 1995; PEDROSO et al., 2009).

O exame direto revela leveduras arredondadas ou ovais, geralmente apresentando brotamento único, envoltas por cápsula polissacarídica, que é evidente quando analisadas em preparações com tinta da China ou nigrosina (LACAZ et al. 2002). As amostras de escarro e outras purulentas podem ser tratadas com KOH a 10% a fim de eliminar a maioria das células do hospedeiro e outros artefatos que poderiam ser confundidos com *C. neoformans* (PEDROSO; CANDIDO, 2006). O líquor e a urina devem ser centrifugados e o sedimento examinado através da utilização de tinta da China. Amostras recentes são preferidas, pois a presença de polimorfonucleares em amostras estocadas por 24 horas em refrigeradores podem mimetizar a presença de cápsula, confundindo o analista menos experiente (LAZERA; IGREJA; WANKE, 2004).

A cultura é considerada o método padrão ouro (PAPPALARDO; MELHEM, 2003) e apresenta positividade no líquor de 89,0% a 100,0% (CONSENSO, 2008). Para a realização da cultura, as amostras clínicas são semeadas em ágar Sabouraud e em outro meio diferencial que pode ser ágar níger, alpiste ou girassol, ágar dopamina, ágar L-dopa ou ágar batata cenoura (LAZERA; IGREJA; WANKE, 2004). As amostras de escarro, pus, urina e raspados de pele devem ser inoculadas em meios contendo antimicrobianos, mas sem cicloheximida, pois a maioria dos isolados de *C. neoformans* é sensível a este antifúngico (PEDROSO; CANDIDO, 2006). *C. neoformans* cresce bem a 37°C, e as colônias tornam-se visíveis em dois a três dias. Já *C. gattii* tem dificuldade em crescer a 37°C, e leva de quatro a cinco dias para formar colônias visíveis.

Por outro lado, a 30°C, ambas as espécies formam colônias em dois dias. O aspecto macroscópico das colônias, em ágar Sabouraud, incubado a 25 ou 30°C, em dois a quatro dias, são brilhantes, tipicamente brancas ou beges; entretanto podem ser amarelas, rosas ou marrons (LACAZ, 2002). Se o organismo for capsulado, as colônias apresentam-se mucoides e brilhantes, tomando o aspecto de “leite condensado” (Figura 2).

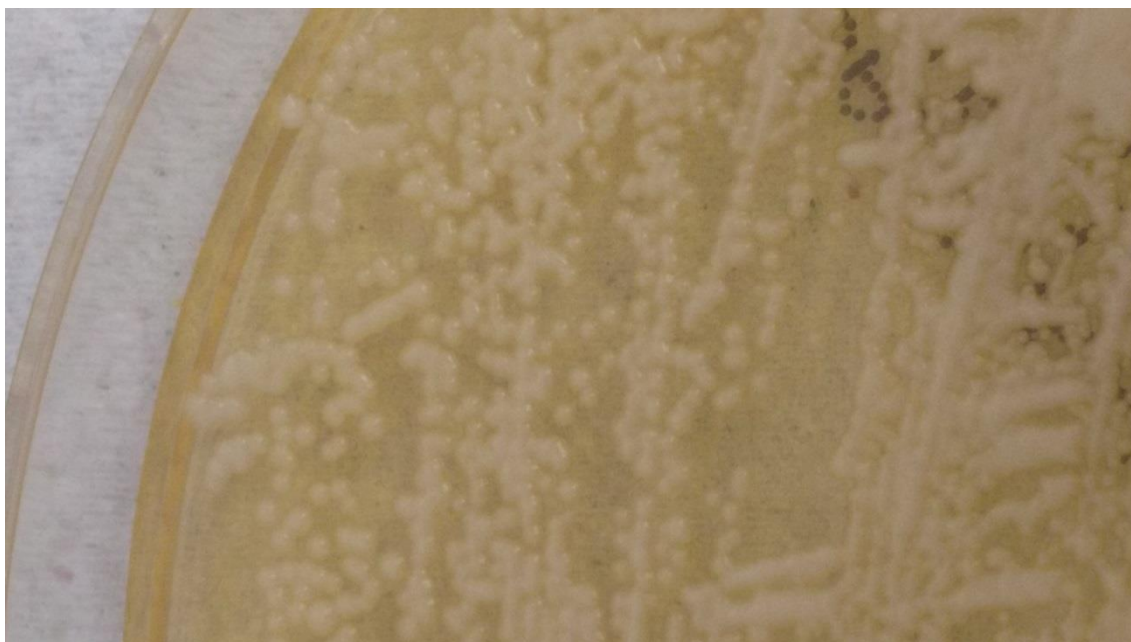


Figura 2: Colônias de *Cryptococcus neoformans* em placa de ágar Sabouraud (Fotografia do Setor de Micologia do Laboratório de Análises Clínicas da UFU, 2016)

As colônias, no entanto, podem tornar-se secas e opacas com o tempo. A morfologia microscópica revela leveduras arredondadas ou ovais, isoladas ou aos pares, de paredes finas e de tamanhos variados, não ocorrendo pseudo-hifas e hifas verdadeiras. O brotamento pode ser simples ou duplo, com pontos de ligação estreitos entre as células-mãe e filha. As células são, usualmente, envoltas por cápsulas, que variam em espessura. A diferenciação entre as duas espécies é feita explorando algumas diferenças bioquímicas. *C. gattii* assimila ácido málico, fumárico e succínico, utiliza glicina como fonte de carbono, enquanto *C. neoformans* não apresenta essas características. *C. neoformans* é também sensível a concentrações superiores a 1,6 µg/mL de ciclo-heximida. A capacidade de *C. gattii* utilizar a glicina e crescer na presença de L-canavanina é frequentemente utilizada na diferenciação destas espécies no laboratório de micologia, em que é utilizado o meio CGB (canavanina-glicina-azul de

bromotimol). *C. neoformans* não metaboliza a glicina e é inibido pela L-canavanina, permanecendo o meio inerte, enquanto o crescimento de *C. gattii* leva à mudança do pH do meio, e à alteração da cor verde para azul (CASADEVALL; PERFECT, 1998).

O teste sorológico para o diagnóstico da criptococose é sensível, específico, e permite um diagnóstico rápido e seguro. Durante a infecção, antígenos capsulares polissacarídicos solúveis são encontrados em fluidos corporais, e podem ser detectados e quantificados com antissoro específico. O método mais comum empregado para triagem ou titulação do soro é a aglutinação de látex. As partículas de látex, recobertas com imunoglobulinas hiperimunes específicas de coelho, são misturadas com diluições da amostra do paciente, que pode ser LCR, soro ou urina. Aglutinação positiva em uma diluição de 1:4 é altamente sugestiva de infecção criptocócica. Títulos maiores ou iguais a 1:8 geralmente indicam doença ativa. A maioria dos pacientes com AIDS tem altos títulos do antígeno (MITCHELL; PERFECT, 1995). Alguns testes de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) foram desenvolvidos para detectar antígeno ou anticorpo contra *C. neoformans*, 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 (CONSENSO, 2008). Atualmente, a OMS preconiza o uso da pesquisa do antígeno do *Cryptococcus* (CrAG) por imunocromatografia como método de rastreamento da doença em pacientes com aids que possuem contagem de linfócitos T CD4 inferior a 100 células/mm³ (WHO, 2011).

O exame histopatológico pode apresentar-se com dois padrões, gelatinoso ou granulomatoso. O padrão gelatinoso caracteriza-se por pouco ou nenhuma reação inflamatória e grande quantidade de fungos com cápsula volumosa. O padrão granulomatoso caracteriza-se pela presença de granulomas epitelioides, células gigantes, linfócitos e proliferação linfoblástica. O infiltrado inflamatório é fundamentalmente constituído por macrófagos. A quantidade de parasitas é sensivelmente menor que nas gelatinosas. As colorações úteis para a visualização do fungo são H.E. (hematoxilina e eosina), Mucicarmim, PAS

(Periodic Acid-Schiff), Alcian Blue. Mucicarmim cora as células de vermelho e Fontana- Masson cora a melanina fúngica de marrom avermelhado, e são mais específicas para *C. neoformans* (LAZER; IGREJA; WANKE, 2004).

Os métodos de identificação moleculares são mais recentes e são úteis em estudos epidemiológicos, para a identificação da variedade, do sorotipo e variações individuais de cepas. Paschoal et al., em 2004, aperfeiçoaram a técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), com o objetivo de aplicação no diagnóstico em laboratório clínico, sendo que a técnica demonstrou níveis de sensibilidade e especificidade superiores à cultura e ao exame direto pela tinta da China. Estes autores concluíram que o método de PCR, sendo sensível, específico, e reprodutível, representa uma ferramenta promissora para análise de amostras de líquido em pacientes com suspeita clínica de meningoencefalite, podendo ainda ser utilizado como teste de identificação de *Cryptococcus* spp. (PASCHOAL et al., 2004).

As diferenças genéticas entre as duas espécies e entre diferentes isolados, tanto clínicos quanto ambientais, têm sido mostradas por métodos de tipagem molecular, como RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), Multilocus sequence typing (MLST) e PCR-*Fingerprinting*. As técnicas baseadas em PCR vêm se tornando alternativas eficientes, mostrando-se mais sensíveis, específicas e rápidas, sofrendo menos influência de fatores externos do que os métodos tradicionais fenotípicos, e são ferramentas importantes no estudo da epidemiologia de isolados de espécies de *Cryptococcus* em nível mundial (MEYER et al. 1993; 2003; MORA et al., 2010; TRILLES et al., 2008). A tipagem molecular foi originalmente realizada utilizando experimentos de hibridização de DNA-*fingerprinting* clássicos para detectar sequências de DNA (Deoxyribonucleic Acid) minissatélites e microssatélites. Posteriormente, os oligonucleotídeos utilizados foram os *primers* únicos em PCR para detectar fragmentos de DNA hipervariáveis no genoma de *C. neoformans* e espécies relacionadas. Os mais utilizados são iniciadores que detectam sequências minissatélites, como a sequência do core do fago M13, e sequências microssatélites, como (GTG)₅, e (GACA)₄. Os perfis

eletroforéticos resultantes da amplificação com estes *primers* são altamente reprodutíveis e mostram variações entre espécies, variedades e intra-espécies (MEYER et al. 1993; 2003; MORA et al., 2010). Segundo a International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM), o MLST poderia ser o método de escolha para a tipagem das espécies de *Cryptococcus*, dado seu alto poder discriminatório e boa reprodutibilidade entre os laboratórios (MEYER et al., 2009).

A técnica de RFLP-PCR tem sido utilizada na tipagem molecular, apresentando boa reprodutibilidade. A aplicação destas técnicas, especialmente DNA *fingerprinting*, RFLP e AFLP, permitiu agrupar os isolados de *C. neoformans* e de *C. gattii* em oito tipos moleculares, sendo quatro correspondentes a *C. neoformans*, VN I (var. *grubii*, sorotipo A), VN II (var. *grubii*, sorotipo A), VN III (sorotipo AD), VN IV (var. *neoformans*, sorotipo D); e outros quatro correspondem a *C. gattii*, VG I, VG II, VG III, e VG IV (*C. gattii*, sorotipos B e C), que não apresentam correspondência entre sorotipo e tipo molecular. Os genótipos VN I e VG I predominam no mundo todo, enquanto que em pacientes com AIDS, a maioria dos isolados são VN I e VN IV (MEYER et al., 2003).

1.2.5- Tratamento

O tratamento da criptococose tem sido alvo de inúmeros estudos atualmente e somente três classes de drogas antifúngicas têm sido consideradas para este fim: os poliênicos (anfotericina B), os azóis (cetoconazol, itraconazol, fluconazol e voriconazol) e o derivado pirimidínico (5-flucitosina) (SLOAN; PARRIS, 2014). No Brasil, entretanto, não está disponível a 5-flucitosina (SEVERO; GAZZONI; SEVERO, 2009). Algumas destas drogas administradas no tratamento de infecções fúngicas apresentam altas taxas de falha e a emergência de resistência fúngica intrínseca é um problema crescente (DENNING, 2003).

Existe uma diversidade de alvos para agentes antifúngicos. Contudo, em termos de números de classes de agentes que podem ser usados para o

tratamento de micoses, os alvos estão focados direta ou indiretamente no envelope celular (parede ou membrana plasmática) e, particularmente, no esterol da membrana fúngica, o ergosterol, e na sua biossíntese. A anfotericina-B deoxicolato tem sido considerada o padrão ouro para o tratamento das infecções fúngicas mais graves. O desenvolvimento de novas formulações de anfotericina-B, as quais usam lipossomas ou complexos lipídicos como sistema de liberação e a introdução dos compostos azólicos, depois de 1980 e antes de 1990, representaram um avanço importante no tratamento de infecções fúngicas, devido aos seus perfis de segurança favoráveis e farmacocinética. A introdução destes novos agentes antifúngicos, e também das novas formulações de anfotericina B, permitiu um método mais agressivo para a profilaxia e tratamento de infecções fúngicas no passar das décadas, levando à preocupação com a emergência de microrganismos resistentes (MOREIRA et al., 2006).

A meningite criptocócica geralmente é tratada inicialmente com anfotericina B associada a um derivado imidazólico, em especial o fluconazol (fase de indução), seguida das fases de manutenção e consolidação com fluconazol por período indefinido, já que este triazol possui excelente atividade antifúngica e atinge boa concentração no sistema nervoso central (PERFECT et al., 2010). De acordo com Saag et al. (2000), nos Estados Unidos, este esquema terapêutico foi capaz de reduzir a mortalidade em pacientes com aids de 14 a 25 % para 6 % (PAPPALARDO; MELHEM, 2003). Para o tratamento das formas pulmonares (progressiva e disseminada) tanto em pacientes imunocompetentes como em imunossuprimidos, existe indicação de tratamento com antifúngico específico. Para formas exclusivamente pulmonares, pode-se utilizar itraconazol por seis meses ou mais, de acordo com a evolução da doença (LAZÉRA et al., 2004).

O repetido e prolongado uso de azóis em tratamentos de pacientes HIV (Human Immunodeficiency Virus) positivos com infecções fúngicas de mucosas no período precedente à introdução da terapia antirretroviral altamente ativa (no inglês HAART, *Highly Active Anti-retroviral Therapy*), favoreceu a aquisição

de resistência *in vitro* a essas drogas em diversos patógenos fúngicos, incluindo *C. neoformans* (BRANDT et al., 2001).

Dessa forma, alguns pesquisadores sugerem a manutenção de isolados clínicos no laboratório, especialmente o isolado primário, para que em estudos futuros possa ser monitorada a aquisição de resistência *in vitro* em casos de não resposta ao tratamento ou reincidência.

2- JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos têm aumentado a frequência de infecções fúngicas graves, especialmente por fungos oportunistas, como resultado do avanço na terapia médica, transplantes de órgãos, crescimento da população geriátrica, e condições imunossupressoras, como infecções pelo HIV (XIE et al., 2012). Dentre os fungos, os do complexo *C. neoformans* são importantes patógenos, especialmente para os indivíduos que desenvolvem AIDS.

A criptococose é uma doença presente, que nos anos de 1980 despontou como emergente, e que na atualidade é menos frequente, principalmente porque a população de maior risco, indivíduos com AIDS, tem tido maior sucesso no controle do estado de imunodepressão, devido à HAART. Entretanto, a taxa de mortalidade e morbidade é alta, de forma que o diagnóstico realizado o quanto antes pode possibilitar um prognóstico mais favorável. Ainda, a complexidade biológica dos agentes, e a necessidade de vigilância epidemiológica do perfil fenotípico, genotípico e de sensibilidade aos antifúngicos dos isolados clínicos, revelam a importância dos estudos dos isolados de *Cryptococcus* spp. sob o ponto de vista clínico, epidemiológico e laboratorial.

Por outro lado, estudos que buscam caracterizar os isolados clínicos destas espécies são importantes sob o ponto de vista epidemiológico e microbiológico, pois permitem entender a biologia do agente, e relacionar as características fenotípicas e/ou moleculares com os fatores envolvidos na virulência do agente, como a correlação entre genótipo e o desfecho da infecção.

Desta forma, este estudo possibilitará o registro do perfil dos isolados clínicos de *C. neoformans* a nível fenotípico e molecular, e, ainda, a análise *in vitro* da susceptibilidade aos antifúngicos, que não são conhecidos na população proposta para o presente estudo. Além disto, possibilitará a avaliação das características epidemiológicas da Criptococose em nossa região, através da análise dos prontuários dos pacientes atendidos no Hospital de Clínicas de Uberlândia no período proposto para o estudo.

3- OBJETIVOS

3.1- Objetivo geral

Investigar as características fenotípicas e moleculares e determinar a susceptibilidade antifúngica de amostras de *Cryptococcus neoformans* isolados de pacientes atendidos no Hospital de Clínicas de Uberlândia, no período de 2004 a 2013.

3.2- Objetivos específicos

3.2.1) Caracterizar a ocorrência de isolados de *Cryptococcus neoformans* de acordo com os sítios de isolamento.

3.2.2) Determinar o genótipo (tipo molecular) e *mating type* dos isolados, por métodos moleculares.

3.2.3) Determinar a susceptibilidade aos antifúngicos fluconazol, itraconazol, voriconazol, anfotericina B e 5-fluocitosina.

3.2.4) Caracterizar a ocorrência e a frequência do fenótipo *switching* (plasticidade fenotípica) entre os isolados e, daqueles que apresentarem a plasticidade, correlacionar com o perfil de sensibilidade aos antifúngicos.

3.2.5) Analisar as características demográficas e clínicas dos pacientes acometidos por criptococose, cujos isolados foram incluídos no estudo.

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 – Amostra de estudo e casuística

Foram incluídas no estudo 41 amostras de *Cryptococcus neoformans* isoladas de pacientes com criptococose e mantidas no Laboratório de Micologia Clínica do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas de Uberlândia, no período de 2004 a 2013, a partir de amostras biológicas como LCR, sangue, lavado brônquico e secreção de lesão cutânea. Os isolados de *Cryptococcus* foram mantidos em ágar Sabouraud dextrose (ASD), à temperatura ambiente, com transferências trimestrais para outros tubos contendo ASD com cloranfenicol.

Os prontuários dos pacientes foram avaliados, coletando dados como idade, sexo, procedência, quadro clínico, sintomas no momento do diagnóstico, sítio da infecção, exames utilizados para o diagnóstico, estado imunológico, doença de base, dias de internação, relacionando as drogas utilizadas para tratamento, contagem de CD4 e CD8, desfecho clínico, e características fenotípicas e moleculares do agente etiológico (Apêndice 1).

O estudo foi executado conforme autorização das unidades da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) envolvidas: Hospital de Clínicas, Laboratório de Análises Clínicas e Curso Técnico em Análises Clínicas da Escola Técnica de Saúde, com a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFU (CEP-UFU) sob o número 357.803 em 13/08/2013 (Anexo 1).

4.2 – Identificação dos isolados

Os isolados foram recuperados já com a identificação realizada no momento do diagnóstico. No presente estudo, os testes para identificação das leveduras foram realizados novamente para confirmação, tais como: microcultivo, análise microscópica, pesquisa de cápsula com tinta nanquim, e testes bioquímicos e fisiológicos clássicos, como atividade de urease, produção

de melanina em ágar níger e crescimento no meio CGB (LACAZ, 2002) a partir de inóculos recentes em ágar Sabouraud, incubados a 30°C, durante 24-48 horas.

4.3 – Caracterização fenotípica dos isolados

4.3.1 – Plasticidade fenotípica

O fenótipo da colônia (plasticidade fenotípica ou *phenotypical switching*) foi determinado pela semeadura de uma suspensão de leveduras em solução fisiológica esterilizada, com turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de MacFarland, na superfície de ágar Sabouraud contido em placas de Petri 90x15mm, e incubação a 30°C, durante 7 dias. As colônias foram examinadas quanto ao tamanho, diâmetro, textura e forma (FRANZOT et al., 1998).

4.3.2 – Produção de melanina

Para a avaliação da produção de melanina, foi preparada uma suspensão como descrita anteriormente. A seguir, com auxílio de alça calibrada descartável esterilizada de 1 µL, foi semeada pela técnica de esgotamento sobre a superfície de ágar L-dopa (Aldrich®), contido em placas de Petri. As placas foram protegidas da luz com papel alumínio, incubadas a 30°C por cinco dias (PEDROSO et al., 2010). A produção de melanina foi evidenciada pela coloração das colônias (figura 3). Os isolados com iguais intensidades de pigmentação foram agrupados, recebendo a classificação conforme o escore de cores apresentadas: 0 (ausência de pigmento), 1 (marrom claro), 2 (marrom), 3 (marrom escuro) e 4 (preta). *C. neoformans* ATCC 90112 foi utilizado como controle positivo (escore 3), e *C. albicans* ATCC 90028, como controle negativo (escore 0).

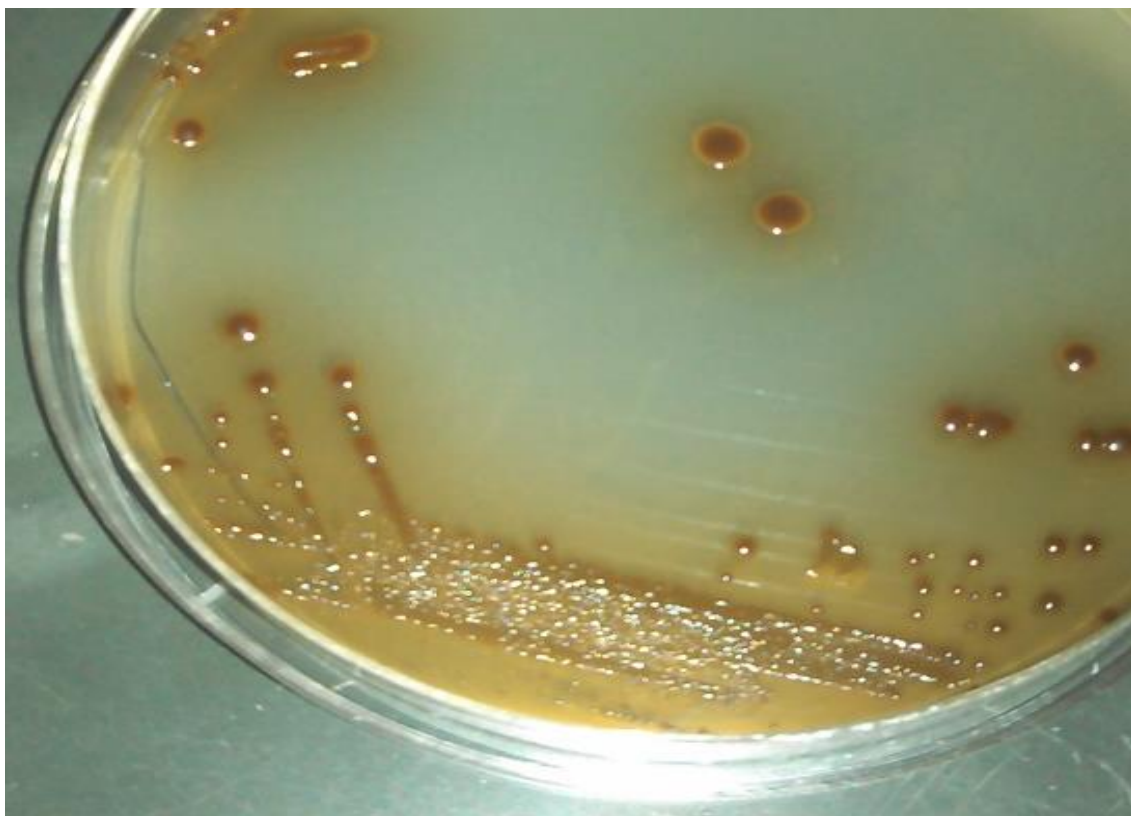


Figura 3: Produção de melanina em placa de ágar L-dopa correspondente ao escore 3 (Fotografia do Laboratório da ESTES da UFU, 2015)

4.4 – Determinação da susceptibilidade às drogas antifúngicas

A determinação da susceptibilidade foi feita por dois métodos. Pelo teste da difusão de disco em ágar, conforme recomendado pelo documento M44-A2 do CLSI (2009), e pela metodologia de microdiluição em caldo, realizado com o sistema comercial Vitek[®] 2 (BioMérieux, Paris, France).

4.4.1 – Técnica de disco difusão em ágar

Os discos contendo os antifúngicos fluconazol (25 µg, Cecon, São Paulo, SP, Brasil), itraconazol (10 µg, Cecon, São Paulo, SP, Brasil), voriconazol (1 µg, Bioscan, Itu, SP, Brasil) e anfotericina B (100 µg, Bioscan, Itu, SP, Brasil) foram distribuídos de forma equidistante em placas de Petri (90 mm de diâmetro), contendo ágar Mueller-Hinton modificado (suplementado com 2% de glicose e 0,5 µg/mL de azul de metileno). Foram utilizadas as cepas controle *C. albicans*

ATCC 90028 e *C. parapsilosis* ATCC 22019, para validação dos resultados.

Cada isolado de *Cryptococcus* spp. foi subcultivado em placas de ágar Sabouraud dextrose, incubadas à temperatura de 35-37°C por 24-48 horas. Aproximadamente cinco colônias de cada isolado foram coletadas e suspendidas em 5 mL de salina esterilizada (0,85%). A turbidez da suspensão foi ajustada de acordo com a escala 0,5 de McFarland (10^6 UFC/mL), por comparação visual. A suspensão de leveduras foi inoculada com *swab* esterilizado sobre a superfície do ágar Mueller-Hinton modificado. Após 15 minutos, os discos foram depositados assepticamente sobre a superfície do ágar inoculado, e a placa invertida foi incubada aerobicamente à temperatura de 35°C, com leituras em 24 h, e releitura em 48 horas, caso o crescimento estivesse escasso em 24 h. O diâmetro da zona de inibição foi mensurado para a interpretação da sensibilidade ou resistência, conforme sugestão do fabricante e descrito no documento M44-A2 (2009) (Quadro 1).

Quadro 1– Critérios de interpretação dos halos dos discos de antifúngicos

Antifúngico	Sensível (mm)	Intermediário (mm)	Resistente (mm)	Referência
Itraconazol 10 µg	≥ 20	12-19	≤ 11	Cecon, 2011
Fluconazol 25 µg	≥ 19	15-18	≤ 14	CLSI, 2009
Voriconazol 1 µg	≥ 17	14-16	≤ 13	CLSI, 2009
Anfotericina B 100 µg	≥ 10	-	≤ 10	Cecon, 2011

4.4.2 – Técnica de microdiluição pelo sistema Comercial Vitek® 2 Compact 60

O teste de sensibilidade com o sistema Vitek® 2 Compact 60 (Ref. 27660) foi feito de acordo com as instruções do fabricante. A suspensão de inóculo foi preparada a partir de culturas em ASD, incubadas durante 48 horas a 35°C, com turbidez ajustada ao tubo 2 da escala de McFarland. Esta suspensão foi transferida para os cassetes do sistema do cartão do teste de

sensibilidade (AST-YS01, Ref.22108). As concentrações das drogas nos cassetes variam de 1 a 32 µg/mL, para Anfotericina B, de 1 a 16 µg/mL para Fluconazol, de 4 a 64 µg/mL para 5-flucitosina (5FC) e de 0,5 a 8 µg/mL para Voriconazol. Os cassetes foram inseridos no aparelho Vitek[®] 2 e as CIM foram determinadas por espectrofotometria, tendo seus resultados expressos em µg/mL. Foi utilizada a cepa controle *C. albicans* ATCC 90028 para validação dos resultados. Para a interpretação da sensibilidade ou resistência foram utilizados os valores descritos no documento M44-S3 (2009) e na bula do kit (Quadro 2).

Quadro 2- Critérios de interpretação das CIMs dos antifúngicos

Antifúngico	Sensível (µg/mL)	Resistente (µg/mL)	Referência
5FC	≤ 1,0	≥ 64	CLSI, 2009
Fluconazol	≤ 1,0	≥ 64	CLSI, 2009
Voriconazol	≤ 0,12	≥ 8,0	CLSI, 2009
Anfotericina B	≤ 0,25	≥ 16	CLSI, 2009

4.5- Técnicas moleculares

4.5.1 – Extração do DNA (adaptado de Bolano et al., 2001)

A partir de uma cultura das leveduras em estudo, incubadas 72 horas em ASD, foram colhidas duas colônias e transferidas para um tubo tipo *ependorf* contendo 1 mL de tampão de extração (200 mM de Tris-HCl, 250 mM de NaCl, 25 mM de EDTA, 10% de SDS), acrescentado a proporção 1:2 (v/v) de *glassbeads*, de diâmetro de 2 mm. A seguir, o tubo foi submetido à agitação em *vortex* por 4 minutos. Da suspensão resultante, 500 µL foram transferidos para tubo de *ependorf* de 2 mL e adicionado de 500 µL de mistura fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1), homogeneizado cuidadosamente por 10 segundos, manualmente. A emulsão formada foi centrifugada a 18.000 g por 15 minutos. A fase superior foi transferida para outro tubo *ependorf* de 1,5 mL,

acrescida de isopropanol absoluto gelado (4°C) na proporção de 1:1, homogeneizado cuidadosamente e deixado a -20°C *overnight*. No dia seguinte, foi centrifugado a 18.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e ao sedimento foi acrescentado 1 mL de etanol 70% gelado (4°C), e centrifugado a 18.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ficou mantido à temperatura ambiente até completa secagem (aproximadamente 3 horas). O sedimento foi suspenso em 75 µL de água Milli-Q esterilizada e mantido *overnight* 4°C para solubilização. A seguir, foi acrescentado 10 µg/mL de RNase e incubado por 30 minutos a 37°C. O DNA em solução foi armazenado e mantido em freezer -20°C (Figura 4), após a quantificação e análise da qualidade, conforme descritas a seguir.

O DNA foi quantificado através da leitura da absorbância de diluição da amostra a 1:50 em água destilada, em espectrofotômetro, nos comprimentos de onda 260nm e 280nm. A razão entre as leituras DO_{260}/DO_{280} permitiu uma estimativa da pureza do DNA, sendo considerados valores aceitáveis quando a relação permaneceu entre 1,8 e 2,0. Valores abaixo de 1,6 indicam grande quantidade de proteína e contaminantes, e na sua ocorrência a amostra foi rejeitada e nova extração foi realizada.

A análise da qualidade da amostra do DNA extraído também foi feita através da observação dos padrões de bandas gerados através eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE 0,5X (Tris, ácido bórico, EDTA), acrescido de 5µL/100 mL de corante fluorescente EasyView (EasyPath, São Paulo, SP, Brasil), com corrida de 40 minutos a 120 volts. O gel foi visualizado em transiluminador com luz ultravioleta (L-Pix HE, Locus do Brasil, Cotia, SP, Brasil), fotografado pelo sistema de captação de imagens Lab-Image 1D (Locus do Brasil, Cotia, SP, Brasil) (Figura 4).

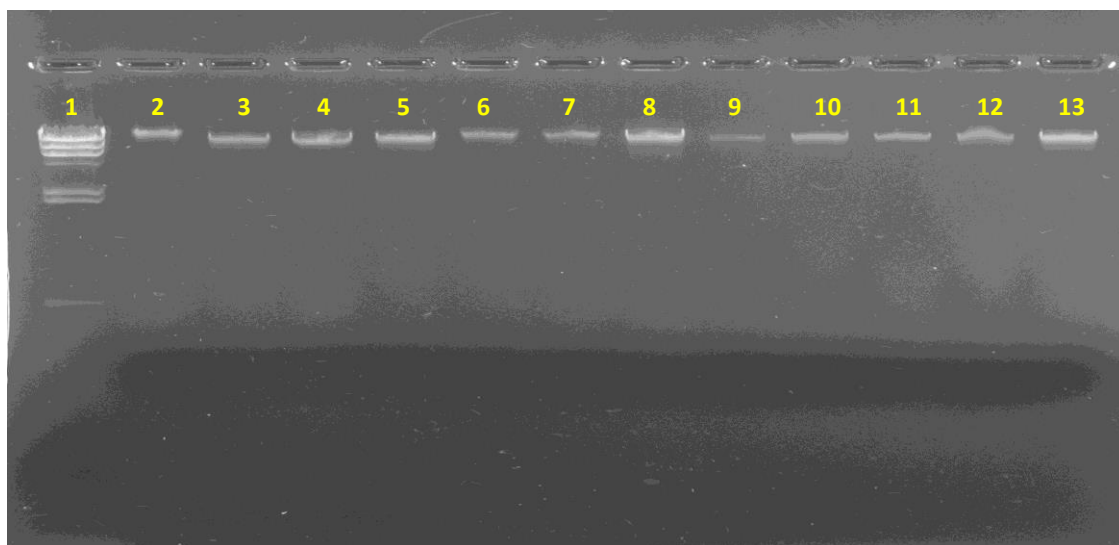


Figura 4: Gel Qualidade do DNA Extraído– colunas: 1: Peso molecular HIND (Invitrogen) ; 2 a 13: amostras 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 (Fotografia do Laboratório da ESTES-UFU, 2015)

4.5.2 – Determinação do tipo sexual (*mating types*)

Para a determinação do tipo sexual, foram utilizados dois pares de iniciadores, conforme descrito por Chaturvedi et al. (,2000): MAT α [MAT α F (5'-CTTCACTGCCATCTTCACCA-3') e MAT α R (5'-GACACAAAGGGTCATGCCA-3')], e MAT a [MAT a F (5'-CGCCTTCACTGCTACCTTCT-3') e MAT a R (5'-AACGCAAGAGTAAGTCGGGC-3')] (LudwigBiotec, Alvorada, RS, Brasil). As reações de amplificação foram feitas em volume final de 25 μ L, cada tubo contendo 25 ng de DNA genômico, tampão da enzima 1X (Phoneutria,Belo Horizonte, Brasil), 1,5 mM de cloreto de magnésio (Phoneutria,Belo Horizonte, Brasil), 0,2 mM de cada dNTP (Invitrogen, Grand Island, NY, USA), 21 picomoles de cada iniciador. As condições das reações foram as seguintes: desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, 34 ciclos a 94°C por 1 minuto, 63°C e 60°C por 1 minuto, respectivamente para MAT α ou MAT a , extensão a 72°C por 1 minuto, seguida de extensão final a 72°C por 10 minutos, e mantidos a 4°C. Os produtos de amplificação gerados pelas reações de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose (marca) a 0,5% em TBE (tris, ácido bórico, EDTA) 0,5X, acrescido de 5 μ L/100 mL de corante fluorescente EasyView (EasyPath, São Paulo, SP, Brasil). Foram utilizados 5 μ L do produto amplificado, com corrida a 75 V, por um período de 1h30min. A seguir, o gel foi

visualizado em transiluminador com luz ultravioleta, (L-Pix HE, Loccus do Brasil, Cotia, SP, Brasil), fotografado pelo sistema de captação de imagens Lab-Image 1D (Loccus do Brasil, Cotia, SP, Brasil). A presença de bandas relativas a fragmentos de 101 e 117 pb foram consideradas positivas para os tipos α e **a**, respectivamente. Foi utilizada como controle a cepa INCQS 40123, que apresenta o *mating type* MAT α .

4.5.3 – Determinação do sorotipo e do genótipo por *URA5* (RFLP-PCR)

As reações de amplificação do gene *URA5* foram feitas como descritas na literatura (MEYER et al., 2003, MORA et al., 2010). As reações foram realizadas com volume final de 50 μ L, contendo 50 ng de DNA genômico, tampão da enzima 1X (Uniscience, São Paulo, SP, Brasil), 1,5 mM de cloreto de magnésio (Uniscience, São Paulo, SP, Brasil), 0,2 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP (LudwigBiotec, Alvorada, RS, Brasil), 1 U de Taq polimerase (Uniscience, São Paulo, SP, Brasil), e 50 ng de cada um dos seguintes iniciadores: *URA5* (5'-ATGTCCTCCCAAGCCCTCGACTCCG-3') e *SJ01* (5'-TTAAGACCTCTGAACACCGTACTC-3') (LudwigBiotec, Alvorada, RS, Brasil).

As condições das reações foram as seguintes: desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, 34 ciclos a 94°C por 1 minuto, anelamento a 57°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto, seguida de extensão final a 72°C por 10 minutos, e mantidos a 4°C. Trinta microlitros do amplicon da reação foi duplamente digerido com *Sau96I* (10U/ μ L) e *HhaI* (20U/ μ L) (ambas Uniscience, São Paulo, SP, Brasil), incubado a 37°C durante 3 horas. Os fragmentos foram separados em gel de agarose a 3% a 100 V, durante 5 horas (MORA et al., 2010). Para a interpretação e análise dos resultados foram utilizados os controles *C. neoformans* ATCC 90112 (sorotipo A, VNI), *C. neoformans* CN24 (sorotipo A, VNII), *C. neoformans* INCQS 40192 (= ATCC 32719) (sorotipo AD, VNIII), *C. neoformans* INCQS 40123 (= ATCC 28957) (sorotipo D) e *C. gattii* (W. Meyer) (VGI).

4.6- Análises estatísticas

Os dados foram descritos (frequência e porcentagem) por meio de tabelas de uma entrada para cada variável e também utilizando tabelas de dupla entradas. As associações foram avaliadas por meio do teste de Razão de Verossimilhança (AGRESTI, 2007). Todos os testes foram aplicados utilizando um nível de significância de 5 % ($p < 0,05$). Os procedimentos foram realizados utilizando o software SPSS v.20.

5- RESULTADOS

No período do estudo foram recuperados 41 isolados de *Cryptococcus* sp, correspondentes a 41 pacientes atendidos no serviço. Destas amostras estudadas, 21 (51%) foram isoladas somente no LCR, oito (19%) somente em hemocultura, 10 (24%) concomitante em LCR e hemocultura, uma (3%) em secreção de ferida cutânea e uma (3%) em aspirado bronco-alveolar. Todas foram identificadas como *C. neoformans* pelas provas de ureia e CGB, apresentaram cápsula à preparação microscópica com tinta nanquim e produziram melanina com intensidade variável, predominando 3+ (90%).

Todos os isolados apresentaram o *mating type* MAT α , conforme evidenciado na Figura 5. A análise molecular dos isolados confirmou a identificação de 40 (97,5%) deles; a tipagem molecular por RFLP-PCR evidenciou o genótipo VNI (sorogrupo A, *C. neoformans* var. *grubii*) para 40 isolados; entretanto, um isolado (2,5%) apresentou o genótipo VGI (sorotipo B ou C, espécie *C. gattii*) (Figuras 6 e 7). A figura 8 evidencia o gel dos controles utilizados para a validação da reação de RFLP-PCR.

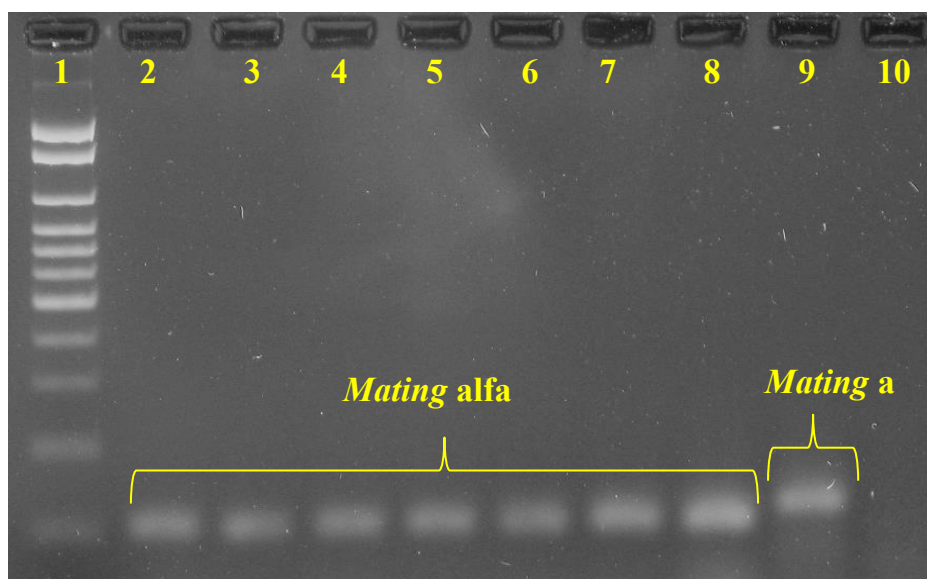


Figura 5: Gel PCR *Mating types* – colunas: 1: Padrão de tamanho molecular Norgen 100pb; 2 a 8: *mating* alfa, respectivamente isolados 8, 9, 10, 14, 21, 30, INCQS 40123; 9: *mating* “a”, cepa INCQS 40192; coluna 10: controle negativo da reação (Fotografia do Laboratório da ESTES- UFU, 2015)

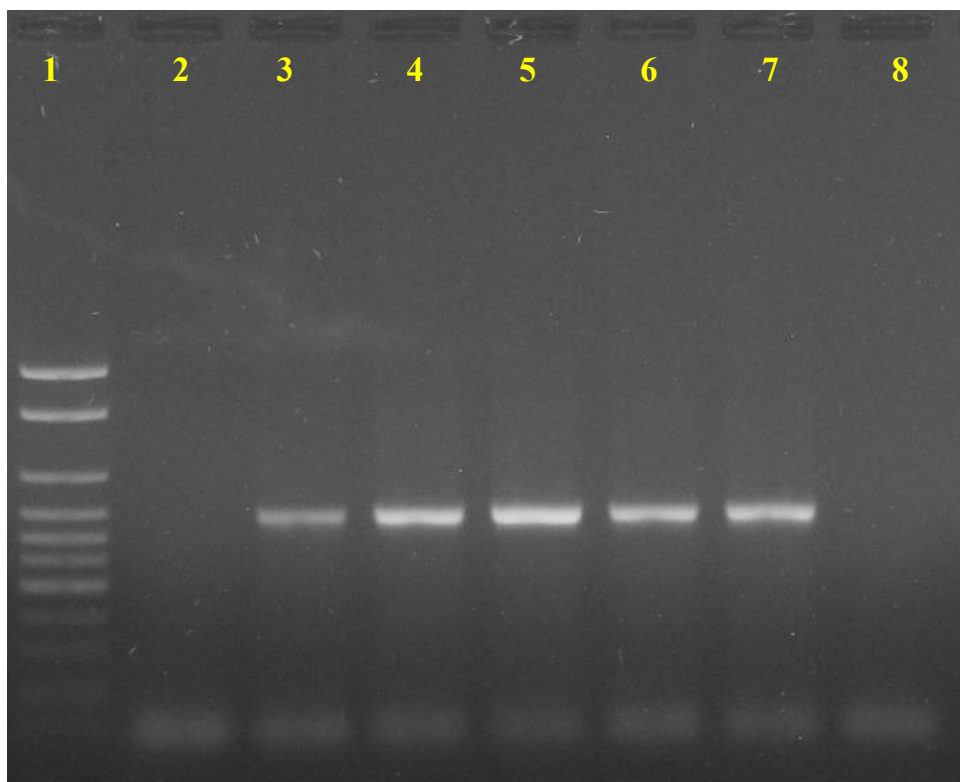


Figura 6: Gel PCR *URA-5*: Coluna 1: PM (100 pb). Coluna 2: controle negativo do primer *C. albicans* ATCC 90028; coluna 3: VGI; coluna 4: VNI ATCC 90112; colunas 5, 6 e 7: amostras 1, 2 e 3; coluna 8: controle negativo da reação (Fotografia do Laboratório da ESTES-UFU, 2015)

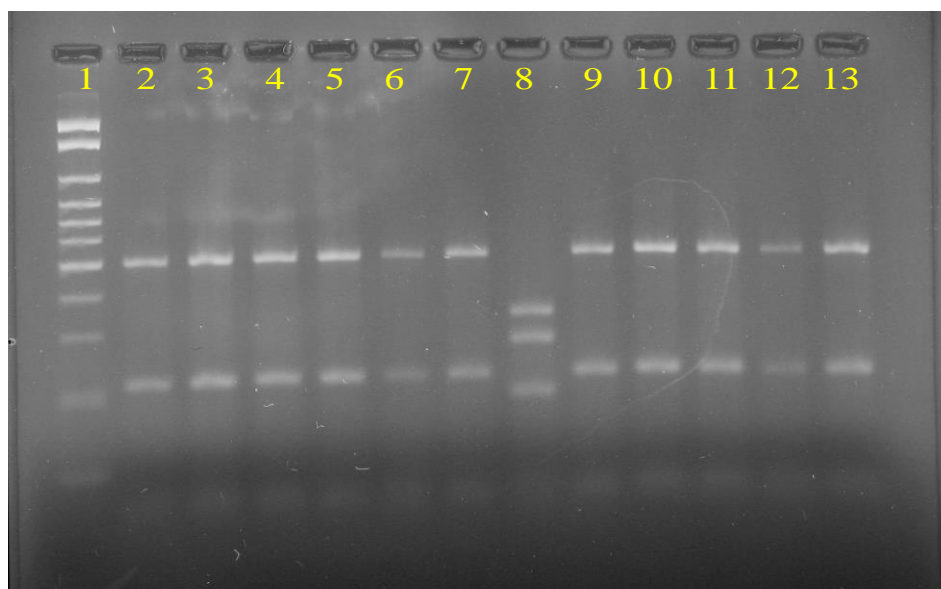


Figura 7: Gel RFLP-PCR *URA-5*: Coluna 1: PM (100 pb). Colunas 2 a 7: isolados 2, 4, 5, 6, 7, 8 (genótipos VNI); coluna 8: isolado 12 (genótipo VGI); colunas 9 a 13: isolados 13, 18, 22, 24, 25 (genótipos VNI) (Fotografia do Laboratório da ESTES-UFU, 2015)

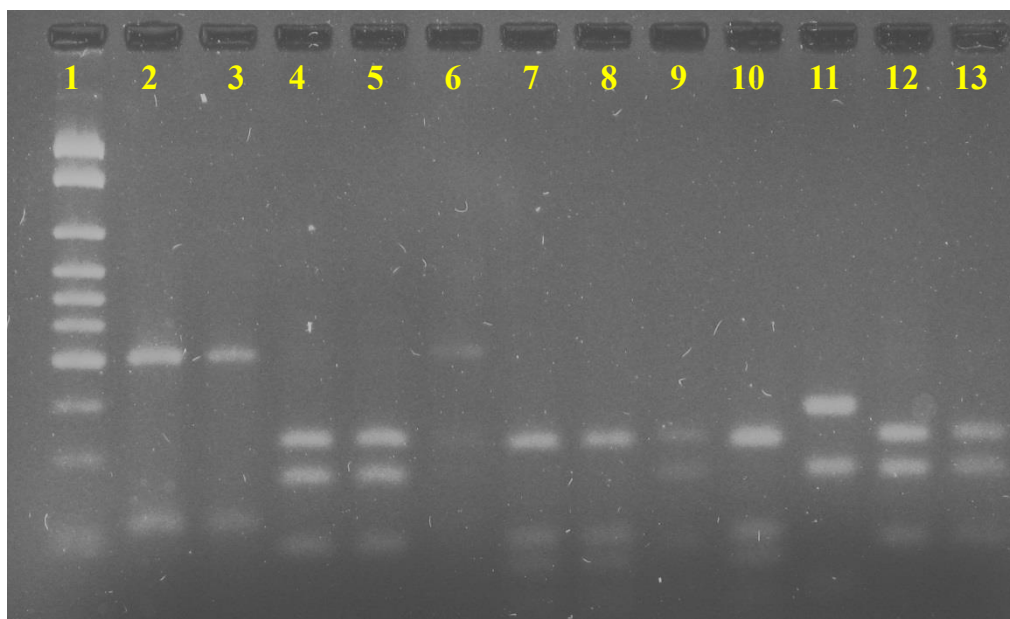


Figura 8: Gel RFLP-PCR *URA5*: Coluna 1: PM (100 pb). Colunas 2, 3: controle VNI; colunas 4, 5, 9, 12 e 13: controle VGI; coluna 6: controle VNII; colunas 7, 8 e 10: controle VGII; coluna 11: controle VNIV (Fotografia do Laboratório da ESTES-UFU, 2015)

Com relação à susceptibilidade antifúngica, todos os isolados apresentaram susceptibilidade *in vitro* frente aos antimicrobianos testados pela metodologia automatizada (Vitek[®]2); já pela metodologia de disco-difusão em ágar, 22% dos isolados apresentaram resistência *in vitro* ao fluconazol, entretanto 63% foram susceptíveis, apresentando índice de concordância entre as metodologias de 78% (63% de sensibilidade e 15% de sensibilidade dose dependente), conforme evidenciado na Tabela 4.

O fenômeno da plasticidade fenotípica não foi evidenciado em nenhuma das amostras estudadas.

A tabela 3 resume as características fenotípicas e genotípicas dos isolados de *Cryptococcus* sp.

Tabela 3: Características das amostras de *Cryptococcus* spp. isolados de pacientes atendidos no HCU, 2004-2013

Isolado	Sítio	Identificação	Carac. Colônias	Produção de cápsula	Melanina	Mating type	Tipo Molecular	Sorogrupo
1	LCR	Cn	OPACA	SIM	3+	ALFA	VNI	A
2	LCR/SG	Cn	BRILHANTE	SIM	3+	ALFA	VNI	A
3	BAL	Cn	SECA	SIM	3+	ALFA	VNI	A
4	LCR/SG	Cn	CREMOSA	SIM	3+	ALFA	VNI	A
5	LCR	Cn	CREMOSA	SIM	3+	ALFA	VNI	A
6	LCR	Cn	CREMOSA	SIM	3+	ALFA	VNI	A
7	SG	Cn	CREMOSA	SIM	3+	ALFA	VNI	A
8	LCR	Cn	CREMOSA	SIM	1+	ALFA	VNI	A
9	LESAO	Cn	CREMOSA	SIM	3+	ALFA	VNI	A
10	LCR/SG	Cn	CREMOSA	SIM	3+	ALFA	VNI	A
11	LCR	Cn	CREMOSA	SIM	3+	ALFA	VNI	A
12	LCR	Cg	SECA	SIM	3+	ALFA	VGI	B ou C
13	LCR/SG	Cn	CRE/OPACA	SIM	3+	ALFA	VNI	A
14	SG	Cn	CREMOSA	SIM	2+	ALFA	VNI	A
15	LCR	Cn	CREMOSA	SIM	2+	ALFA	VNI	A
16	SG	Cn	CREMOSA	SIM	3+	ALFA	VNI	A
17	LCR	Cn	CREMOSA	SIM	3+	ALFA	VNI	A
18	LCR	Cn	CREMOSA	SIM	3+	ALFA	VNI	A
19	LCR	Cn	CRE/OPACA	SIM	3+	ALFA	VNI	A
20	LCR	Cn	MUCOIDE	SIM	3+	ALFA	VNI	A
21	LCR	Cn	OPACA	SIM	1+	ALFA	VNI	A
22	LCR	Cn	OPACA	SIM	3+	ALFA	VNI	A
23	LCR	Cn	BRILHANTE	SIM	3+	ALFA	VNI	A
24	LCR	Cn	CRE/OPACA	SIM	3+	ALFA	VNI	A
25	LCR/SG	Cn	MUCOIDE	SIM	3+	ALFA	VNI	A
26	LCR/SG	Cn	OPACA	SIM	3+	ALFA	VNI	A
27	SG	Cn	OPACA	SIM	3+	ALFA	VNI	A
28	SG	Cn	CRE/OPACA	SIM	3+	ALFA	VNI	A
29	SG	Cn	OPACA	SIM	3+	ALFA	VNI	A
30	LCR	Cn	OPACA	SIM	3+	ALFA	VNI	A
31	LCR	Cn	CRE/OPACA	SIM	3+	ALFA	VNI	A
32	LCR/SG	Cn	OPACA	SIM	3+	ALFA	VNI	A
33	LCR	Cn	MUCOIDE	SIM	3+	ALFA	VNI	A
34	LCR	Cn	CRE/OPACA	SIM	3+	ALFA	VNI	A
35	LCR/SG	Cn	MUCOIDE	SIM	3+	ALFA	VNI	A
36	SG	Cn	MUCOIDE	SIM	3+	ALFA	VNI	A
37	LCR	Cn	CRE/OPACA	SIM	3+	ALFA	VNI	A
38	LCR	Cn	MUCOIDE	SIM	3+	ALFA	VNI	A
39	SG	Cn	MUCOIDE	SIM	1+	ALFA	VNI	A
40	LCR/SG	Cn	MUCOIDE	SIM	3+	ALFA	VNI	A
41	LCR/SG	Cn	CRE/OPACA	SIM	3+	ALFA	VNI	A

LCR: Líquido cefalorraquidiano; BAL: Lavado bronco-alveolar; Cn: *Cryptococcus neoformans*; Cg: *Cryptococcus gattii*; CRE: cremosa

Fonte: AGUIAR, 2015

Tabela 4: Susceptibilidade *in vitro* aos antifúngicos pelas metodologias de disco difusão em ágar e microdiluição em caldo dos isolados de *Cryptococcus neoformans* de pacientes atendidos no HCU, 2004-2013

Drogas	Metodologia disco difusão em ágar				Metodologia microdiluição em caldo (automatizada, Vitek® 2)				Concordância
	Var. Halo (mm)	S	SDD	R	Var. CIM (µg/mL)	S	SDD	R	
Anfotericina	12-21	41 (100%)			0,5-1,0	41 (100%)			100%
Fluconazol	12-29	26 (63%)	6 (15%)	9 (22%)	1-2	41 (100%)			63%
Voriconazol	27-50	41 (100%)			<0,12	41 (100%)			100%
Itraconazol	13-26	14 (34%)	27 (66%)		—	—	—	—	
5-Fc	—	—	—	—	1-2	41 (100%)			

Fonte: AGUIAR, 2015

Todos os pacientes foram procedentes da zona urbana, moradores de Uberlândia e outras cidades vizinhas. Dos 41 pacientes, 21 (51,2%) apresentaram o quadro clínico de meningoencefalite, 19 (46,4%) a forma disseminada e um paciente a forma pulmonar (2,4%).

Dos 41 pacientes avaliados, sete foram do sexo feminino (17%) e 34 do sexo masculino (83%). A maioria dos pacientes foi agrupada nas faixas de 20-40 anos, sendo que no sexo feminino, a maioria ficou no grupo de 20-30 anos (Tabela 5). Apesar de haver uma diferença numérica importante entre os sexos, esta não apresentou significância estatística ($p>0,05$).

Tabela 5: Distribuição por faixa etária e sexo dos pacientes acometidos pela Criptococose e atendidos no HCU, 2004-2013

Faixa etária	Sexo			
	Masculino		Feminino	
	n	%	N	%
20-30 anos	10	29,4	3	42,8
31-40 anos	14	41,2	1	14,3
41-50 anos	6	17,6	1	14,3
51-60 anos	1	2,9	0	0,0
61-69 anos	1	2,9	2	28,6
≥ 70 anos	2	6,0	0	0,0
Total	34	82,9	7	17,1

Fonte: AGUIAR, 2015

Todos os pacientes foram procedentes da zona urbana, moradores de Uberlândia e outras cidades vizinhas. Dos 41 pacientes, 21 (51,2%) apresentaram o quadro clínico de meningoencefalite, 19 (46,4%) a forma disseminada e um paciente a forma pulmonar (2,4%).

A maioria dos pacientes (71%) relatou cefaleia como sintoma principal no momento do diagnóstico, seguido de astenia (34%), febre (34%), náuseas e vômitos (29%) e perda de peso (19,5%); a maioria deles (68%) apresentou associação de sintomas, conforme mostrado na Tabela 6.

A suspeita clínica da doença foi sugerida para 29 pacientes (71%), em todos aqueles que apresentaram cefaleia ($p=0,000$); 12 pacientes tiveram o diagnóstico da criptococose firmado somente após o resultado das culturas, com predomínio de positividade em hemoculturas (67%).

Tabela 6: Frequência das manifestações clínicas de pacientes com Criptococose atendidos no HCU, 2004-2013

Manifestações Clínicas	Frequência
Cefaleia	29 (71%)
Febre	14 (34%)
Astenia	14 (34%)
Náuseas e vômitos	12 (29%)
Perda de Peso	8 (19,5%)
Tosse	4 (9,8%)
Dispneia	3 (7,3%)
Convulsões	3 (7,3%)
Tontura/vertigem	2 (4,9%)
Queixas oculares	2 (4,9%)
Confusão mental	2 (4,9%)
Diarreia	1 (2,4%)
Lesão em MSE	1 (2,4%)
Odinofagia	1 (2,4%)

Fonte: AGUIAR, 2015

Em relação ao estado imunológico, 39 pacientes (95%) eram imunodeprimidos; não havia relato sobre o estado imunológico no prontuário de dois pacientes. O HIV/AIDS foi a doença de base predominante em 35 (90%) pacientes; quatro pacientes apresentaram outras doenças de bases, como hanseníase (2,5%), hipertensão arterial sistêmica (HAS) e artrite gotosa (2,5%), doença autoimune (DAI) (2,5%) e etilismo crônico (2,5%). Os três primeiros pacientes faziam uso crônico de drogas imunossupressoras.

Dos pacientes com HIV/AIDS, 17 (48,5%) possuíam contagem de linfócitos T CD4 <200 células/mm³, para outros 18 não havia relato deste dado nos prontuários.

Trinta e cinco pacientes (86%) receberam tratamento antifúngico, sendo que todos eles foram tratados com Anfotericina B; o Fluconazol foi utilizado para o tratamento de vinte e cinco pacientes (71%), na fase de consolidação.

O tempo de internação foi variado, com mediana de 41 dias (Tabela 8). Durante a internação, 19 (46%) pacientes apresentaram infecção por outros micro-organismos, sendo que destes, nove foram isolados da corrente sanguínea.

Destes pacientes, doze (63%) apresentaram meningoencefalite associada à fungemia, seis (32%) apenas meningoencefalite e um (5%) a forma pulmonar da criptococose. Todos os micro-organismos foram isolados de culturas, exceto o Herpes vírus, que foi diagnosticado por PCR; nas culturas, houve predomínio de crescimento de cocos Gram positivos (28,5%). Três pacientes (16%) apresentaram associação de mais de um micro-organismo. A Tabela 7 mostra esta distribuição.

Tabela 7: Distribuição da infecção por outros micro-organismos isolados dos pacientes com Criptococose durante a internação no HCU, 2004-2013

Micro-organismo	Frequência	Amostra clínica
<i>S. aureus</i> (MRSA)	1	Sangue
MRSA+ <i>K. pneumoniae</i>	1	Sangue
SCN	3	Sangue
<i>E. faecalis</i>	2	Sangue
<i>S. viridans</i> + SCN	1	Sangue
<i>A. baumannii</i>	1	Lesão Cutânea
<i>P. aeruginosa</i> + <i>K. pneumoniae</i> / <i>P. jiroveci</i>	1	Urina/BAL
<i>S. marcescens</i>	1	Urina
<i>M. tuberculosis</i>	2	Escarro
<i>Cryptosporidium</i> sp	1	Fezes
<i>P. jiroveci</i>	3	BAL
<i>Candida</i> sp	1	Sangue
Herpes vírus	1	LCR
TOTAL	19	

BAL: Lavado bronco-alveolar; LCR: Líquido cefalo-raquidiano

Fonte: AGUIAR, 2015

Três pacientes (7%) apresentaram recidiva da doença, com confirmação microbiológica e na vigência do tratamento de manutenção com o Fluconazol.

Com relação à evolução da doença, 24 pacientes evoluíram para o óbito (58,5%); sendo que 16 (66%) tinham fungemia ou fungemia associada à

meningoencefalite ($p=0,001$). Dentre os 35 pacientes com aids, 21 (60%) evoluíram para óbito; dentre os quatro pacientes com outras causas de imunossupressão, um deles (25%) morreu em decorrência da doença. Os resultados detalhados estão mostrados na Tabela 8.

Daqueles que evoluíram para cura (17 pacientes), sete (41%) apresentaram sequelas, sendo principalmente visuais, acometendo 71% dos pacientes. Três pacientes (43%) tiveram mais de uma sequela, conforme mostrado no Quadro 3.

Quadro 3: Evolução dos casos dos pacientes com criptococose atendidos no HCU, 2004-2013.

Cura	17 (41,5%)	Sequelas	Não	10 (59%)		
			Sim	7 (41%)	Visual (71%)	diminuição da acuidade (2), turvação visual (2), diplopia (1)
					SNC (57%)	Epilepsia (2), coma vigil (1), LEMP (1)
					Auditiva (14%)	diminuição da acuidade (1)
					Motora (28%)	tetraplegia (2)
					Fala (28%)	disartria (2)
Óbito	24 (58,5%)					

LEMP: Leucoencefalopatia Multifocal progressiva

Fonte: AGUIAR, 2015

A tabela 8 mostra os resultados detalhados das características dos pacientes acometidos pela criptococose no período proposto pelo estudo.

Tabela 8: Características dos pacientes com criptococose atendidos no HCU, 2004-2013

ID	Sex	Age	Sítio Isolam.	SNC	Pulm	Dissem	Susp. Clín.	Aids	Dias Intern	TTO	Inf. Micr.	Evol.	Seq
1	F	29	LCR	Sim			Sim	Sim	43	Sim	NA	Cura	Não
2	M	29	LCR/SG			Sim	Sim	Sim	8	Sim	Sim	Óbito	Não
3	F	27	BAL		Sim		Sim	Sim	200	Sim	Sim	Cura	Sim
4	F	65	LCR/SG			Sim	Sim	Sim	126	Sim	Sim	Óbito	Não
5	M	28	LCR	Sim			Sim	Sim	10	Sim	Não	Óbito	Não
6	M	21	LCR	Sim			Sim	Sim	98	Sim	Sim	Cura	Sim
7	M	44	SG			Sim	Não	Sim	62	Sim	NA	Óbito	Não
8	M	72	LCR	Sim			Não	Não	82	Sim	NA	Óbito	Não
9	M	79	PELE			Sim	Não	Não	64	Sim	Sim	Cura	Não
10	M	25	LCR/SG			Sim	Sim	Sim	17	Sim	NA	Óbito	Não
11	M	32	LCR	Sim			Sim	Sim	17	Sim	Não	Óbito	Não
12	M	47	LCR	Sim			Sim	Sim	17	Sim	Não	Óbito	Sim
13	F	40	LCR/SG			Sim	Sim	Sim	3	Sim	Sim	Óbito	Não
14	M	42	SG			Sim	Não	Sim	4	Não	NA	Óbito	Não
15	M	24	LCR	Sim			Sim	Sim	43	Sim	Não	Cura	Sim
16	M	28	SG			Sim	Não	Sim	6	Sim	Sim	Óbito	Não
17	M	36	LCR	Sim			Sim	Sim	41	Sim	Não	Cura	Não
18	M	39	LCR	Sim			Sim	Sim	40	Sim	Não	Óbito	Não
19	M	34	LCR	Sim			Sim	Não	45	Sim	NA	Óbito	Não
20	M	40	LCR	Sim			Sim	Sim	39	Sim	Sim	Cura	Não
21	M	32	LCR	Sim			Sim	Sim	10	Sim	Não	Óbito	Não
22	M	44	LCR	Sim			Sim	Sim	46	Sim	Sim	Cura	Não
23	M	31	LCR	Sim			Sim	Sim	43	Sim	Não	Óbito	Não
24	F	25	LCR	Sim			Sim	Sim	16	Sim	Sim	Cura	Não
25	M	25	LCR/SG			Sim	Sim	Sim	63	Sim	Sim	Óbito	Não
26	M	44	LCR/SG			Sim	Não	Sim	15	Sim	Sim	Óbito	Não
27	M	30	SG			Sim	Não	Sim	2	Não	Sim	Óbito	Não
28	M	34	SG			Sim	Não	Sim	67	Não	NA	Óbito	Não
29	F	60	SG			Sim	Não	NA	4	Não	NA	Óbito	Não
30	M	55	LCR	Sim			Sim	Sim	61	Sim	Não	Cura	Não
31	M	22	LCR	Sim			Sim	Sim	91	Sim	Sim	Cura	Não
32	M	31	LCR/SG			Sim	Sim	Sim	16	Sim	Sim	Cura	Não
33	M	40	LCR	Sim			Sim	Não	46	Sim	NA	Cura	Não
34	M	39	LCR	Sim			Sim	Sim	33	Sim	Não	Cura	Sim
35	M	63	LCR/SG			Sim	Sim	Sim	60	Sim	Sim	Óbito	Não
36	M	36	SG			Sim	Não	Sim	36	Sim	Sim	Óbito	Não
37	F	41	LCR	Sim			Sim	Sim	60	Sim	Sim	Óbito	Não
38	M	21	LCR	Sim			Sim	Sim	45	Sim	Não	Cura	Sim
39	M	31	SG			Sim	Não	NA	20	Não	NA	Óbito	Não
40	M	58	LCR/SG			Sim	Não	Sim	1	Não	Não	Óbito	Não
41	M	37	LCR/SG			Sim	Sim	Sim	122	Sim	Sim	Cura	Sim

ID: identificação; Sex: sexo; Age: idade; SNC: meningoenfalite; Pulm.: forma pulmonar; Dissem: Fungemia/Meningoenfalite/Cutânea; Dias Intern: Dias de internação; TTO: tratamento; Inf. Micr.: infecção por outros micro-organismos; Evol: Evolução; Seq.: Sequelas; NA: não relatado no prontuário

Fonte: AGUIAR, 2015

6- DISCUSSÃO

Cryptococcus neoformans foi descrito há mais de um século como um fungo leveduriforme que cresce no meio ambiente e é um importante patógeno humano, principalmente em pacientes com depressão da imunidade celular (PERFECT; CASADEVALL, 2011). Park e colaboradores (2009) relataram a prevalência anual, globalmente, de mais de 1 milhão de casos de criptococose e que aproximadamente 625.000 mortes ao ano foram causadas por este fungo. Entretanto, Idnurm e Lin (2015) relataram as novas taxas de mortalidade da doença apresentadas na 9ª ICCO (The Conference on *Cryptococcus* and Cryptococcosis, 2014), indicando redução à metade na mortalidade causada pela criptococose. Segundo os autores, este decréscimo foi devido, em parte, à melhoria do tratamento e o avanço da medicina em alguns países, nos últimos cinco anos, principalmente nos países da América do Norte.

O presente estudo avaliou 41 amostras de *Cryptococcus*, previamente fenotipadas como *C. neoformans*, sendo a sua maioria isolada do LCR, o que está de acordo com dados da literatura, demonstrando a predileção deste agente pelo SNC (SLOAN; PARRIS, 2014). As provas tradicionais (produção de melanina, utilização de ureia como fonte de nitrogênio e crescimento em ágar CGB) utilizadas para a tipagem fenotípica foram refeitas, para confirmação da tipagem fenotípica prévia (*C. neoformans*); entretanto, a tipagem molecular revelou que um isolado, na verdade, era *C. gattii*.

A utilização do CGB como prova para a identificação das espécies de *Cryptococcus* é rotineiramente utilizada em laboratórios clínicos desde que foi proposta, em 1982 (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992). Tradicionalmente, *C. gattii* cresce em ambiente contendo a canavanina, degrada a glicina liberando amônia que alcaliniza o pH do meio, tornando-o azul; já *C. neoformans* não metaboliza a glicina e tem seu crescimento inibido pela canavanina, sendo assim, a coloração do meio permanece inalterada. Apesar de ser uma prova bioquímica simples, barata e relativamente rápida (10 dias de incubação), o CGB pode apresentar reações duvidosas e de difícil interpretação; na literatura, existem estudos que mostram resultados tanto falso positivos quanto falso negativos (KHAN et al. 2003), o que poderia dificultar o diagnóstico seguro e

correto se o laboratório dispuser somente desta forma de identificação.

Klein e colaboradores (2009) encontraram 95,4% de concordância do CGB com a biologia molecular para a identificação do *C. gattii*; já Gomes e colaboradores (2010), em estudo de quimiotipagem de *Cryptococcus* sp., relataram que o CGB apresentou 100% de eficácia para a identificação das duas principais espécies, estimulando o uso desta prova na prática clínica. Todavia, Leal e colaboradores (2008) orientam a utilização, se necessário, de métodos auxiliares (perfil de produção de melanina, PCR multiplex, sequenciamento da região D2 da subunidade 28S do rDNA) para confirmação da identificação. A caracterização das espécies de *Cryptococcus* spp. em nosso serviço é realizada somente com as provas de ureia e CGB; este isolado com o teste negativo foi liberado como sendo da espécie *C. neoformans*, e o paciente recebeu o diagnóstico de meningoencefalite causada por este micro-organismo.

Após o resultado dos testes de tipagem molecular, o isolado foi novamente incubado no CGB e a prova foi reavaliada no tempo descrito na literatura; o resultado continuou negativo. O tempo de incubação foi mantido por 30 dias, sendo feitas avaliações diárias, e o teste permaneceu negativo. Apesar da excelente correlação entre a prova do CGB e a tipagem molecular evidenciada por Klein e colaboradores para a diferenciação das duas principais espécies de *Cryptococcus* sp., nem sempre esta é possível com os métodos fenotípicos, conforme foi verificado.

O uso dos métodos moleculares para a identificação das espécies de *Cryptococcus* ainda é pouco frequente na rotina dos laboratórios de microbiologia; entretanto, estes se tornaram uma ferramenta diagnóstica extremamente eficaz, dada as suas elevadas sensibilidade e especificidade. A inserção destes métodos na prática clínica vem sendo estimulada (HAGEN et al., 2015), uma vez que novas espécies do complexo *C. neoformans/C. gattii* estão sendo descritas, e sua identificação correta, segundo estes autores, somente será possível através da avaliação de seus genótipos por técnicas moleculares.

Cryptococcus neoformans var. *grubii* tem sido isolado de diversas fontes ambientais e em amostras clínicas; sendo que, no Brasil, esta espécie é

predominante nos estados das regiões Sudeste e Sul (PAPPALARDO; MELHEM, 2003). No presente estudo, todos os isolados identificados como *C. neoformans* foram da var. *grubii* (sorotipo A, genótipo VNI), fato que confirma a prevalência da distribuição desta espécie no estado de Minas Gerais (MORA et al., 2012). Além disto, alguns autores afirmam que mais de 80% dos casos de criptococose são causados pela var. *grubii*, sendo que a maioria dos pacientes infectados por esta espécie são portadores de aids (PERFECT; CASADEVAL, 2002; MEYER; TRILLES, 2010). Embora a proposta do presente estudo tenha sido analisar apenas os isolados de *C. neoformans*, foi encontrada uma amostra com perfil obtido com RFLP-PCR compatível com o genótipo VGI (*C. gattii*). No Brasil, esta espécie, tradicionalmente implicada em causar doença em pacientes imunocompetentes, é mais frequentemente encontrada nos estados das regiões Norte e Nordeste, e, apesar de já ter sido relatada como causadora de criptococose em pacientes de nossa região (MOREIRA et al., 2006; MORA et al., 2012), sua presença é encontrada em pequena parcela destes pacientes. A coinfeção HIV/*C. gattii* pode ser encontrada, principalmente se os pacientes portadores do vírus viverem em áreas endêmicas para este agente; na África, 30% das infecções causadas pelo *C. gattii* são em pacientes com aids (STEELE et al., 2010). No Brasil, são poucos os casos relatados de doenças causadas por esta espécie em pacientes portadores de aids, uma vez que a maioria destes se encontra em regiões consideradas não endêmicas para este agente (LINDEBERG et al., 2008). Moreira e colaboradores (2006) relataram que, no nosso serviço, 7% dos casos de criptococose foram causadas pelo *C. gattii*; entretanto, de 78 pacientes com aids, somente um foi infectado por esta espécie.

Em relação ao *mating-type*, todos os isolados apresentaram o MAT α ; fato corroborado pela literatura. Kwon-Chung e colaboradores, em 1992, já haviam descrito que a maioria dos isolados, tanto clínicos quanto ambientais de *C. neoformans* e *C. gattii* eram MAT α . Desnos-Ollivier e colaboradores, em 2015, estudaram 400 amostras de *C. neoformans* (244-sorotipo A; 76-sorotipo D e 80-sorotipo AD) isolados na França e não encontraram nenhuma amostra MAT a no sorotipo A (todas eram MAT α); apenas 13 amostras do sorotipo D eram MAT a.

Os estudos de susceptibilidade *in vitro* de isolados de *Cryptococcus* spp. têm evidenciado que a maioria apresenta susceptibilidade aos antifúngicos poliênicos (anfotericina B), à 5-fluorocitosina e aos derivados azólicos (fluconazol, itraconazol, voriconazol e posaconazol) (CONSENSO, 2008); entretanto a resistência, *in vivo*, de *C. neoformans* aos derivados imidazólicos (em especial ao fluconazol) está bem documentada na literatura, principalmente em pacientes portadores de aids, com a forma clínica no SNC e que fazem uso da droga por um longo período (FRIESE et al., 2001). Silva e colaboradores (2008) estudaram o perfil de susceptibilidade de *C. neoformans* e sugeriram que a falência terapêutica pode ocorrer pelo desenvolvimento de resistência à Anfotericina B. Em contrapartida, nosso estudo evidenciou que, pela metodologia automatizada-Vitek[®]2, todos os isolados apresentaram susceptibilidade, *in vitro*, às drogas testadas; já pela metodologia de disco difusão, 22% destas amostras foram resistentes apenas ao fluconazol, apresentando susceptibilidade às outras drogas testadas. A metodologia de referência indicada pelo CLSI para se realizar o teste de susceptibilidade aos antifúngicos para *C. neoformans* é a microdiluição em caldo (CLSI, 2008); entretanto, Tewari e colaboradores (2011) evidenciaram que a técnica utilizada pelo Vitek[®]2 apresenta boa acurácia, em especial para fluconazol e Anfotericina, apresentando nível de concordância com a metodologia de referência de 80% e 90%, respectivamente. Apesar de não haver aplicabilidade na prática clínica para a realização de rotina de testes de susceptibilidade aos antifúngicos para *Cryptococcus* spp., o Consenso em Criptococose (2008) recomenda que o primeiro isolado deste fungo seja armazenado até um ano após o diagnóstico para que, em casos de recaída, a CIM para fluconazol e Anfotericina possa ser comparada. Para atender tal recomendação poderemos adotar em nosso serviço a realização dos testes pela metodologia automatizada Vitek[®] 2, uma vez que os resultados são expressos em CIM e possui excelente concordância com a metodologia de referência proposta pelo CLSI.

O fenômeno da plasticidade fenotípica (capacidade de micro-organismos de alterar sua morfologia ou fisiologia de acordo com as condições do ambiente)

não foi evidenciado em nenhum dos isolados. Goldman e colaboradores (1998) já haviam relatado que a plasticidade fenotípica dos sorotipos A e D de *C. neoformans* seria um mecanismo de resistência e contribuiria para a persistência da infecção. Guerrero e colaboradores relataram o fenômeno tanto *in vitro* quanto *in vivo*, como mecanismo de resistência, predominantemente em casos de doença crônica (GUERRERO et al., 2006, 2010). Todos os isolados deste estudo foram provenientes de pacientes com primo-infecção, sendo esta a provável explicação por não ter sido evidenciado a plasticidade fenotípica nesta amostra de estudo. Outra justificativa poderia se relacionar ao armazenamento dos isolados, que ocorreu por tempos variados, e foi feita através de repiques periódicos (trimestralmente). Esta forma de manutenção pode levar a variabilidade fenotípica ocasionada por pequenas mutações, ocorridas ao longo do tempo (CAVALCANTE et al., 2007). Assim, estudos analisando a plasticidade fenotípica incluindo isolados recentes e isolados sequenciais poderiam contribuir para o entendimento desta característica dos isolados clínicos de *C. neoformans*.

Com relação à distribuição dos pacientes por faixa etária e sexo, foi verificado que a maioria (85%) se encontrava entre 20-50 anos, sendo a faixa de 31-40 anos a mais acometida, e era portadora de aids, o que está de acordo com a literatura (LEAL et al., 2008; MORA et al., 2012). Dados do Ministério da Saúde (2014) apontam uma prevalência de aids em pacientes entre 25 e 39 anos, em ambos os sexos. Mezzari e colaboradores, em 2013, estudando o perfil epidemiológico da criptococose em hospital público no RS, encontraram a maioria dos pacientes na faixa dos 30-39 anos. Os pacientes desta faixa etária nasceram e cresceram na mesma época de surgimento e expansão do HIV; acompanharam a mudança do comportamento sexual, com o aumento do número de parceiros, contribuindo para a disseminação do HIV e de doenças oportunistas. No Brasil, a Criptococose ocorre como a primeira manifestação em mais 4% dos pacientes com aids, sendo considerada uma de suas doenças definidoras (CONSENSO, 2008). Na amostra estudada, foi averiguado um maior acometimento do sexo masculino (83%). Embora não tenham sido avaliados todos os casos de criptococose ocorridos no período de estudo, o achado do predomínio da infecção nos pacientes do sexo masculino também

está de acordo com a literatura; o boletim epidemiológico de aids de 2014, avaliando o período correspondente ao nosso estudo (2004 a 2013), mostrou um aumento de 4,3% das taxas de detecção da doença nos homens; já entre as mulheres houve queda significativa no período avaliado, de 14,0%. Moreira e colaboradores, em 2006, realizaram um estudo da epidemiologia da Criptococose em nosso serviço e também encontraram predomínio do sexo masculino, com porcentagem semelhante ao presente estudo. Apesar de a criptococose ser predominante no sexo masculino, estudo recente evidenciou que as mulheres que apresentam meningoencefalite têm pior prognóstico do que os homens, com sobrevida diminuída (CARVOUR et al., 2015).

Nenhum paciente foi procedente de zona rural; todos foram de Uberlândia ou de cidades vizinhas, que tem o HCU como hospital terciário de referência. Como este dado foi extraído dos prontuários, pode ter havido informações incorretas sobre a procedência destes pacientes em relação à zona (rural e urbana) de origem; entretanto, como nenhum deles foi proveniente de outro estado, pode-se observar a circulação do *C. neoformans* nesta região do estado de Minas Gerais, corroborando os dados da literatura brasileira da predominância desta espécie na região Sudeste.

O Consenso em Criptococose (2008) afirma que em mais de 80% dos casos de criptococose, a forma clínica predominante é a meningoencefalite; este estudo vem ao encontro destes dados, uma vez que 31 pacientes (75%) tiveram a detecção do fungo no LCR, o que está de acordo com a literatura (MOREIRA et al., 2006; LINDEBERG et al. 2008; PARK et al.; 2009; PAPPAS, 2010; MORA et al., 2012; PAPPAS, 2013; SLOAN; PARRIS, 2014; DESNOS-OLIVIER et al., 2015). Apenas um paciente apresentou a forma pulmonar e, apesar de o envolvimento pulmonar ser o segundo mais frequente, esta forma clínica pode ser assintomática e subestimada naqueles com AIDS, o que pode dificultar o diagnóstico.

O paciente que apresentou a forma cutânea tinha um ferimento grave causado por queimadura de solda elétrica no membro superior esquerdo (MSE) e estava fazendo tratamento caseiro à base de querosene e emplastro de ervas; como não houve melhora do quadro clínico, procurou atendimento hospitalar, onde

foram coletadas culturas da secreção da ferida, evidenciando o crescimento de *C. neoformans*. Embora a criptococose cutânea não seja tão frequente quanto a meningoencefalite, aquela pode ocorrer em 10 a 15% dos casos (CONSENSO, 2008), e é considerada marcador de doença disseminada. Acreditamos que este paciente adquiriu o fungo por inoculação direta no tecido lesado pelas ervas que foram coletadas do solo, uma vez que, durante a internação hospitalar, as culturas de sangue, LCR e urina foram negativas. Nasser e colaboradores, em 2011, também descreveram um caso de criptococose cutânea por inoculação direta do micro-organismo.

Em oito pacientes (19%), o fungo foi encontrado somente no sangue; estudos mostram que a fungemia por *Cryptococcus* spp. pode estar presente em 47-71% dos pacientes com aids, entretanto, esta porcentagem é de 27% naqueles não infectados pelo HIV (ANTINORI, 2013). No presente estudo, dos oito pacientes que apresentaram fungemia isolada, seis (75%) eram portadores de aids; para os outros dois pacientes não havia relato acerca do estado imunológico. Todos os pacientes que apresentaram o fungo tanto no LCR quanto no sangue eram portadores de aids.

As manifestações clínicas (sinais e sintomas) no momento do diagnóstico foram variadas, entretanto, aquelas relacionadas com a hipertensão intracraniana – cefaleia, náuseas e vômitos – e febre foram as predominantes. Cefaleia isolada foi o principal sintoma, acometendo mais de 70% dos pacientes. Sloan e Parris, em 2014, em estudo de revisão, também descreveram a cefaleia como o principal sintoma em pacientes com meningoencefalite. Segundo o Consenso em Criptococose, cefaleia e febre estão presentes em 76% e 65% dos casos, respectivamente, de meningite criptocócica (CONSENSO, 2008). Astenia e perda de peso também foram manifestações frequentes, entretanto estas estão mais associadas às doenças de base, principalmente a aids, evidenciando o grau de debilidade física em que os pacientes se encontravam. A tosse foi um sintoma relativamente frequente, aparecendo em 10% de nossa casuística; entretanto Severo e colaboradores (2009) afirmam que esta pode não estar associada apenas ao comprometimento pulmonar pela criptococose. As queixas relativas ao estado mental tais como confusão, obnubilação e torpor, estiveram presentes em

pequena parcela dos pacientes (5%), todavia, estudos apontam uma maior taxa de mortalidade naqueles que as apresentam (BRIZENDINE et al., 2013). Apesar de existirem dados na literatura evidenciando que mais de 30% dos pacientes com meningoencefalite podem apresentar queixas oculares (GHATALIA et al. 2014; SLOAN; PARRIS, 2014), estas não foram frequentes neste estudo.

A suspeita clínica da doença (meningoencefalite) foi sugerida para 29 (71%) pacientes, sendo todos aqueles que apresentaram cefaleia como sintoma principal; o LCR foi coletado e no resultado do exame de rotina havia a observação “presença de leveduras sugestivas de *Cryptococcus* sp.”. Para os pacientes que não apresentaram cefaleia, o diagnóstico somente foi firmado após a cultura das amostras biológicas, com predomínio das culturas de sangue, evidenciando a dificuldade de diagnóstico clínico quando os sinais e sintomas não são específicos, principalmente nos casos de doença disseminada.

A causa da imunossupressão foi bem documentada para 39 (95%) pacientes, sendo todos imunodeprimidos; e a causa principal foi a aids, acometendo 35 (90%) deles. A infecção de hospedeiros imunocomprometidos por *C. neoformans* está amplamente descrita na literatura (ANTINORI, 2013; DESNOS-OLLIVIER, 2015; IDNURM, 2015); o presente estudo também evidenciou esta associação. Para dois pacientes não havia relato de imunodepressão nos prontuários: um paciente encaminhado para investigação de ascite e o outro foi vítima de acidente automobilístico, com traumatismo cranioencefálico; em ambos houve o crescimento do fungo somente nas hemoculturas. Todavia, para o segundo paciente, a solicitação das culturas de sangue aconteceu após 20 dias de internação, uma vez que ele apresentou piora do quadro clínico. Como já descrito, a infecção pelo *C. neoformans* pode ser adquirida principalmente pela inalação de propágulos infectantes; a inoculação direta após trauma, apesar de descrita na literatura e de ter sido documentada por este estudo, é rara. Focos primários pulmonares podem ser reativados ao longo do tempo (SEVERO et al., 2009); a próstata pode servir de reservatório para o fungo (SEO et al., 2006). Baseado nisto pode-se inferir que

uma destas situações pode ter ocorrido para que o paciente apresentasse fungemia, sendo a hipótese de disseminação do fungo a partir da próstata ou a reativação de focos pulmonares as mais plausíveis, já que as culturas solicitadas durante os primeiros dias internação, tanto as de LCR (devido ao TCE) bem como as de sangue, foram negativas.

Dos pacientes com AIDS, apenas 17 tiveram a contagem de linfócitos T CD4/CD8 disponíveis em seus prontuários e, a maioria, tinha o diagnóstico prévio da doença. Todos os resultados foram inferiores a 200 células/mm³, sendo que em 15 (88%), a contagem foi inferior a 100 células/mm³. Jarvis e colaboradores, em 2010, em estudo de coorte de 700 pacientes, observaram um maior risco de desenvolvimento de meningoencefalite quando os pacientes apresentavam contagem de CD4 inferior a 100 células/mm³. A OMS (2011) orienta rastreamento dos pacientes com aids que possuem contagem de linfócitos T CD4 inferior a 100 células/mm³ com o teste de pesquisa de antígenos de *Cryptococcus*; para os pacientes que apresentarem positividade no teste, o tratamento com fluconazol deve ser iniciado com a finalidade de prevenção da criptococose; entretanto estas recomendações não são baseadas em evidências clínicas (MASUR, 2015). Os pacientes que não foram submetidos ao exame foram confirmados portadores de aids em exames realizados após o resultado do LCR evidenciando o fungo, e não tiveram a oportunidade de realizá-lo durante o período de internação, uma vez que a maioria destes (88%) evoluiu para o óbito.

Com relação ao tratamento com antifúngicos, 35 pacientes o recebeu com as drogas disponíveis no mercado brasileiro para o tratamento da Criptococose e de acordo com os *guidelines* do manejo da doença (PERFECT et al., 2010; PERFECT; BICANIC, 2014). A Anfotericina B foi iniciada para todos; entretanto alguns pacientes faleceram já no início da fase de indução, não recebendo, portanto, o fluconazol (fase de consolidação) para a continuidade do tratamento, o que explica a diferença numérica entre pacientes tratados com Anfotericina e aqueles tratados com o Fluconazol. No nosso serviço a fase de indução era realizada somente com a Anfotericina B; o protocolo de associação desta droga com o Fluconazol ocorreu apenas no ano de 2010. Todavia, seis

pacientes não receberam tratamento, todos apresentando fungemia. Apesar de a meningoencefalite ser a forma clínica mais comum, manifestações não meníngeas são as mais frequentes em pacientes não infectados pelo HIV (SLOAN; PARRIS, 2014). Destes pacientes não tratados, quatro (66%) tinham AIDS e o estado imunológico dos outros dois pacientes era desconhecido. Acreditamos que estes pacientes não tiveram a suspeita clínica de criptococose por se tratarem de pacientes debilitados, com estado geral bastante comprometido e com sinais e sintomas inespecíficos (mal estar, astenia, hiporexia, febre) que poderiam aparecer em diversas doenças sistêmicas.

Os pacientes permaneceram internados por 41 dias (mediana), possivelmente pela lenta resposta terapêutica e necessidade de maior tempo de medicação endovenosa (Anfotericina B), uma vez que o fluconazol é administrado pela via oral (PERFECT et al., 2010).

Três pacientes (7%) apresentaram recidiva da doença, após aparente controle. Esse fato ocorreu provavelmente devido à imunossupressão grave, uma vez que todos eram portadores de aids (tinham contagem de linfócitos T CD4 inferior a 100 células/mm³ e carga viral variando entre 20.000 a 400.000 cópias de RNA viral/mL). Fato importante comentar é que estas recidivas ocorreram durante a fase de manutenção do tratamento da meningoencefalite com fluconazol, em regime ambulatorial. Não havia relato em seus prontuários sobre a falta de adesão ao tratamento de manutenção. Musubire e colaboradores (2013) relataram que as recidivas da doença dependem do regime de antifúngico inicial, da instituição de terapia antirretroviral e da adesão à profilaxia secundária. Jarvis e colaboradores (2010) relataram 23% de recidiva da doença, principalmente naqueles pacientes que não estavam em uso da terapia profilática com o fluconazol e que não tiveram o tratamento antiretroviral instituído.

A mortalidade global da criptococose, mensurada em 58,5%, evidencia a gravidade da enfermidade, mesmo após a instituição de tratamento adequado para a maioria dos pacientes. Estudos recentes realizados no Brasil

mostraram-na variando de 26 a 70%: no Triângulo Mineiro, foi de 70% (MOREIRA et. al, 2006) e 45% (MORA et al., 2012); no Rio Grande do Sul, 26% (MEZZARI et al., 2013) e em Goiás, foi de 48,4% (SOUZA et al., 2013).

Infecção nosocomial associada à criptococose ocorreu em 29% dos pacientes, sendo a maioria deles com doença disseminada, com predomínio discreto de crescimento de cocos Gram positivos. Rajasingham e colaboradores, em 2014, relataram 15% de infecções nosocomiais em seu estudo, com predomínio dos bastonetes Gram negativos, em especial a *Klebsiella pneumoniae*. Além das infecções nosocomiais, alguns pacientes (17%) apresentaram co-infecção por outros micro-organismos causadores de doenças oportunistas, dentre eles *P. jirovecii*, *M. tuberculosis*, *Cryptosporidium* sp, corroborando os dados de imunodepressão destes pacientes.

A criptococose é uma doença grave, cujo diagnóstico deve ser realizado o mais corretamente possível para que os pacientes possam receber o tratamento adequado, uma vez que, mesmo recebendo o tratamento, a mortalidade dos pacientes ainda é alta, acima de 50% dos casos, principalmente em países em desenvolvimento. O diagnóstico pode ser suscitado facilmente quando os pacientes apresentam meningoencefalite, já que as manifestações clínicas são exuberantes e características, como a cefaleia, febre e sinais de irritação meníngea. Entretanto, a fungemia e as outras formas da doença são diagnosticadas, na maioria das vezes, somente após o crescimento do fungo nas culturas. As características micromorfológicas de *Cryptococcus* spp, quando cuidadosamente observadas, podem direcionar a identificação deste micro-organismo; entretanto, a diferenciação das duas principais espécies ainda é feita, rotineiramente, apenas através de testes fenotípicos clássicos, que podem apresentar falhas. A perspectiva de utilização de métodos moleculares tanto para o diagnóstico quanto para a correta identificação dos fungos do complexo *C. neoformans/C.gattii*, embora distante para a maioria dos laboratórios clínicos do nosso país, vem surgindo como uma ferramenta cada vez mais eficaz, melhorando a compreensão da epidemiologia e da história natural da doença, abrangendo dados para a melhoria da vigilância

epidemiológica, podendo, inclusive, apresentar impacto positivo no monitoramento de cepas resistentes e no tratamento da criptococose.

7- CONCLUSÃO

1- Foram avaliadas 41 amostras previamente identificadas como *Cryptococcus neoformans*; no entanto, uma delas era *C. gattii*, conforme evidenciado por testes moleculares.

2- Quarenta amostras de *Cryptococcus* sp eram do sorotipo A (genótipo VN I) e uma do sorotipo B ou C (genótipo VG I). Todas apresentaram *mating type* α .

3- A maioria dos isolados apresentou susceptibilidade antifúngica às drogas testadas; pela metodologia automatizada 100% dos isolados foram susceptíveis.

4- Nenhum isolado apresentou o fenômeno da plasticidade fenotípica.

5- Os pacientes acometidos pela criptococose no período proposto pelo estudo foram, em sua maioria, homens de 31 a 40 anos. Todos os pacientes foram procedentes da zona urbana. A meningoencefalite foi a forma predominante da doença; a maioria era imunodeprimido, sendo a AIDS a doença de base predominante. A maioria deles recebeu tratamento adequado de acordo com os *guidelines* propostos para o tratamento da criptococose, entretanto, a despeito da instituição da terapia medicamentosa correta, mais da metade destes pacientes evoluiu para o óbito, evidenciando a gravidade da infecção.

8- REFERÊNCIAS

AGRESTI, A. **An Introduction to Categorical Data Analysis**. New York: John Wiley& Sons, 2007.

ANTINORI, S. New Insights into HIV/AIDS-Associated cryptococcosis. **ISRNAIDS**, New York, 2013:471363.

BARLUZZI, R. et al. Establishment of protective immunity against cerebral cryptococcosis by means of an avirulent, non melanogenic *Cryptococcus neoformans* strain. **J. Neuroimmunol.**, Amsterdam, v. 109, n. 2, p. 75-86, Sep. 2000.

BICANIC, T; HARRISON, T.S. Cryptococcal meningitis. **Br. Med. Bull.**, London, v. 72, n. 1, p. 99-118, Apr. 2005.

BOLANO, A. et al. Rapid methods to extract DNA and RNA from *Cryptococcus neoformans*. **FEMS Yeast Res.**, Amsterdam, v. 1, n. 3, p. 221-224, Dec. 2001.

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

BRIZENDINE, K.D; BADDLEY, J.W; PAPPAS, P.G. Predictors of Mortality and Differences in Clinical Features among Patients with Cryptococcosis According to Immune Status. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n.3, p. 1-8, e60431, Mar. 2013.

CALLEJAS, A. et al. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, serotype C, from the environment in Colombia. **Med. Mycol.**, Philadelphia, v. 36, n. 1, p. 341-344, Oct. 1998.

CAMPBELL, L.T.; CARTER, D.A. Looking for sex in the fungal pathogens *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **FEMS Yeast Res.**, Oxford, v. 6, p. 588-598, Apr. 2006.

CASADEVALL, A. Host-microbe interactions: fungi – Recent progress in understanding host-fungal interactions. **Curr. Opin. Microbiol.**, London, v. 3, n. 4, p. 337-338, Aug. 2000.

CASADEVALL, A.; PERFECT, J.R. ***Cryptococcus neoformans***. Washington: ASM Press, 1998. 541p.

CARVOUR, M. L. et al. Differential Survival for Men and Women with HIV/AIDS-Related Neurologic Diagnoses. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 6, n. 10, p. 1-11, Jun. 2015.

CECON. Centro de Controle e Produtos para Diagnósticos Ltda. **Bula dos discos de antifúngicos itraconazol, fluconazol e anfotericina B**. São Paulo: Cecon, 2010.

CAVALCANTE, S.C et al. Evaluation of phenotypic and genotypic alterations induced by long periods of subculturing of *Cryptococcus neoformans* strains. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 1, p. 41-47, Feb. 2007.

CHATUVERDI, S. et al. Direct PCR of *Cryptococcus neoformans* MAT α and MAT α pheromones to determine *mating type*, ploidy, and variety: a tool for epidemiological and molecular pathogenesis studies. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 38, n. 5, p. 2007-2009, May 2000.

CHRETIEN, F. et al. Pathogenesis of cerebral *Cryptococcus neoformans* infection after fungemia. **J. Infect. Dis.**, Stockholm, v. 186, n. 4, p. 522-530, Aug. 2002.

CLSI. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts. Approved Guideline – Second Edition. CLSI document M44-A2. **Clinical and Laboratory Standard Institute**, Wayne, Pennsylvania 2009.

CONSENSO em criptococose. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 41, n. 5, p. 524-544, Sep./Oct. 2008.

CORREA, M.P.S.C. et al. Criptococose em crianças no Estado do Pará, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 32, n. 5, p. 505-508, Sep./Oct. 1999.

CORREA, M.P.S.C. et al. The spectrum of computerized tomography (CT) findings in central nervous system (CNS) infection due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in immunocompetent children. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, São Paulo, v. 44, n. 5, p. 283-287, Sep./Oct. 2002.

DESNOS-OLLIVIER, M. et al. Mixed Infections and *In Vivo* Evolution in the Human Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans*. **mbio.asm.org.**, v.1, n.1, e00091-10, Apr. 2010. Disponível em: <www.mbio.asm.org/>. Acesso em 15 de junho de 2015.

DENOS-OLLIVIER, M. et al. Cryptococcosis Serotypes Impact Outcome and Provide Evidence of *Cryptococcus neoformans* Speciation. **mbio.asm.org.**, v.6, n.3, e00311-15, May./Jun. 2015. Disponível em: <www.mbio.asm.org/>. Acesso

em 20 de outubro de 2015.

DEL POETA, M.; CASADEVALL, A. Ten challenges on *Cryptococcus* and cryptococcosis. **Mycopathologia**, Doedrecht, v. 173, n. 5-6, p. 303-310, Jun. 2012.

DEL POETA, M.; CHATUVERDI, V. *Cryptococcus* and Cryptococcosis in the Twenty-First Century. **Mycopathologia**, Doedrecht, v. 173, n. 5-6, p. 283-285, Jun. 2012.

D'SOUZA, C.A. et al. Investigation of the basis of virulence in serotype A strains of *Cryptococcus neoformans* from apparently immunocompetent individuals. **Curr. Genet.**, New York, v. 46, n. 2, p. 92-102, Aug. 2004.

ELLIS, D.H.; PFEIFFER, T.J. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 28, n. 7, p. 1642-1644, Jul. 1990.

ESPOSTO, M. C. et al. Determination of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* mating type by multiplex PCR. **Clin. Microbiol. Infect.**, London, v. 10, p. 1089-1104, Jun. 2004.

FRANZOT, S.P.; SALKIN, I.F.; CASADEVALL, A.F. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*, a separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 37, n. 3, p. 838-840, Mar. 1999.

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

FRIESE, G. et al. Development of azole resistance during fluconazole maintenance therapy for AIDS-associated cryptococcal disease. **AIDS**, London, v. 15, n. 17, p. 2344-2345, Nov. 2001.

GEZUELE, E. et al. Isolation in Uruguay of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from a nest of the wasp *Polybia occidentalis*. **Rev. Iberoam. Micol.**, Bilbao, v. 10, n. 1, p. 5-6, Mar. 1993.

GHATALIA, P.A. et al. Reversible blindness in cryptococcal meningitis with normal intracranial pressure: case report and review of the literature. **Clin. Infect. Dis.**, Oxford, n. 59, v. 2, p. 310-313, Jul. 2014.

GOLDMAN, D.L. et al. Phenotypic switching in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* is associated with changes in virulence and pulmonary inflammatory response in rodents. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 95, n. 25, p. 14967-14962, Dec., 1998.

GOMES, F.R. et al. Quimiotipagem e caracterização fenotípica de *Cryptococcus*. Rev. **Pan-Amazônica de Saúde**, Pará, v.1, n. 4, p.43-49, 2010.

GUERRERO, A. et al. Phenotypic switching in *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology**, Washington, n. 152, p. 3-9, Jan. 2006.

GUERRERO, A. et al. *Cryptococcus neoformans* variants generated by phenotypic switching differ in virulence through effects on macrophage activation. **Infect. Immun.**, Washington, v. 78, n. 3, p. 1049-1057, Mar. 2010.

HEDAYATI, M.T. et al. *Cryptococcus neoformans* isolation from swallow (*Hirundo rustica*) excreta in Iran. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v. 53, n. 3, p. 125-127, May-Jun. 2011.

HAGEN, F. et al. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. **Fungal Genet. and Biol.**, Orlando, v. 78, n.1, p. 16-48, Feb. 2015.

HOANG, L. M. N. et al. *Cryptococcal neoformans* infections at Vancouver hospital and health sciences center (1997-2002): epidemiology, microbiology and histopathology. **J. Med. Microbiol.**, Vancouver, v. 53, p. 935-940, Sep. 2004.

HORTA, J.A. et al. Susceptibility to heat and antifungal agents of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotype D) isolated from *Eucalyptus* spp. in Rio Grande do Sul, Brazil. **Braz. J. Microbiol.**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 1, p. 1-6, Jan./Mar. 2005.

IDNURM, A., LIN, X. Rising to the challenge of multiple *Cryptococcus* species and the diseases they cause. **Fungal Genet. and Biol.**, Orlando, v. 78, n.1, p.1-6, May 2015.

JARVIS, J.N. et al. Adult meningitis in a setting of high HIV and TB prevalence: findings from 4961 suspected cases. **BMC Infect. Dis.**, London, v. 10, n. 67, 2010

KHAN, Z.U. et al. Disseminated cryptococcosis in an AIDS patient caused by a canavanine-resistant strain of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*. **J. Med. Microbiol.**, Vancouver, v. 52, n.1, p.271-275, Mar. 2003.

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

KLEIN, K.R. et al. Identification of *Cryptococcus gattii* by use of L-Canavanine Glycine Bromothymol Blue medium and DNA sequencing. **J. Med. Microbiol.**, Vancouver, v. 47, n.11, p. 3669-3672, Nov. 2009.

KWON-CHUNG, K.J.; BENNETT, J.E. **Medical mycology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992. 867p.

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

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

LACAZ, C.S. et al. Criptococose. In: LACAZ, Carlos da Silva (Coord.). **Tratado de micologia médica**. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002. cap. 17, p. 416-440.

LAZERA, M.S. et al. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. **Med. Mycol.**, Oxford, v. 38, n. 5, p. 379-383, Oct. 2000.

LAZERA, M.S.; IGREJA, R.P.; WANKE, B. Criptococose. In SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. (Coord.). **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. cap. 24, p. 252-264.

LAZERA, M.S.; WANKE, B.; NISHIKAWA, M.M. Isolation of both varieties of *Cryptococcus neoformans* from saprophytic sources in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **J. Med. Vet. Mycol.**, Oxfordshire, v. 31, n. 4, p. 449-454, Jul./Aug. 1993.

LEAL, A.L. Diferenciação das espécies de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gatti* utilizando a metodologia de PCR multiplex e determinação do perfil epidemiológico de pacientes com meningite criptocócica no Estado do Rio Grande do Sul. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

LEAL A.L. et al. Epidemiological Profile of Cryptococcal Meningitis Patients in Rio Grande do Sul, Brazil. **Mycopathologia**, Doedrecht, v. 166, n. 2, p. 71-75, Aug. 2008.

LEE, S.C.; DICKSON, D.W.; CASADEVALL, A. Pathology of cryptococcal meningoencephalitis: analysis of 27 patients with pathogenetic implications. **Hum. Pathol.**, Philadelphia, v. 27, n. 8, p. 839-847, Aug. 1996.

LENGELER, K.B.; COX, G.M.; HEITMAN, J. Serotype AD strains of *Cryptococcus neoformans* are diploid or aneuploid and are heterozygous at the mating-type locus. **Infect. Immun.**, Washington, v. 69, n. 1, p. 115-122, Jan. 2001.

LEVITZ, S.M.; BOEKHOUT, T. *Cryptococcus*: the once-sleeping giant is fully awake. **FEMS Yeast Res.**, Oxford, v. 6, p. 461-462, May 2006.

LINDENBERG, A.S.C. et al. Clinical and epidemiological features of 123 cases of Cryptococcosis in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, São Paulo, v. 50, n. 2, p. 75-78, Mar./Apr. 2008.

MARTINEZ, L.R.; GARCIA-RIVERA, J.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotype D) strains are more susceptible to heat than *C. neoformans* var. *grubii* (serotype A) strains. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 39, n. 9, p. 3365-3367, Sep. 2001.

MARTINEZ, L.R. et al. Characterization of phenotypic switching in *Cryptococcus neoformans* biofilms. *Mycopathologia*, Dordrecht, v. 166, n. 4, p. 175-180, Oct. 2008.

MASUR, H. HIV-Related opportunistic Infections are still relevant in 2015. **Top Antivir Med**, San Francisco, v. 23, n. 3, p. 119-119, Aug/Sep., 2015.

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

MEYER, W. et al. Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 31, n. 9, p. 2274-2280, Sep. 1993.

MEYER, W.; MITCHELL, T.G. Polymerase chain reaction fingerprinting in fungi using single primers specific to minisatellites and simple repetitive DNA sequences: strain variation in *Cryptococcus neoformans*. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 16, n. 9, p. 1648-1650, Sep. 1995.

MEYER, W. et al. Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **Med. Mycol.**, London, v. 47, n. 6, p. 561-570, 2009.

MEYER, W.; TRILLES, L. Genotyping of the *Cryptococcus neoformans*/*C. gattii* Species complex. **Australian Biochemist.**, Austrália, v. 41, n. 1, p. 12-15, Apr. 2010.

MEZZARI, A. et al. Criptococose em um Hospital Público de Porto Alegre: dados epidemiológicos. **J. Inf. Control**, Brasília, n. 3, v. 2, p. 135-139, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim epidemiológico HIV-AIDS**. Brasília, 2014.

MITCHELL, A.P. Updated view of *Cryptococcus neoformans* mating type and virulence. **Infect. Immun.**, Washington, v. 71, n. 9, p. 4829-4830, Sep. 2003.

MITCHELL, T.G.; PERFECT, J.R. Cryptococcosis in the era of AIDS – 100 years after the Discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v. 8, n. 4, p. 515-548, Oct. 1995.

MORA, D.J. et al. Genotype and mating type distribution within clinical *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates from patients with cryptococcal meningitis in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. **Med. Mycol.**, London, v. 48, n. 4, p. 561-569, Jun. 2010.

MORA, D.J. et al. Clinical, Epidemiological and Outcome Features of Patients with Cryptococcosis in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. **Mycopathologia**, Doedrecht, n. 5-6, v. 173, p. 321-327, Jun. 2012.

MOREIRA, T.A. et al. Criptococose: estudo clínico-epidemiológico, laboratorial e das variedades do fungo em 96 pacientes. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 39, n. 3, p.255-258, May/Jun. 2006.

MUSUBIRE, A.K. et al. Diagnosis and Management of Cryptococcal Relapse. **JAIDS Clin. Res.**, Sunnyvale, suplemento 3, n. 3, Dec. 2013.

NASSER, N. et al. Primay cutaneous cryptococcosis in an immunocompetent patient. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, n. 86, v. 6, p. 1178-1180, Nov./Dec., 2011.

OLSZEWSKI, M.A. et al. Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion. **Am. J. Pathol.**, Philadelphia, v. 161, n. 5, p. 1761-1771, May 2004.

OKABAYASHI, K. et al. Serotypes and mating types of clinical isolates from feline cryptococcosis in Japan. **J. Vet. Med. Sci.**, Tokyo, v. 68, n. 1, p. 91-94, Jan. 2006.

PAPPALARDO, M.C.S.M.; MELHEM, M.S.C. Cryptococcosis: a review of the Brazilian experience for the disease. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, São Paulo, v. 45, n. 6, p. 299-305, Nov./Dec. 2003.

PAPPAS, P.G. Cryptococcosis in the Developing World: An Elephant in the Parlor. **Clin. Infect. Dis.**, Oxford, v. 50, n. 3, p. 345-346, Feb. 2010.

PARK, B.J. et al. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. **AIDS**, London, v. 23, n.4, p. 525-530, Feb. 2009.

PASCHOAL, A.C. et al. Neurocryptococcosis: diagnosis by PCR Method. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, São Paulo, v. 46, p. 203-207, Jul./Aug. 2004.

PEDROSO, R.S.; CANDIDO, R.C. Diagnóstico Laboratorial da Criprococose. **NewsLab**, São Paulo, ed.77, 2006.

PEDROSO, R.S. et al. Evaluation of the experimental inoculation of *Cryptococcus albidus* and *Cryptococcus laurentii* in normal mice: virulence factors and molecular profile before and after animal passage. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 168, n. 2, p. 59-72, Aug. 2009.

PEDROSO, R.S. et al. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* – Pathogenicity of environmental isolates correlated to virulence factors, susceptibility to fluconazole and molecular profile. **Mem. Inst. O. Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, n. 8, p. 993-1000, Dec. 2010.

PERFECT, J.R; BICANIC, T. Cryptococcosis diagnosis and treatment: What do we know now. **Fungal Genet. and Biol.**, Orlando, v. 78, p. 49-54, May 2015.

PERFECT, J.R; CASADEVALL, A. Cryptococcosis. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, Philadelphia, n. 16, v. 4, p. 837-874, Dec. 2002.

PERFECT, J.R.; CASADEVALL, A. The history of *Cryptococcus* and cryptococcosis. In HEITMAN J., KOZEL T.R., KWON-CHUNG K.J., PERFECT J.R., CASADEVALL A. ***Cryptococcus: from human pathogen to model yeast***. Washington, p.17-26, 2011.

PERFECT, J.R. et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of America. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, n. 50, v. 3, p. 291-332, Feb. 2010.

PFEIFFER, T.J.; ELLIS, D.H. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from *Eucalyptus tereticornis*. **J. Med. Vet. Mycol.**, Oxford, v. 30, n. 5, p. 407-408, Oct. 1992.

RAJASINGHAM, R. et al. Nosocomial Drug-Resistant Bacteremia in 2 Cohorts with Cryptococcal Meningitis, Africa. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 20, n. 4, p. 722–724, Apr. 2014.

SALAS, S.D. et al. Effect of the laccase gene, *CNLAC 1*, on virulence of *Cryptococcus neoformans*. **J. Exp. Med.**, New York, v. 184, n. 2, p. 377-386, Aug. 1996.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3ed. New York: Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001.

SANTANGELO, R. et al. Role of extracellular phospholipases and mononuclear phagocytes in dissemination of cryptococcosis in a murine model. **Infect. Immun.**, Washington, v. 72, n. 4, p. 2229-2239, Apr. 2004.

SEGAL, E.; BAUM, G.L. **Pathogenic yeasts and yeasts infections**. CRC Press: Boca Raton, p.238, 1994.

SEVERO, L.C.; BERTA-E-ZARDO, I.; LONDERO, A.T. Cutaneous cryptococcosis due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. **Rev. Iberoam. Micol.**, Bilbao, v. 18, n. 4, p. 200-201, Dec. 2001.

SEVERO, C.B.; GAZZONI, A.F.; SEVERO, L.C. Criptococose pulmonar. **J. Bras. Pneumol.**, Brasília, v. 35, n. 11, p. 1136-1144, Nov. 2009.

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

SLOAN, D. J.; PARRIS, V. Cryptococcal meningitis: epidemiology and therapeutic options. **J. Clin. Epidemiol.**, Oxford, v. 6, p. 169-182, May 2014.

SOUZA, L.K.H. et al. Clinical and microbiological features of cryptococcal meningitis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 46, n. 3, p. 343-347, May/Jun., 2013.

STEELE, K.T. et al. In-hospital mortality of HIV-infected cryptococcal meningitis patients with *C. gattii* and *C. neoformans* infection in Gaborone, Botswana. **Med. Mycol.**, Boca Raton, v. 48, n. 8, p. 1112-1115, May 2010.

TEWARI, A. et al. Comparative Analysis of the Vitek 2 Antifungal Susceptibility System and E-test with the CLSI M27-A3 Broth Microdilution Method for Susceptibility Testing of Indian Clinical Isolates of *Cryptococcus neoformans*. **Mycopathologia**, Doedrecht, n. 5-6, v. 173, p. 427-433, Jun. 2012.

TRILLES, L. et al. Regional pattern of the molecular type of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio

de Janeiro, v. 103, n. 5, p. 455-462, Aug. 2008.

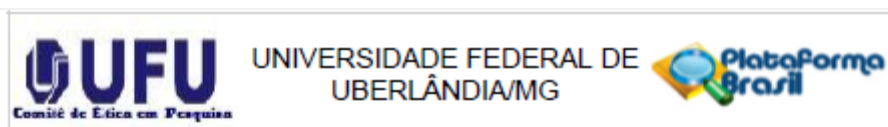
XIE, S. et al. Difference in *Cryptococcus neoformans* cellular and capsule size in sequential pulmonary and meningeal infection: a postmortem study. **Diagn. Microbiol. Infect Dis.**, New York, v. 73, p. 49-52, Mar. 2012.

YEO, S.F., WONG, B. Current status of nonculture methods for diagnosis of invasive fungal infections. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v. 15, p. 465-484, Jul. 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Rapid Advice Diagnosis, Prevention and Management of Cryptococcal Disease in HIV –infected Adults, Adolescents and Children.** Geneva, 40 p., 2011.

9- ANEXOS

9.1- Anexo 1: Parecer Consubstanciado do CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização de isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans* do Hospital de Clínicas de Uberlândia

Pesquisador: Reginaldo dos Santos Pedroso

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 09899013.8.0000.5152

Instituição Proponente:

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 357.803

Data da Relatoria: 19/07/2013

Apresentação do Projeto:

Segundo apresenta o protocolo:

Os fungos do complexo *Cryptococcus neoformans*, incluindo *C. neoformans* e *C. gattii*, são importantes patógenos humanos, principalmente para pacientes imunocomprometidos. Estas espécies apresentam fatores relacionados à virulência que são essenciais para a colonização, disseminação e desenvolvimento da infecção. Os pacientes imunocomprometidos, especialmente com aids, são os mais envolvidos atualmente. Desta forma, o estudo dos isolados clínicos é interessante para a epidemiologia regional e nacional, juntamente com a caracterização dos sorotipos, tipos sexuais e genotipagem, que permitem comparar a frequência e relação dos isolados com os das diferentes regiões do país, e de outros países. Assim, o presente estudo pretende estudar os isolados clínicos do complexo *C. neoformans*, do Hospital de Clínicas de Uberlândia, que foram armazenados no Setor de Micologia, no período compreendido entre 2004 e 2012, relatando a frequência de sorotipos, tipos sexuais, tipagem molecular e o perfil de sensibilidade *in vitro* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol, itraconazol e voriconazol. Além destes, objetiva ainda analisar *in vitro* a plasticidade fenotípica (phenotypical switching), determinando o perfil de sensibilidade aos antifúngicos dos isolados que apresentarem colônias lisas e mucóides comparando com os mutantes com colônias secas e enrugadas. Os resultados

permitirão conhecer a epidemiologia local dos isolados, e caracterizá-los fenotípica e genotipicamente.

Metodologia:

- Amostra de estudo: Serão incluídas no estudo todas as amostras de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* que foram isoladas e mantidas no Laboratório de Micologia Clínica do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas de Uberlândia, no período de 2004 a 2012, a partir de quaisquer amostras clínicas, isoladas de indivíduos com idade igual ou maior que 18 anos. As amostras são mantidas em ágar Sabouraud dextrose (ASD), à temperatura ambiente, com transferências trimestrais para outros tubos contendo ASD com cloranfenicol. Será feito estudo retrospectivo, dos prontuários dos pacientes cujos isolados de *C. neoformans* ou *C. gattii* do período do estudo, estejam armazenados no Setor de Micologia do Laboratório de Análises Clínicas do HC-UFU, relacionando as drogas utilizadas para tratamento, contagem de CD4 e CD8, desfecho clínico, e características fenotípicas e moleculares do agente etiológico. O estudo será executado conforme autorização das unidades da UFU envolvidas: Hospital de Clínicas, Laboratório de Análises Clínicas e Curso Técnico em Análises Clínicas da Escola Técnica de Saúde.

- Identificação dos isolados Para a identificação das leveduras serão realizadas microcultura, análise microscópica, pesquisa de cápsula com tinta nanquim, e testes bioquímicos e fisiológicos clássicos (LACAZ, 2002) a partir de inóculos recentes em ágar Sabouraud, incubados a 30°C, durante 24-48 horas.

- Caracterização fenotípica dos isolados O fenótipo da colônia (plasticidade fenotípica ou phenotypical switching) será determinado pela semeadura de uma suspensão de leveduras em solução fisiológica esterilizada, com turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de MacFarland, na superfície de Agar Sabouraud contido em placas de Petri 90x15mm, e incubação a 30°C, durante 7 dias. As colônias serão examinadas quanto ao tamanho, diâmetro, textura e forma (FRANZOT et al., 1998), sendo que cada fenótipo reisolado será tratado como um isolado diferente. Para a avaliação da produção de melanina, será preparada uma suspensão como descrita anteriormente. A seguir, com auxílio de alça calibrada descartável esterilizada de 1 µL, serão semeados pela técnica de esgotamento hibridização de DNA-fingerprinting clássicos para detectar sequências de DNA minissatélites e microsatélites. Posteriormente, os oligonucleotídeos utilizados passaram a ser os primers únicos em PCR para detectar fragmentos de DNA hipervariáveis no genoma de *C. neoformans* e espécies relacionadas. Os mais utilizados são iniciadores que detectam sequências minissatélites, como a sequência do core do fago M13, e sequências microsatélites, como (GTG)_n.

e (GACA)4. Os perfis eletroforéticos resultantes da amplificação com estes primers são altamente reprodutíveis e mostram variações entre espécies, variedades intraespécies (MEYER et al., 1993; 2003; MORA et al., 2010).

A produção de melanina será evidenciada pela coloração das colônias. Os isolados com iguais intensidades de pigmentação serão agrupados, recebendo a classificação conforme o escore de cores apresentadas: 0 (ausência de pigmento), 1 (marrom claro), 2 (marrom), 3 (marrom escuro) e 4 (preta). *C. neoformans* ATCC 90112 será utilizado como controle positivo (escore 3), e *C. albicans* ATCC 90028, como controle negativo (escore 0).

- Determinação da sensibilidade às drogas antifúngicas A determinação da sensibilidade será feita por dois métodos. Pelo teste de difusão de disco em ágar, conforme recomendado pelo documento M44-A2 do CLSI (2009), e pelo sistema comercial Vitek 2 (BioMérieux, Paris, France). A técnica de difusão do disco será feita conforme descrito a seguir. Os discos (fluconazol, itraconazol, voriconazol e anfotericina B) serão distribuídos de forma equidistante em placas de Petri (90 mm de diâmetro), contendo ágar Mueller-Hinton modificado (suplementado com 2% de glicose e 0,5 µg/mL de azul de metileno). Serão utilizadas as cepas controle *C. albicans* ATCC 90028 e *C. parapsilosis* ATCC 22019, para validação dos resultados. Cada isolado de *Cryptococcus* sp será subcultivado em placas de ágar Sabouraud dextrose, incubadas à temperatura de 35-37°C por 24-48 horas. Critério de Inclusão: O grupo de estudo será constituído por todos os isolados de *Cryptococcus* spp., obtidos de pacientes com idade igual ou maior que 18 anos, atendidos no HCU-UFU, no período de 2004 a 2012, armazenados no Setor de Micologia do Laboratório de Análises Clínicas do HC-UFU.

Critério de Inclusão: O grupo de estudo será constituído por todos os isolados de *Cryptococcus* spp., obtidos de pacientes com idade igual ou maior que 18 anos, atendidos no HCU-UFU, no período de 2004 a 2012, armazenados no Setor de Micologia do Laboratório de Análises Clínicas do HC-UFU.

Critério de Exclusão: Serão excluídos do estudo: 1) aqueles indivíduos cujos isolados de *Cryptococcus* spp. tenham sido perdidos durante o armazenamento, 2) aqueles indivíduos que tiverem outras espécies de *Cryptococcus* spp. isoladas de algum sítio, excetuando-se as do complexo *C. neoformans*, 3) os indivíduos fora da faixa etária proposta no estudo.

Metodologia de Análise de Dados: Os isolados de *Cryptococcus* sp serão identificados a nível de espécie, confirmando morfologia, teste de crescimento em meios líquidos e a frequência será expressa em valores percentuais.

e relativos. Os resultados dos testes de sensibilidade aos antifúngicos serão expressos em milímetros e interpretados como S (sensível), I (intermediário) e R (resistente) como mostrado no Quadro 2, os obtidos pelo Sistema Vitek 2, expressos em g/mL, interpretados conforme instruções do fabricante. O perfil molecular será visualizado pela construção de dendrogramas, que possibilitarão verificar a relação genética entre os isolados. De posse destes dados, será possível relacioná-los entre si e com a condição clínica do paciente no momento da coleta da amostra para isolamento do agente em estudo, e com a evolução clínica do mesmo (alta, recidiva ou óbito).

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Caracterizar a frequência e os isolados clínicos de *Cryptococcus* ocorridos no HCU-UFU no período de 2004 a 2012.

Objetivos Secundários:

- Determinar sorotipo e mating type dos isolados, por métodos moleculares;
- Determinar a sensibilidade aos antifúngicos fluconazol, itraconazol, voriconazol e anfotericina B;
- Caracterizar a frequência do fenótipo switching (plasticidade fenotípica) entre os isolados e correlacionar com o perfil de sensibilidade aos antifúngicos;
- Analisar a evolução clínica dos pacientes infectados com isolados que apresentaram o fenótipo de plasticidade in vitro;
- Determinar sorotipo e mating type dos isolados, por métodos moleculares;
- Determinar a sensibilidade aos antifúngicos fluconazol, itraconazol, voriconazol e anfotericina B;
- Caracterizar a frequência do fenótipo switching (plasticidade fenotípica) entre os isolados e correlacionar com o perfil de sensibilidade aos antifúngicos;
- Analisar a evolução clínica dos pacientes infectados com isolados que apresentaram o fenótipo de plasticidade in vitro.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos segundo os pesquisadores:

O risco existente durante a realização da pesquisa é o da revelação da identidade dos participantes. Porém, considerando a conduta e a forma de avaliar os dados dos sujeitos que participarem da pesquisa, e o trabalho independente dos pesquisadores envolvidos na execução dos experimentos in vitro, esse evento será reduzido ao mínimo. A identidade desses será mantida sob sigilo profissional, em todas as instâncias, sendo conhecida apenas pelos pesquisadores principais e pelos médicos especialistas que acompanham ou acompanharam os pacientes.

Benefícios segundo os pesquisadores:

Como benefício, o resultado da pesquisa poderá fornecer informações que contribuirão para o direcionamento da conduta clínica e profilaxia do agravamento da infecção, e ainda permitirá conhecer o perfil microbiológico dos isolados do complexo *C. neoformans* na população em estudo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa apresenta importância científica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos obrigatórios foram apresentados.

Recomendações:**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

A pendência "Retirar o TCLE do protocolo. Tanto o anexo da plataforma, quanto do projeto em anexo", apontada no parecer 332.125, foi atendida.

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, o CEP manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Data para entrega de Relatório Parcial ao CEP/UFU: dezembro de 2014.

Data para entrega de Relatório Final ao CEP/UFU: dezembro de 2015.

OBS.: O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA

10. APENDICES

10.1- Apêndice 1: Ficha para levantamento de dados dos prontuários

FICHA PARA ANÁLISE DE PRONTUÁRIOS

Paciente (iniciais do nome):

Ident. no projeto (n^o):

Sexo

() M () F

Idade

() ≤ 10 anos () 11 a 20 anos () 21 a 30 anos () 31 a 40 anos () 41 a 50 anos () 51 a 60 anos () 61 a 69 anos () ≥ 70 anos

Procedência

() Zona Urbana () Zona Rural Município:

Profissão

Quadro Clínico

() Criptococose SNC () Criptococose pulmonar () Criptococose cutânea

() Criptococose disseminada ()

Outros _____

Queixas (sinais e sintomas no diagnóstico)

Diagnóstico

() Clínico+cultura () clínico+microscopia+cultura () clínico+microscopia+cultura+ látex

() outros

Quanto tempo após internação / suspeita clínica ocorreu a confirmação?

Estado Imunológico

() Imunocompetente () Imunodeprimido

Qual doença de base?

Leucometria:

Se AIDS:

Carga viral: () Não se aplica () < 50 cópias de RNA/mL () < 10.000 cópias de RNA/mL () 10.000 a 100.000 cópias de RNA/mL () > 100.000 cópias de RNA/mL

Contagem de CD4: () Não se aplica () ≤ 200 cels./mm³ () 200 a 350 cels./mm³ () 351 a 499 cels./mm³ () ≥ 500 cels./mm³

Duração da internação:

Tratamento Antifúngico

() Não () Sim

Dose: _____

Antifúngico: _____

Tempo de Tratamento

Evento adverso com o tratamento antifúngicos

() Não () Sim Qual _____

Recorrência

() Não () Sim

Confirmada microbiologicamente? () sim () não

Quanto tempo?

Na vigência de tratamento () sim () não

Infecções por outros Microorganismos

() Não () Sim

Microorganismo: _____

Evolução da doença

() Cura () Óbito

Após quanto tempo do diagnóstico?

Antifúngicos utilizados neste período?

Sequelas () não () sim

Quais _____