

**MARIÊ DOS SANTOS GOMES**

**CRIOCOCOSE EM HOSPITAL DE REFERÊNCIA EM MATO GROSSO SUL:  
CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA, FENOTÍPICA E GENÉTICA**

**CAMPO GRANDE  
2011**



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

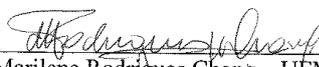
Programa de Pós Graduação em  
Doenças Infecciosas e Parasitárias

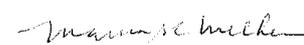


## TERMO DE APROVAÇÃO

A dissertação intitulada “**Criptococose em hospital de referência em Mato Grosso do Sul: caracterização epidemiológica, fenotípica e genética**”, apresentada à banca examinadora por **MARIÊ DOS SANTOS GOMES**, como exigência para a obtenção do título de Mestre em Doenças Infecciosas e Parasitárias, na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, obteve aprovação.

BANCA EXAMINADORA:

  
\_\_\_\_\_  
Marilene Rodrigues Chang – UFMS

  
\_\_\_\_\_  
Márcia de Souza Carvalho Melhem – INSTITUO ADOLFO LUTZ

  
\_\_\_\_\_  
Sonia Maria Fernandes – UFMS

\_\_\_\_\_  
Anamaria de Mello Miranda Paniago – UFMS

Campo Grande, 02 de agosto de 2011.

**MARIÊ DOS SANTOS GOMES**

**CRÍPTOCOCOSE EM HOSPITAL DE REFERÊNCIA EM MATO GROSSO DO SUL:  
CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA, FENOTÍPICA E GENÉTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias, curso de Mestrado, da Faculdade de Medicina “Doutor Hélio Mandetta”, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre em Doenças Infecciosas e Parasitárias, sob orientação da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marilene Rodrigues Chang.

**CAMPO GRANDE  
2011**

## DEDICATÓRIA

A Deus, e a Nossa Senhora do Perpétuo Socorro,  
pela força e amparo

Aos meus pais, Luiz Antônio e Margarida, que  
sempre incentivaram meu desenvolvimento pessoal  
e profissional, e sempre acreditaram na minha  
capacidade.

Ao meu querido avô Duílio, que nos deixou este ano,  
figura de grande importância na minha vida e de  
quem sinto muitas saudades.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora, Dra. Marilene Rodrigues Chang, pela oportunidade, confiança e dedicação para a realização deste trabalho.

À Maína de Oliveira Nunes, do Laboratório de Micologia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, pelo ensinamento da técnica de antifungigrama e esclarecimento de dúvidas.

À companheira de mestrado, Chrystiane Rodrigues Pasa, pela amizade, conselhos e ajuda em todo o trabalho.

À Dra. Luciana Trilles da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ/RJ, pelo curso de capacitação em biologia molecular e pela disposição para o esclarecimento de dúvidas.

À Dra. Maria de Fátima Cepa Matos, pela disponibilidade do Laboratório de Biologia Molecular e Culturas Celulares.

Ao doutorando Manoel Sebastião da Costa Lima Junior, pelo acompanhamento nas técnicas de biologia molecular e por todo auxílio prestado.

Aos colegas do Laboratório do Hospital Regional de Aquidauana, Ana Lima, Fabiana Dias, Luiz Guido e Tiago Nogueira, pela compreensão, permitindo que pudesse adequar meus horários de trabalho.

A todas as técnicas de laboratório do Departamento de Farmácia-Bioquímica da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, em especial Débora de Souza Olartechea e Fernanda Luiza Espinosa Sposito, pelo apoio na preparação dos materiais e meios de cultura utilizados na pesquisa.

Ao Dr. Albert Schiaveto de Souza, pelo auxílio na análise estatística.

À minha amiga Fernanda Friolli Pinto, pela contribuição na informática.

À minha tia Erotilde Ferreira dos Santos Miranda pela correção do português.

Aos professores e ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias, pelo conhecimento e oportunidade.

Ao Dr. Eriques G. da Silva, da Universidade de São Paulo, pela doação do voriconazol.

Aos meus familiares, amigos e namorado pela compreensão de minha ausência durante a realização deste trabalho.

Aos que deixo de citar, mas que colaboraram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

A criptococose é uma micose sistêmica causada pelos fungos *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. A infecção causada por *Cryptococcus neoformans* é cosmopolita, tem comportamento oportunista e acomete principalmente indivíduos imunodeprimidos. *Cryptococcus gattii* é endêmico em algumas regiões e acomete mais frequentemente indivíduos imunocompetentes. Os objetivos deste estudo foram descrever as características clínicas segundo infecção pelo vírus da imunodeficiência humana, bem como caracterizar fenotípica e geneticamente as leveduras isoladas de pacientes com criptococose atendidos no Hospital Universitário de Mato Grosso do Sul no período de maio de 1997 a dezembro de 2008. A identificação da espécie foi realizada pelo cultivo em meio L-cavanina-glicina-azul de bromotimol. A determinação da suscetibilidade antifúngica frente ao fluconazol, itraconazol, voriconazol e anfotericina B foi realizada de acordo com o documento M27-A3, padronizado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute*. Para a determinação do tipo molecular foi utilizada a técnica *Restriction Fragment Length Polymorphism* - URA5. Cento e dezesseis casos foram estudados, 82,8% dos pacientes eram portadores do HIV e, em oito, nenhum fator predisponente foi observado. Poucos pacientes (20,8%) faziam o uso de antiretroviral. A forma clínica mais comum foi meningoencefalite (65,5%) seguida de infecção disseminada (22,4%). A letalidade geral foi de 51,8% e entre os HIV positivos de 53,1%. *Cryptococcus neoformans* foi responsável pela infecção em 92,2% dos casos. Nenhuma levedura foi resistente aos antifúngicos testados. Os tipos moleculares encontrados foram VNI (87,9%), VNII (4,3%) e VGII (7,8%). A descrição dos achados clínicos, suscetibilidade antifúngica e tipagem molecular devem contribuir para a epidemiologia molecular da criptococose nacional.

Palavras-chaves: criptococose, epidemiologia, suscetibilidade antifúngica, tipagem molecular.

## ABSTRACT

Cryptococcosis is a systemic mycosis caused by the fungi *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. The infection caused by *Cryptococcus neoformans* is cosmopolitan, has opportunistic behavior and affects mainly immunocompromised individuals. *Cryptococcus gattii* is endemic in some regions, and affects most often immunocompetent individuals. The objectives of this study were to describe the clinical features according to human immunodeficiency virus (HIV) infection, as well as to characterize phenotypically and genetically the yeasts isolated from the patients with cryptococcosis treated at University Hospital of Mato Grosso do Sul in the period of May 1997 to December 2008. The identification of the species was performed by the growth on L-cavanine-glycine-bromthymol blue media. The determination of antifungal susceptibility to fluconazole, itraconazole, voriconazole and amphotericin B was performed in accordance with the M27-A3 document, standardized by the *Clinical and Laboratory Standards Institute*. The technique *Restriction Fragment Length Polymorphism -URA5* was used to determine the molecular type. A hundred and sixteen cases were studied, 82.8% were HIV-positive patients and in eight no predisposing factor was observed. Few patients (20.8%) were using antiretroviral. The most common clinical presentation was meningoencephalitis (65.5%) followed by disseminated infection (22.4%). Overall mortality was 51.8% and among HIV positive 53.1%. *Cryptococcus neoformans* was responsible for the infection of 92.2% of the cases. No yeast was resistant to antifungal agents tested. The molecular types found were VNI (87.9%), VNII (4.3%) and VGII (7.8%). The description of the clinical findings, antifungal susceptibility and molecular typing should contribute to the national cryptococcosis molecular epidemiology.

Keywords: cryptococcosis, epidemiology, antifungal susceptibility, molecular typing.

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Variação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de cepas de referência (CLSI, 2008) .....39
- Tabela 2 - Características demográficas de pacientes com criptococose segundo infecção pelo HIV, Campo Grande-MS, maio de 1997 a dezembro de 2008.....47
- Tabela 3 - Características clínicas de pacientes com criptococose segundo infecção pelo HIV, Campo Grande-MS, maio de 1997 a dezembro de 2008.....48
- Tabela 4 - Paciente com criptococose segundo tratamento, tempo de internação, evolução e infecção pelo HIV, Campo Grande-MS, maio de 1997 a dezembro de 2008.....50
- Tabela 5 - Espécies de *Cryptococcus* responsáveis pelos casos de criptococose segundo infecção pelo HIV, Campo Grande-MS, maio de 1997 a dezembro de 2008.....51
- Tabela 6 - Variação e média geométrica da concentração inibitória mínima (CIM) dos agentes antifúngicos segundo infecção pelo HIV e espécie de *Cryptococcus* isolado, Campo Grande-MS, maio de 1997 a dezembro de 2008.....52
- Tabela 7 - Tipos moleculares de *Cryptococcus* responsáveis pelos casos de criptococose segundo infecção pelo HIV, Campo Grande-MS, maio de 1997 a dezembro de 2008.....52

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Teste do meio CGB.....	29
Figura 2 -	Fluxograma do preparo das diluições de fluconazol.....	31
Figura 3 -	Fluxograma do preparo das diluições de anfotericina B, itraconazol e voriconazol.....	33
Figura 4 -	Desenho esquemático da distribuição dos antifúngicos nas microplacas.....	35
Figura 5 -	Desenho esquemático da distribuição do inóculo, controle de esterilidade e de crescimento nas microplacas.....	38
Figura 6 -	Perfil <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (RFLP) do gene URA5 duplamente digerido com <i>Sau96I</i> e <i>HhaI</i> das oito cepas padrão de <i>Cryptococcus</i> caracterizando os oito tipos moleculares conhecidos.....	43
Figura 7 -	Distribuição dos casos de criptococose, por ano de diagnóstico, Campo Grande-MS, maio de 1997 a dezembro de 2008.....	45
Figura 8 -	Perfil da amplificação do gene URA5 (734 pb) pela PCR de isolados de <i>Cryptococcus</i> .....	53
Figura 9 -	Perfil <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (RFLP) do gene URA5 duplamente digerido com <i>Sau96I</i> e <i>HhaI</i> dos isolados de <i>Cryptococcus</i> .....	53

## LISTA DE ABREVIATURAS

AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> – Polimorfismo de tamanho de fragmentos amplificados
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i> – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
AMB	Anfotericina B
ASD	Agar Sabouraud Dextrose
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
bp	<i>Bases pairs</i>
CC	Controle de Crescimento
CD4	Linfócito T <i>helper</i>
CD8	Linfócito T citotóxico
CE	Controle de Esterilidade
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CGB	Cavanina-Glicina-Azul de Bromotimol
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> – Ensaio de imunoadsorção enzimático
EUA	Estados Unidos da América
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FLC	Fluconazol
<i>Hhal</i>	Enzima de restrição obtida pelo gene <i>Haemophilus haemolyticus</i> (ATCC 10014)
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HU-UFMS	Hospital Universitário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
IFN- $\gamma$	Citocina Interferon gama

IL-2	Interleucina-2
IL-4	Interleucina-4
IL-5	Interleucina-5
IL-10	Interleucina-10
ITC	Itraconazol
KOH	Hidróxido de potássio
LACEN-MS	Laboratório Central de Mato Grosso do Sul
LCE	Líquido Cefaloespinal (líquor)
MOPS	Ácido 3-morfolinopropano-1-sulfônico
NCCLS	<i>National Commitee for Clinical Laboratory Standards</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
pb	Pares de base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> – Reação em Cadeia da Polimerase
RAPD	<i>Randomly amplified polymorphic DNA analysis</i> – Análise por DNA polimórfico amplificado ao acaso
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphisms</i> – Análise de fragmentos de DNA gerados por enzimas de restrição
RPMI 1640	Meio de cultura desenvolvido por <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
Sau96I	Enzima de restrição obtida pelo gene de <i>Staphylococcus aureus</i> PS96 (ATCC 49831)
SDD	Sensível dose dependente
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida
SNC	Sistema Nervoso Central
TBE	Tris-borate-EDTA
Th1	T <i>helper</i> 1
Th2	T <i>helper</i> 2
URA5	Gene da enzima ortidina monofosfato pirofosforilase
USP	Universidade de São Paulo
VRC	Voriconazol

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
<b>2.1 Agente etiológico</b> .....	14
2.1.1 Caracterização molecular .....	16
<b>2.2 Eco-epidemiologia</b> .....	17
<b>2.3 Patogênese e formas clínicas</b> .....	19
<b>2.4 Diagnóstico laboratorial</b> .....	21
2.4.1 Teste de suscetibilidade antifúngica .....	22
<b>2.5 Tratamento</b> .....	23
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	26
<b>3.1 Objetivo geral</b> .....	26
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	26
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	27
<b>4.1 Tipo de estudo</b> .....	27
<b>4.2 Local e período</b> .....	27
<b>4.3 Sujeitos da pesquisa</b> .....	27
<b>4.4 Procedimentos para coleta de dados</b> .....	27
<b>4.5 Procedimentos em laboratório</b> .....	28
4.5.1 Identificação da espécie .....	28
4.5.2 Determinação da suscetibilidade antifúngica .....	29
4.5.2.1 Antifúngicos .....	29
4.5.2.2 Preparo das microplacas com antifúngico .....	30
4.5.2.3 Preparo do inóculo .....	36
4.5.2.4 Teste de suscetibilidade antifúngica .....	36
4.5.2.5 Leitura e interpretação dos resultados .....	39
4.5.3 Tipagem molecular .....	40
4.5.3.1 Tipos moleculares de referência .....	40
4.5.3.2 Extração do DNA genômico .....	40
4.5.3.3 RFLP ( <i>Restriction Fragment Length Polymorphisms</i> ) – URA5 .....	41
4.5.3.3.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) .....	41
4.5.3.3.2 Eletroforese da amplificação de DNA .....	42
4.5.3.3.3 Reação de RFLP .....	42
4.5.3.3.4 Eletroforese do RFLP .....	42
4.5.3.3.5 Análise dos perfis gerados pelo RFLP .....	43
<b>4.6 Organização e análise dos dados</b> .....	43
<b>4.7 Considerações éticas</b> .....	44
<b>5 RESULTADOS</b> .....	45
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	54
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	65
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	67
<b>APÊNDICES</b> .....	79
<b>ANEXOS</b> .....	84

## 1 INTRODUÇÃO

A criptococose é uma micose sistêmica causada por *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. A doença é adquirida pela inalação de propágulos infectantes. A partir do pulmão o fungo pode disseminar para outros órgãos por via hematogênica, com especial tropismo pelo sistema nervoso central, sendo meningoencefalite a forma clínica mais descrita.

*Cryptococcus neoformans* tem distribuição cosmopolita e comportamento oportunista, acometendo principalmente pacientes imunodeprimidos, como na AIDS e no uso de drogas imunossupressoras. Estima-se que no Brasil 4,5% de todas as infecções oportunistas em pacientes com AIDS relatadas são causadas por *C. neoformans*.

Por outro lado, *Cryptococcus gattii* é prevalente em áreas tropicais e subtropicais e acomete, em sua maioria, indivíduos imunocompetentes. A infecção primária usualmente é pulmonar e em muitos casos subclínica, por isso, de difícil diagnóstico.

A infecção por esta espécie em geral costuma ser mais agressiva e de difícil tratamento, pode evoluir para lesão pulmonar progressiva inclusive em pacientes imunocompetentes.

A possibilidade da emergência de *Cryptococcus* resistentes aos antifúngicos de uso recorrente tem motivado a realização de muitos estudos.

A avaliação da suscetibilidade antifúngica desse agente, ainda não disponível nos Hospitais de Mato Grosso do Sul, é de grande interesse considerando a severidade das manifestações clínicas e a alta frequência da criptococose na região. O monitoramento de resistência também é importante, tendo em vista que a resistência observada *in vitro* pode predizer falha terapêutica.

A maioria dos estudos com *Cryptococcus*, na América Latina, está limitada aos aspectos clínicos e ambientais, poucas investigações têm estudado a epidemiologia molecular desses isolados. Essa avaliação torna-se importante, pois a variabilidade genética pode ser um fator determinante na patogenia da doença.

Com a pandemia da AIDS, no Brasil e no mundo, e o aumento do uso de drogas imunossupressoras, foi observado crescente aumento dos casos de criptococose associado à elevada letalidade. Dados da literatura regional sobre o tema ainda são escassos. Tendo em vista a importância do assunto, objetivou-se

estudar as características clínicas da doença, assim como o perfil molecular das espécies de *Cryptococcus* encontradas em hospital público do Mato Grosso do Sul e, ainda, conhecer o perfil de suscetibilidade aos antifúngicos, para auxiliar na conduta terapêutica de novos casos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

A criptococose é uma micose sistêmica causada por *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, uma levedura capsulada, que acomete principalmente indivíduos com a imunidade comprometida, em especial indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; MITCHELL; PERFECT, 1995; PASQUALOTTO et al., 2004). Muitos dos primeiros casos descritos foram associados a pacientes com doença neoplásica, mas nas últimas décadas houve um aumento significativo da doença, acompanhando a epidemia da AIDS e o aumento do uso de imunossupressores (BICANIC; HARRISON, 2004; JONGWUTIWES; SUNGKANUPARPH; KIERTIBURANAKUL, 2007).

A infecção acontece por inalação de leveduras desidratadas ou basidiósporos, comprometendo inicialmente os pulmões. A infecção primária pulmonar pode ser assintomática ou disseminar para outros órgãos por via hematogênica, com especial tropismo pelo sistema nervoso central (BICANIC; HARRISON, 2004; KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; MORETTI et al., 2008).

### 2.1 Agente etiológico

As primeiras descrições do *Cryptococcus* spp foi em 1894, na Alemanha, pelos médicos Otto Busse e Abraham Buschke, em uma paciente com lesão de tibia; e na Itália, por Francesco Sanfelice, em suco de pêssago. O nome dado, na época, por Sanfelice foi *Saccharomyces neoformans*, e por Busse foi *Saccharomyces hominis*. Em 1896, o patologista francês Ferdinand Curtis descreveu o fungo isolado de tumores de partes moles, nessa ocasião Busse deu ao fungo o nome de *Saccharomyces tumefaciens* (apud BIVANCO; MACHADO; MARTINS, 2006; apud KWON-CHUNG; BENNETT, 1992).

Em 1901, o micologista francês Jean-Paul Vuillemin classificou os fungos de Busse e Sanfelice no gênero *Cryptococcus* como *C. hominis* e *C. neoformans*, respectivamente. Em 1905, o fungo foi observado nas meninges por Hansemann; a seguir Stoddard e Cutler registraram dois casos de meningite e deram o nome ao fungo de *Torula histolytica*. Em 1935, Benham concluiu que os três diferentes

gêneros *Saccharomyce*, *Cryptococcus* e *Torula*, provavelmente, eram apenas uma espécie *C. hominis*, com duas variedades (*apud* BIVANCO; MACHADO; MARTINS, 2006; *apud* KWON-CHUNG; BENNETT, 1992).

Anteriormente, o fungo era classificado como *C. neoformans* variedade *neoformans* e *C. neoformans* variedade *gattii* (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992). Com o desenvolvimento de técnicas de biologia molecular, as variedades passaram a ser consideradas espécies distintas: *C. neoformans* e *C. gattii*, que apresentam diferenças bioquímicas, antigênicas, ecológicas e epidemiológicas (BICANIC; HARRISON, 2004; BOEKHOUT et al., 1997; DIAZ et al., 2000; KWON-CHUNG; VARMA, 2006; MORETTI et al., 2008).

O microrganismo possui cinco sorotipos conhecidos: A, D e AD, correspondentes à espécie *C. neoformans*; e B e C, correspondentes à *C. gattii* (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; PERFECT; CASADEVALL, 2002). A determinação da sorotipagem é baseada nas diferenças estruturais antigênicas presentes na cápsula de polissacarídeo (BICANIC; HARRISON, 2004; PERFECT; CASADEVALL, 2002).

Estudos com técnicas de biologia molecular possibilitaram a classificação dessa levedura em oito tipos moleculares: *C. neoformans* em VNI (sorotipo A), VNII (sorotipo A), VNIII (sorotipo AD) e VNIV (sorotipo D) e *C. gattii* em VGI, VGII, VGIII e VGIV (sorotipos B e C) (MEYER et al., 1999).

Em 1975, Kwon-Chung descobriu que *Cryptococcus* apresenta dois tipos sexuais, a e  $\alpha$ , e realizou experiências que revelaram que esse fungo apresenta a forma assexuada ou anamórfica de um basidiomiceto heterotático que foi chamado de *Filobasidiella neoformans* (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992). Em amostras clínicas e ambientais o fenótipo  $\alpha$  é o mais prevalente (SPRINGER; CHATUVERDI, 2010).

Quanto à morfologia, *Cryptococcus* é uma levedura globosa ou esférica de 5 a 10  $\mu\text{m}$  de diâmetro, pode apresentar brotamento único ou múltiplo, geralmente envolvida por uma cápsula de polissacarídeo que além de ser um importante fator de virulência é o substrato detectado em testes antigênicos (BICANIC; HARRISON, 2004; MITCHELL; PERFECT, 1995). Em cultura apresenta colônia de cor branca a creme, margem lisa, após 36 a 72 horas de incubação à temperatura de 25 a 37°C. As colônias são geralmente de aspecto mucóide, estando o grau de mucosidade

relacionado com a quantidade da cápsula (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; MITCHELL; PERFECT, 1995).

De acordo com dados da literatura, o crescimento do fungo é influenciado pela temperatura. *In vitro*, a temperatura de 39 a 40°C é capaz de diminuir a taxa de crescimento; na espécie *C. gattii* a temperatura de 40°C é capaz de matar a levedura em 24 horas; *in vivo*, a 41 °C o microrganismo é inibido ou morto (MITCHELL; PERFECT, 1995). Meios de cultura contendo cicloheximida também inibem o crescimento desse fungo (WINN; WESTENFELD, 2008).

Quanto ao metabolismo, *Cryptococcus* são microrganismos não fermentadores, não assimilam lactose, melibiose e nitrato de potássio, hidrolizam amido, assimilam glicose, maltose, sacarose, galactose, inositol, xilose, trealose, dulcitol manitol e peptona (LARONE, 1995).

São produtores de urease na presença de ureia, e a capacidade de produzir fenoloxidase é única. A produção dessa enzima tem sido usada para identificação, devido à produção do pigmento melanina, por oxidação de compostos difenólicos, o que dá às colônias coloração marrom em meio apropriado (Agar Níger), além de ser uma enzima antioxidante que melhora a sobrevivência da levedura no hospedeiro. A utilização de catecolaminas pela fenoloxidase pode explicar o neurotropismo do fungo (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; MITCHELL; PERFECT, 1995; PERFECT; CASADEVALL, 2002; WINN; WESTENFELD, 2008).

O crescimento e o tamanho da cápsula foram associados a dois fatores externos, concentração de pCO<sub>2</sub> e disponibilidade de ferro férrico. Em concentrações fisiológicas de pCO<sub>2</sub> e ferro férrico reduzido há uma grande produção de cápsula, já em concentrações ambientais a produção é menor. Como citado anteriormente, a cápsula é um importante fator de virulência, potencializa a infecção, diminui a inflamação, inibe a fagocitose e suprime a imunidade celular e humoral (MITCHELL; PERFECT, 1995).

### 2.1.1 Caracterização molecular

Com o avanço da biologia molecular várias técnicas foram desenvolvidas e tem sido usadas para o estudo do *Cryptococcus*. Entre essas: análise de fragmentos de DNA (ácido desoxirribonucléico) gerados por enzimas de restrição (RFLP),

análise por DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD), polimorfismo de tamanhos de fragmentos amplificados (AFLP), análise eletroforética do cariótipo celular em campo pulsátil (PFGE), reação em cadeia da polimerase (PCR) *fingerprinting*. Além de informações epidemiológicas estas técnicas têm revelado grande heterogeneidade entre as espécies (BOEKHOUT et al., 1997; BOEKHOUT et al., 2001; DIAZ et al., 2005; MEYER et al., 1999; MEYER et al., 2003; VIVIANI et al., 2006).

A técnica de RFLP tem sido utilizada para determinação do tipo molecular de *Cryptococcus*. Após a amplificação de um fragmento de DNA, enzimas de restrição catalisam clivagens endonucleotídicas em sítios determinados, após reconhecerem sequências específicas, tendo como produto fragmentos de DNA de tamanhos específicos. Esses fragmentos podem ser separados através de eletroforese em gel de agarose, de acordo com o peso molecular (BOTSTEIN et al., 1980). Pelos perfis moleculares gerados, essa técnica permite a diferenciação do tipo molecular entre cepas de uma mesma espécie, determinando o tipo molecular.

A PCR em tempo real representa um grande avanço nos métodos de biologia molecular. Pesquisas utilizando essa técnica de PCR têm sido realizadas, a fim de se obter um método de diagnóstico mais rápido e específico que PCR convencional. Essa técnica de amplificação é capaz de quantificar a concentração do produto de PCR gerado ao final de cada ciclo de reação, podendo também ser útil para o acompanhamento do tratamento antifúngico (BIALEK et al. 2002; VERON et al, 2009).

## 2.2 Eco-epidemiologia

De acordo com estudos prévios, existem importantes diferenças com relação ao hábitat e distribuição geográfica entre as espécies de *Cryptococcus*. A doença causada pela espécie *C. neoformans* acomete principalmente pacientes com alguma imunossupressão, em especial portadores do HIV (CHEN et al., 2000; NISHIKAWA et al., 2003). Caracteriza-se por ser cosmopolita e predominantemente urbana, tendo como nicho ecológico, solo contaminado por fezes ressecadas de aves, um ambiente rico em fontes de nitrogênio, como ureia e creatinina, e detritos de árvores

(ELLIS; PFEIFFER, 1990; ESCADÓN et al., 2006; KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; MORETTI et al., 2008).

Os pássaros não se tornam infectados por sua elevada temperatura corporal (41,5-43,3°C), entretanto, podem atuar como reservatórios (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; MITCHELL; PERFECT, 1995; SORRELL; ELLIS, 1997).

Em contraste, a criptococose causada pela espécie *C. gattii*, tem distribuição geográfica distinta, e esse tem sido isolado principalmente em regiões tropicais e subtropicais. Compromete em maior número indivíduos hígidos e provenientes da zona rural (CHEN et al., 2000; KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; NISHIKAWA et al., 2003).

A literatura clássica mostra que o microrganismo teve, como primeiro isolamento ambiental, material associado às árvores da espécie *Eucalyptus camaldulensis* (ELLIS; PFEIFFER, 1990), muito comum na Austrália, de onde foi exportada para outros países como Brasil, México, sul da Califórnia, sudeste da Ásia, África, etc. (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992). No Brasil, essa espécie foi isolada de ocos de diversas árvores como *Cássia grandis*, *Senna multijuga*, *Ficus microcarpa* e *Moquilea tomentosa* (LAZÉRA et al., 1996; LAZÉRA et al., 2000).

Casos de criptococose por *C. gattii* já foram reportados na América Latina, Peru, Colômbia, Argentina, Venezuela, Brasil, Austrália, Nova Guiné, países da África Central, sudeste da Ásia, México e Estados Unidos (MORETTI et al., 2008).

Na Colômbia, *C. gattii* foi isolado de detritos das árvores *Eucalyptus* spp. e *Laurus* spp., e *C. neoformans* de excretas de pássaros e de detritos das árvores *Eucalyptus* spp., *Laurus* spp. e *Pinus* spp. (ESCADÓN et al., 2006).

A incidência de criptococose tem aumentado com o aumento de pacientes imunocomprometidos, e com a epidemia da AIDS. Nesse grupo de pacientes, a doença tem sido reconhecida como principal causa de meningoencefalite, com elevada taxa de mortalidade (DARZÉ et al., 1999; LINDENBERG et al., 2008; PASQUALOTTO et al., 2004).

Dados da literatura mostram maior prevalência da infecção no sexo masculino, principalmente em adultos (OLIVEIRA; NEGREIROS; TREVISOLO-BITTERNCOURT, 2000; PASQUALOTTO et al., 2004). Entretanto, crianças também são vítimas da doença (ABADI et al., 1999). No Brasil, mais especificamente no Estado do Pará, o aumento de casos em crianças tem sido atribuído à migração da zona urbana para a zona rural, e ao desmatamento da região amazônica, onde há

predomínio da espécie *C. gattii*, bem como consequência de desnutrição e AIDS (CORRÊA et al., 1999).

### 2.3 Patogênese e formas clínicas

A propagação do fungo através do ar é elevada, visto que partículas viáveis no ambiente geralmente têm menos de 2 µm, sendo capazes de serem inaladas e alcançar os alvéolos pulmonares (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; LAZERA et al., 1996; MITCHELL; PERFECT, 1995).

Após a infecção a resposta imunológica celular inicial contra *Cryptococcus* parte dos macrófagos alveolares. A resposta mediada por linfócitos T *helper* (CD4) é essencial para proteger o hospedeiro da disseminação da doença controlando a resposta inflamatória granulomatosa no pulmão, enquanto linfócitos T citotóxico (CD8), células *Natural Killer* (NK) e fagócitos exercem importante atividade fungicida, que contribui para a defesa do hospedeiro (MITCHELL; PERFECT, 1995; PERFECT; CASADEVALL, 2002). Células T pulmonares respondem ao estímulo secretando citocinas padrão de T *helper* 1 (Th1): Interferon gama (IFN-γ) e Interleucina 2 (IL-2), e citocinas padrão de T *helper* 2 (Th2): Interleucina 4 (IL-4), Interleucina 5 (IL-5) e Interleucina 10 (IL-10), resultando em infiltrados de macrófagos e granulócitos (HUFFNAGLE et al., 1994; MITCHELL; PERFECT, 1995).

As apresentações clínicas estão diretamente relacionadas ao estado imunológico do hospedeiro (SORREL, 2001). O pulmão é a principal porta de entrada de *Cryptococcus*, após a infecção a doença pode evoluir de três formas: resolução espontânea, infecção latente ou infecção aguda. Essa evolução provavelmente depende do tamanho do inóculo, virulência da cepa e estado imunológico do hospedeiro (BICANIC; HARRISON, 2004; PERFECT; CASADEVALL, 2002).

A forma pulmonar é a segunda mais frequente, após o envolvimento do SNC. Quando sintomática predomina tosse com expectoração e febre, podendo ser assintomática em 1/3 dos casos. Manifesta-se, muitas vezes, com quadro semelhante à pneumonia e pode evoluir para insuficiência respiratória aguda, principalmente em indivíduos com AIDS. O complexo primário pulmonar-linfonodo

pode ser assintomático, tendo risco de reativação ou disseminação em hospedeiros imunodeprimidos (MITCHELL; PERFECT, 1995; MORETTI et al., 2008).

A forma clínica mais comum desta doença é a meningoencefalite e sem o tratamento adequado todos os casos tendem a evoluir ao óbito (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992). Na maioria dos pacientes essa forma clínica se manifesta de forma subaguda. Os principais sintomas apresentados são: cefaleia, febre e alteração do nível de consciência (BICANIC; HARRISON, 2004; MITCHELL; PERFECT, 1995; PERFECT; CASADEVALL, 2002).

A hipertensão intracraniana contribui significativamente na elevada morbimortalidade da doença e pode causar perda visual ou auditiva (BICANIC; HARRISON, 2004; MORETTI et al., 2008).

Em pacientes com AIDS a duração dos sintomas parece ser menor, a doença disseminada é mais comum e tem maior probabilidade de estar associada a outras infecções, como toxoplasmose e pneumocistose. Essas diferenças em relação ao indivíduo imunocompetente refletem o grau de imunossupressão causada pela AIDS (MITCHELL; PERFECT, 1995; PERFECT; CASADEVALL, 2002).

A criptococose cutânea primária é rara e causada pela inoculação traumática do patógeno na pele, já a criptococose cutânea secundária ocorre por disseminação hematogênica e pode funcionar como marcador de infecção disseminada (BIVANCO; MACHADO; MARTINS, 2006; KWON-CHUNG; BENNETT, 1992).

O comprometimento ocular decorre da disseminação hematogênica do foco pulmonar por contiguidade do sistema nervoso central, tendo como lesão mais frequente a coriorretinite e como principal sintoma a diplopia (MITCHELL; PERFECT, 1995; MORETTI et al., 2008).

O sistema geniturinário pode ser infectado por *Cryptococcus* principalmente na forma de pielonefrite e prostatite, esta última apresenta como sintomas urgência miccional, disúria, hematúria, dor suprapúbica e sintomas de obstrução vesical, entretanto, frequentemente é assintomática (MORETTI et al., 2008). A próstata pode funcionar como reservatório do fungo e pode ser responsável pelos casos de recidiva (CHANG et al., 2008; MITCHELL; PERFECT, 1995; PERFECT; CASADEVALL, 2002).

## 2.4 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico da criptococose raramente é um problema quando há elevada carga fúngica no líquido e nas lesões. Devido à presença de cápsula característica o fungo é facilmente visualizado nos preparados com tinta nanquim, além disso, os testes sorológicos apresentam alta sensibilidade e especificidade (BICANIC; HARRISON, 2004; MORETTI et al., 2008).

A levedura pode ser vista em diversos materiais clínicos como líquido cefaloespinal (LCE), escarro, lavado brônquico, urina, secreções, aspirado de medula óssea e de gânglios, fragmentos de tecidos e outros. No LCE, para se ter uma microscopia positiva, é estimado que a amostra tenha no mínimo  $10^3$  UFC/ml de células fúngicas. As células podem ser visualizadas após coloração com tinta nanquim, que mostra, em contraste negativo, as leveduras encapsuladas globosas com um ou mais brotamentos. Ocasionalmente, a cápsula pode não ser visualizada. A solução 0,1% de branco de calcoflúor é usada para a visualização em microscópio de imunofluorescência, e permite o rápido encontro da levedura, quando estas estão em número reduzido na amostra (BIVANCO; MACHADO; MARTINS, 2006; MORETTI et al., 2008; PERFECT; CASADEVALL, 2002; WINN; WESTENFELD, 2008).

Em cortes de tecido a cápsula não cora com corantes histológicos padrões, como hematoxilina-eosina, devido sua natureza mucopolissacarídea, permanecendo um espaço vazio rodeando a levedura. Outros corantes podem evidenciar melhor a levedura e a cápsula como ácido periódico de Schiff, mucicarmina, Fontana-Masson e prata-metenamina (BIVANCO; MACHADO; MARTINS, 2006; PERFECT; CASADEVALL, 2002; WINN; WESTENFELD, 2008).

Testes imunológicos detectam a presença de antígenos capsulares polissacarídeos criptocócicos com teste de aglutinação em látex ou ensaio de imunoabsorção imunoenzimático (ELISA), com aplicação mais importante no LCE e no soro (BICANIC; HARRISON, 2004; WINN; WESTENFELD, 2008). São mais sensíveis que o micológico direto e mais rápidos que a cultura. É indicado para testes primários, podendo substituir a tinta nanquim, mas nunca a cultura (WINN; WESTENFELD, 2008).

A capacidade de produção da enzima fenoloxidase leva a formação de melanina. Essa característica pode ser demonstrada na aquisição de pigmento

escuro quando crescido em meio de cultivo preparado com extrato de sementes (Agar Níger), o que diferencia o *Cryptococcus* de outras leveduras (KWON-CHUNG, BENNETT, 1999; MITCHELL; PERFECT, 1995).

Um meio contendo L-canavanina, glicina e azul de bromotimol (CGB) é usado para diferenciar as espécies. *Cryptococcus gattii* é resistente a L-canavanina e utiliza glicina como fonte de carbono e nitrogênio, provoca a mudança a cor do meio para azul cobalto através da alteração de pH, enquanto *Cryptococcus neoformans* mantém a cor verde conforme mostra a Figura 1 (KWON-CHUNG; POLACHECK; BENNETT, 1982).

#### 2.4.1 Teste de suscetibilidade antifúngica

Com o aumento da incidência de infecções fúngicas sistêmicas graves e o surgimento de novos agentes antifúngicos, houve interesse em se desenvolver métodos laboratoriais para auxiliar na escolha do tratamento.

Técnicas foram desenvolvidas, por comitês formados por especialistas, para estudar o perfil de suscetibilidade *in vitro* aos antifúngicos, caracterizando a preparação e o tamanho do inóculo, meio sintético utilizado, temperatura e tempo de incubação, definição do ponto de corte, além de estabeleceram faixas de referência da concentração inibitória mínima (CIM) para cepas padrões, utilizadas como controle de qualidade (CLSI, 2008; REX et al., 2001).

Alguns continentes têm seus próprios comitês, como o norte-americano, formalmente conhecido como *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS), e o europeu *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST).

Uma variedade de métodos foi desenvolvida para execução de antibiogramas: diluição em caldo (macro e microdiluição), diluição em agar e difusão em agar (disco-difusão e Etest®) (ANDRADE, 2004; DANNAOUI et al., 2006; FERNANDES et al., 2003; PFALLER et al., 2009; REX et al., 2001).

O método de microdiluição em caldo desenvolvido pelo NCCLS consiste em expor o inóculo do microrganismo a várias concentrações conhecidas da droga em um meio sintético e após incubação definir a menor concentração da droga capaz de inibir o crescimento do microrganismo (CLSI, 2008).

Métodos para testar a suscetibilidade antifúngica têm se tornado importante ferramenta para monitoramento *in vitro* do aparecimento de microrganismos resistentes ou de possível desenvolvimento de resistência secundária (ALVES et al., 2001; SILVA et al., 2008).

A determinação da CIM talvez possa prever a resposta clínica ao tratamento com fluconazol e ajudar na identificação de pacientes que não respondem a essa terapia, visto que uma CIM  $\geq 16 \mu\text{g/mL}$  esteve relacionada a falha terapêutica e óbito (ALLER et al., 2000).

## 2.5 Tratamento

Por muitos anos, a anfotericina B era o único antifúngico eficaz no tratamento de micoses sistêmicas (WINN; WESTENFELD, 2008), entretanto, nas últimas décadas houve aumento notável do número desses agentes (BENNETT, 2006).

A anfotericina B foi descoberta por Gold (1956) e isolada de *Streptomyces nodosus* (TREJO, BENNETT; 1963). É um macrolídeo poliênico, possui pouca hidrossolubilidade e toxicidade considerável. Sua natureza anfipática possibilitou o desenvolvimento de formulações lipídicas, que tem um custo de 20 a 50 vezes maior que ao do complexo anfotericina B-desoxicolato (BENNETT, 2006). Esse antifúngico ocasiona efeitos colaterais como nefrotoxicidade, hipopotassemia e reações relacionadas com a infusão como febre, calafrios, hipóxia, hipotensão e hipertensão (BENNETT, 2006; LULLMANN et al., 2008).

O mecanismo de ação desse fármaco consiste em se ligar ao grupo esterol do ergosterol presente na membrana dos fungos, formando canais e conseqüente aumento na permeabilidade da membrana, permitindo o extravasamento de pequenas moléculas e lise celular (BENNETT, 2006; LULLMANN et al., 2008; MACHADO, 2006). Sua absorção gastrointestinal é insignificante, deve ser administrada por via intravenosa ou intratecal. Mais de 90% do fármaco no plasma permanece ligado às proteínas, uma pequena quantidade (2-3%) penetra no líquido cefaloespinal (LCE), no humor vítreo e no líquido amniótico normal (BENNETT, 2006; MACHADO, 2006).

A fluocitosina é uma pirimidina fluorada, trata-se da 5-fluorocitosina, seu mecanismo de ação consiste na desaminação da fluocitosina à 5-fluoruracila pelo

fungo, um potente antimetabólico que compromete a síntese de DNA (BENNETT, 2006; LULLMANN et al., 2008). É bem absorvida no trato gastrointestinal e sua ligação às proteínas é mínima (MACHADO, 2006). A sua concentração no LCE é de até 90% da concentração plasmática. Pacientes que já têm algum distúrbio hematológico podem apresentar anemia, leucopenia e trombocitopenia, outros efeitos adversos observados foram exantema, náuseas, vômitos, diarreia, enterocolite grave. A toxicidade é mais observada em pacientes com AIDS ou tratados com fármacos lesivos à medula óssea (BENNETT, 2006; MACHADO, 2006).

Os antifúngicos azóis abrangem duas grandes classes: imidazóis e triazóis. A ação fungistática se deve a inibição de 14- $\alpha$ -desmetilase do sistema do citocromo P450, inibindo a síntese do ergosterol (BENNETT, 2006; LULLMANN et al., 2008; MACHADO, 2006).

Fluconazol é um bistriazol fluorado, absorvido quase completamente pelo trato gastrointestinal, tem excelente penetração no líquido (até 90% do nível plasmático) e apenas 11 a 12% do fármaco no plasma encontra-se ligado às proteínas. Os principais efeitos adversos observados em pacientes que recebem o fármaco são náusea, vômito, cefaléia, exantema, dor abdominal e diarreia. Por ser teratogênico deve ser evitado durante a gravidez (BENNETT, 2006; MACHADO, 2006).

O itraconazol é um triazol sintético, apresenta absorção variável pelo trato gastrointestinal, dependendo da presença de ácidos e gorduras. Mais de 99% do fármaco encontra-se ligado às proteínas plasmáticas e não é encontrado no LCE ou na urina. Alguns efeitos adversos observados são: náusea, vômito, hipertrigliceridemia, hipopotassemia, aumento das aminotransferases e exantema (BENNETT, 2006; MACHADO, 2006).

De acordo com especialistas, o tratamento bem sucedido da criptococose depende do controle da imunidade do hospedeiro, do sítio de infecção, da toxicidade da droga antifúngica e da doença de base do paciente. A terapia antifúngica recomendada na atualidade é dividida em três fases: indução, consolidação e manutenção (PERFECT et al., 2010).

A terapia de indução tem como objetivo a redução, ou negativação da carga fúngica em um período mínimo de duas semanas de tratamento. Para a manutenção da negatividade micológica e o alcance da normatização dos parâmetros clínicos e

laboratoriais, por pelo menos oito semanas, é necessária a terapia de consolidação (MORETTI et al., 2008). O tratamento mais adequado na fase de indução, nos casos de neurocriptococose, ou sua forma disseminada, é a combinação de anfotericina B 0,7 a 1,0 mg/kg/dia com fluocitosina 100 mg/kg/dia, por duas semanas, seguida por fase de consolidação com fluconazol 400 mg/dia por oito semanas (MORETTI et al., 2008; PERFECT et al., 2010).

Considerando que no Brasil o antifúngico fluocitosina não é mais comercializado, a alternativa na fase de indução é a combinação de anfotericina B (0,7 mg/dia) com fluconazol (800 mg/dia). Após o término das terapias de indução e consolidação, devido ao alto risco de recaídas, deve-se iniciar a terapia de manutenção, sendo ideal a negatização de culturas fúngicas, devendo continuar até a reconstituição do sistema imune, por um período mínimo de um ano preferencialmente com fluconazol 200 a 400 mg/dia (MORETTI et al., 2008; PERFECT et al., 2010).

Apesar de recomendado, o uso do fluconazol por longo período como terapia supressiva pode ser associado com o desenvolvimento de resistência aos azóis em pacientes com AIDS (ALLER et al., 2000; ALVES et al., 2001; BENNETT, 2006; MACHADO, 2006). A presença de *C. gattii* resistente ao fluconazol, como descrito por Fernandes et al. (2003), indica a importância não apenas de se identificar a espécie de *Cryptococcus* responsável pela doença, mas também determinar a CIM a fim de possivelmente orientar o tratamento.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Caracterizar fenotípica e geneticamente *Cryptococcus* spp. e descrever características epidemiológicas de pacientes com criptococose em hospital de referência em Mato Grosso do Sul.

#### 3.2 Objetivos específicos

Para realização do objetivo geral foram designados os seguintes objetivos específicos:

- Descrever as variáveis demográficas, clínicas e laboratoriais de pacientes com criptococose, atendidos no Hospital Universitário de Mato Grosso do Sul, entre maio de 1997 e dezembro de 2008;
- Identificar as espécies de *Cryptococcus* responsáveis pelos casos de criptococose;
- Avaliar a suscetibilidade antifúngica *in vitro* das espécies de *Cryptococcus*, pela técnica de microdiluição frente aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol, itraconazol e voriconazol;
- Identificar e determinar a prevalência dos tipos moleculares, no período de onze anos.

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 Tipo de estudo**

Trata-se de um estudo descritivo retrospectivo do tipo série de casos.

### **4.2 Local e período**

O estudo foi realizado com *Cryptococcus* spp., previamente isolados, de pacientes com criptococose atendidos no Hospital Universitário “Maria Aparecida Pedrossian” da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (HU-UFMS), Campo Grande – MS, no período de maio de 1997 a dezembro de 2008.

O HU-UFMS é um hospital terciário de alta complexidade, com 256 leitos, referência no diagnóstico e tratamento de doenças infecciosas e parasitárias no estado de Mato Grosso do Sul. Presta serviços de saúde ambulatorial e hospitalar, vinculados ao Sistema Único de Saúde.

### **4.3 Sujeitos da pesquisa**

Foram incluídos no estudo os casos de criptococose, cujas culturas de materiais biológicos foram positivas para *Cryptococcus* spp, com leveduras viáveis, totalizando cento e dezesseis pacientes.

Critérios de exclusão: cultura negativa ou inviabilidade das leveduras armazenadas.

### **4.4 Procedimentos para coleta de dados**

O estudo foi iniciado pela consulta dos livros de registro do Laboratório de Micologia do HU-UFMS.

Os dados demográficos e clínicos foram obtidos a partir de prontuário médico e anotados em formulário apropriado (apêndice A). As variáveis analisadas foram:

- a) variáveis demográficas: sexo, idade, procedência, naturalidade, zona;
- b) condições clínicas: forma clínica, sinais e sintomas apresentados no momento do diagnóstico e co-infecções;
- c) condições de risco: imunodeficiência pelo HIV, transplante de órgãos, uso de medicação imunossupressora, diabetes mellitus, neoplasias, etc.;
- d) tratamento: antifúngicos utilizados;
- e) dados complementares: período de internação, terapia antiretroviral, evolução clínica;
- f) espécime clínica do qual foi isolado o agente etiológico: líquido cérebro espinhal, urina, sangue, biópsia, escarro, lavado brônquico, etc.; e
- g) variáveis de exames laboratoriais: exame micológico direto, parâmetros liquóricos, contagem de CD4 e carga viral.

#### 4.5 Procedimentos em laboratório

As leveduras incluídas no estudo haviam sido isoladas no Laboratório de Micologia do HU-UFMS e estocadas em *skim milk* e em glicerol a  $-20^{\circ}\text{C}$ . A identificação da espécie por meio da semeadura em meio L-canavanina, glicina e azul de bromotimol (CGB). O teste de suscetibilidade antifúngica e a tipagem molecular foram realizados a partir do crescimento em cultura das leveduras isoladas da primeira amostra clínica de cada paciente. A identificação da espécie e a determinação da suscetibilidade antifúngica foram realizadas no Laboratório de Pesquisas Microbiológicas do Departamento de Farmácia e Bioquímica da UFMS, enquanto a tipagem molecular no Laboratório de Biologia Molecular e Culturas Celulares da UFMS.

##### 4.5.1 Identificação da espécie

A identificação das espécies isoladas foi realizada a partir do crescimento da levedura, em meio CGB, no qual somente *C. gattii*, através da utilização de glicina, como fonte de carbono e nitrogênio, provoca alcalinização do meio e a mudança da cor para azul cobalto, como mostrado na Figura 1 (KWON-CHUNG; POLACHECK; BENNETT, 1982).



Figura 1 – Teste do meio CGB. A: resultado positivo (*C. gattii*), B: resultado negativo (*C. neoformans*).

#### 4.5.2 Determinação da suscetibilidade antifúngica

A suscetibilidade das amostras frente aos antifúngicos foi determinada por meio da técnica de microdiluição em caldo, recomendada e padronizada pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), de acordo com o documento M27-A3 (CLSI, 2008).

##### 4.5.2.1 Antifúngicos

Os antifúngicos testados foram: anfotericina B (AMB), fluconazol (FLC), itraconazol (ITC) adquiridos da Sigma Aldrich (EUA) e voriconazol (VRC) da Pfizer (EUA), doação do Dr. Eriques G. da Silva, da Universidade de São Paulo (USP). As drogas foram armazenadas de acordo com as especificações dos fabricantes.

As soluções estoque foram preparadas a partir do antifúngico na forma de pó, que foi pesado em balança analítica de precisão (Shimadzu, China). Cada droga foi dissolvida de acordo com sua solubilidade: anfotericina B, itraconazol e voriconazol em dimetilsulfóxido (DMSO) [Sigma, EUA] e o fluconazol em água bi-destilada estéril.

O volume de solvente utilizado foi determinado através da fórmula abaixo, recomendada pelo CLSI para se obter uma solução estoque com concentração de

5120 µg/mL para o fluconazol e 1600 µg/mL para anfotericina B, itraconazol e voriconazol.

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{Volume solvente (mL)} \times \text{Concentração solução estoque (}\mu\text{g/mL)}}{\text{Potência da substância antifúngica (}\mu\text{g/mg)}}$$

Após o preparo das soluções, estas foram transferidas para criotubos de 2 mL e armazenadas a -20°C por um período máximo de seis meses. Antes da utilização essas soluções foram descongeladas à temperatura ambiente.

Devido à fotossensibilidade da anfotericina B, durante seu manuseio e armazenamento foram tomadas todas as precauções para evitar sua exposição à luz.

O meio de cultura utilizado foi o RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 com glutamina, sem bicarbonato e antibiótico, pH7, MOPS (ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico) 0,165mM, recomendado pelo documento M27-A3, adquirido comercialmente (Vitrocell, Brasil) e mantido em geladeira.

Todo o procedimento foi feito em cabine de segurança biológica, utilizando materiais estéreis: tubo de ensaio, pipeta graduada, ponteira para pipeta automática, reservatório em “V” para pipeta multicanal, microplacas entre outros.

#### 4.5.2.2 Preparo das microplacas com antifúngico

Para o preparo das microplacas de fluconazol foram feitas diluições da solução estoque (5120 µg/mL), conforme ilustrado na Figura 2, a fim de se obter soluções com concentrações finais que variaram de 0,25 a 128 µg/mL.

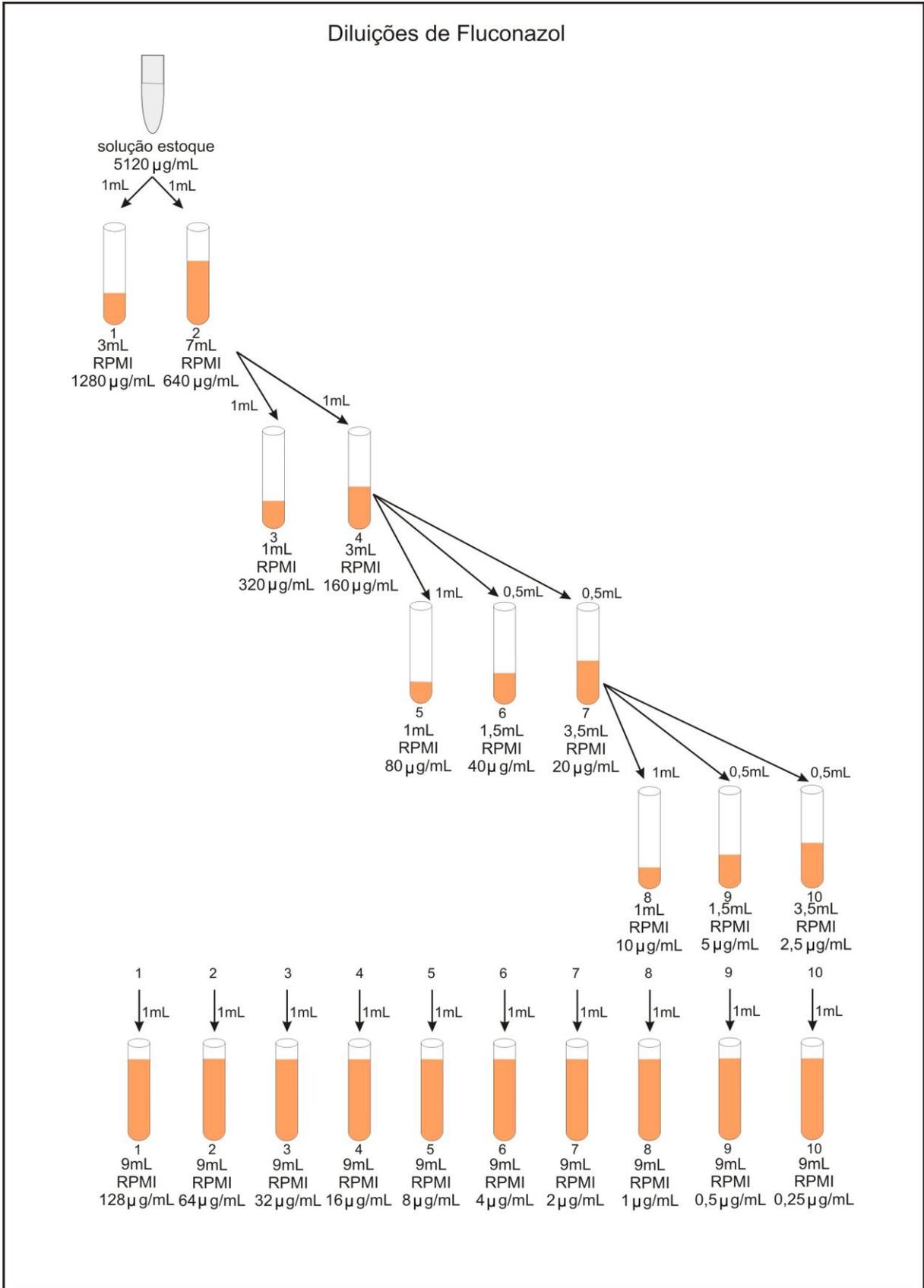


Figura 2 – Fluxograma do preparo das diluições de fluconazol.

Para o preparo das microplacas com anfotericina B, itraconazol e voriconazol, foram feitas diluições da solução estoque (1600 µg/mL), conforme ilustrado na Figura 3, a fim de se obter soluções com concentrações finais que variaram de 0,03 a 16 µg/mL. Os tubos utilizados na diluição da AnB foram envolvidos com papel alumínio e protegidos da luz, assim como as microplacas, tanto no preparo quanto no armazenamento.

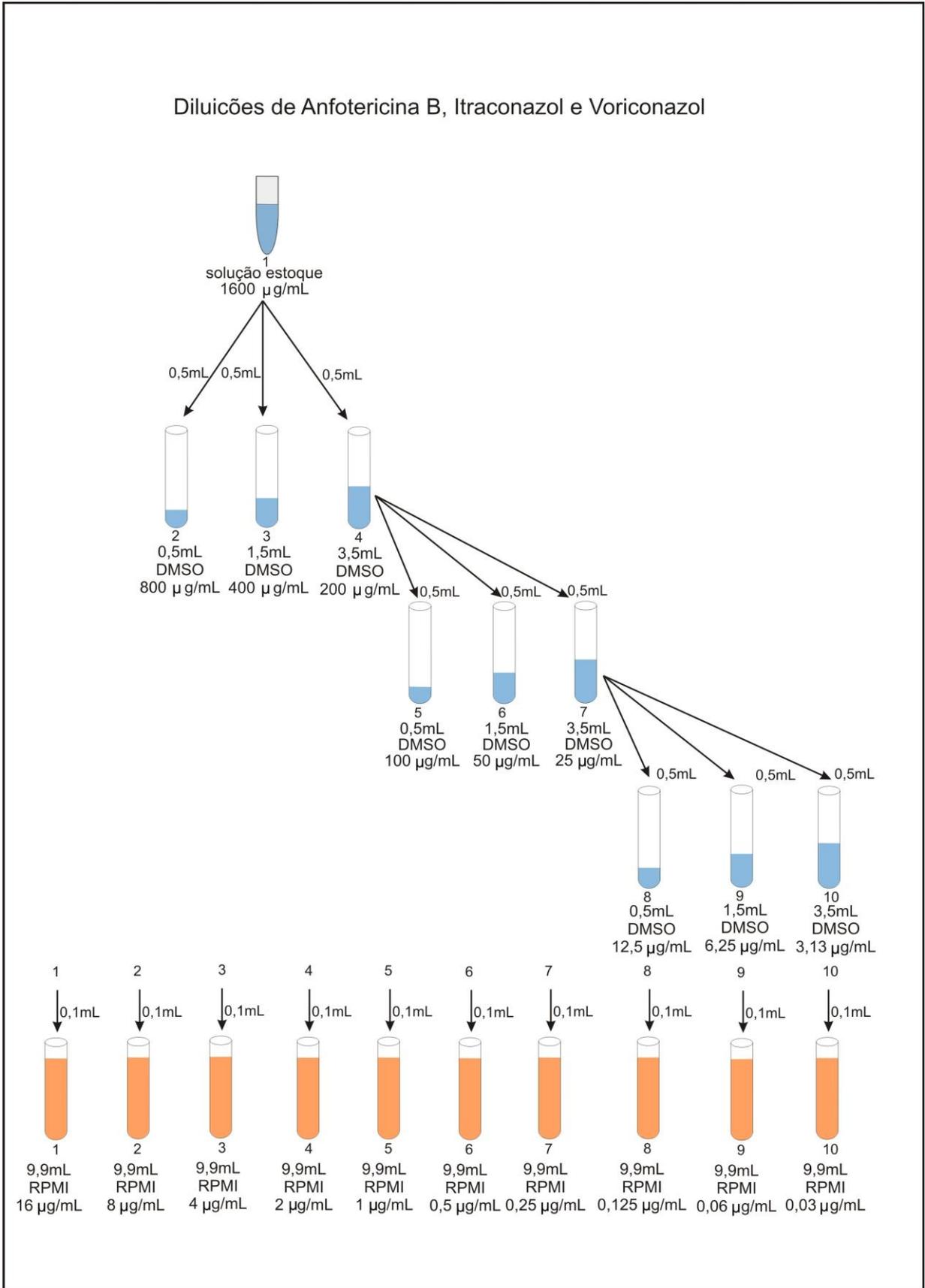


Figura 3 – Fluxograma do preparo das diluições de anfotericina B, itraconazol e voriconazol.

As soluções de antifúngicos foram aplicadas em placas de microtitulação de fundo chato com 96 poços, em formato de U, no sentido vertical das placas, nos poços das colunas 2 a 11, conforme mostrado na Figura 4, diminuindo a concentração das soluções neste sentido, estando na coluna 11 a solução com a menor concentração, e na coluna 2, a maior concentração do antifúngico. Na coluna 1 e 12 não foi adicionado antifúngico, estas colunas foram destinadas ao controle negativo ou de esterilidade (CE) e controle positivo ou de crescimento (CC), respectivamente. Após a distribuição de todas as diluições dos antifúngicos nas microplacas, estas foram vedadas com filme plástico (parafilme), tampadas e identificadas com nome do fármaco e data do preparo. As microplacas foram acondicionadas em sacos plásticos, congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  e utilizadas no máximo um mês após o estoque.

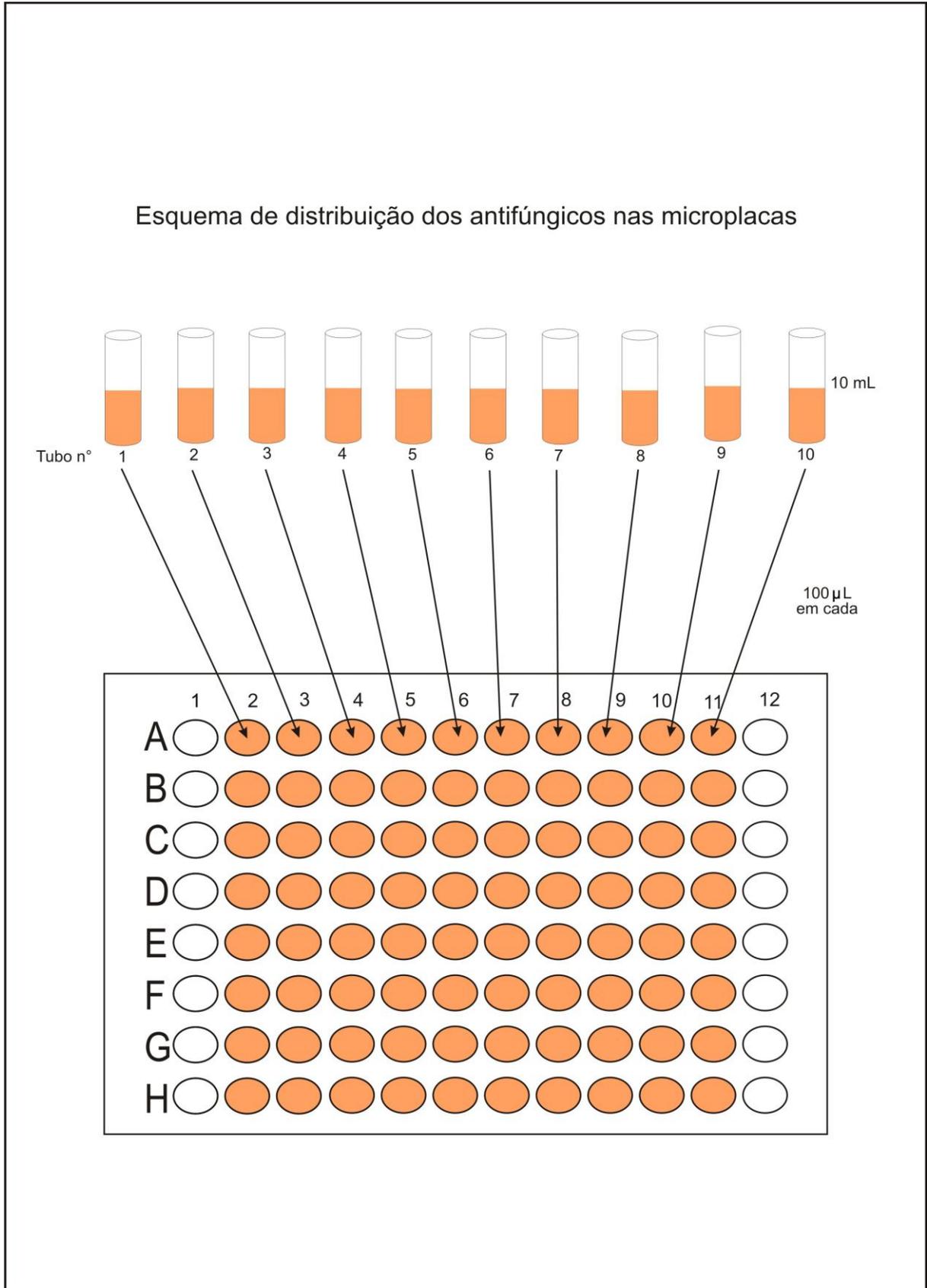


Figura 4 – Desenho esquemático da distribuição dos antifúngicos nas microplacas.

#### 4.5.2.3 Preparo do inóculo

As leveduras foram descongeladas cerca de vinte dias antes da realização do antifungigrama, e foram feitos repiques seriados em placa de Agar Sabouraud Dextrose (ASD), até assegurar sua pureza e viabilidade. A seguir, foi semeada colônias isoladas em tubo de rosca contendo ASD, e estocada em micoteca. A partir do crescimento dessa levedura em tubo, foi feito repique em placa de ASD 48 horas antes da realização do teste, para *Cryptococcus* sp, e 24 horas para as cepas controles ATCC de *Candida*. Essas placas foram incubadas a 35°C.

O inóculo foi preparado com o auxílio de alças descartáveis, escolhendo colônias isoladas e suspendendo-as em 5 mL de solução salina estéril. Essa suspensão foi agitada em agitador de vórtex por 15 segundos, e a densidade celular ajustada com a ajuda da solução-padrão da escala de Mc Farland 0,5 (Probac do Brasil, Brasil) e do cartão de Wickerhan, acrescentando solução salina, quando necessário. Esse procedimento forneceu uma solução-padrão de levedura contendo cerca de  $1 \times 10^6$  a  $5 \times 10^6$  células por mililitro. Essa suspensão foi diluída 1:50, ou seja, 100 µL do inóculo em 4,9 mL de RPMI e, em seguida, 1:20, 500 µL da diluição anterior em 9,5 mL de RPMI, resultando em concentração de  $1 \times 10^3$  a  $5 \times 10^3$  células por mililitro. Antes de cada diluição, o tubo de ensaio foi homogeneizado por 15 segundos, com a ajuda do agitador. O inóculo foi aplicado na microplaca, dentro de 15 minutos, após sua padronização.

#### 4.5.2.4 Teste de suscetibilidade antifúngica

Antes de preparar o inóculo, as microplacas, já contendo o antifúngico, foram descongeladas a temperatura ambiente e o filme plástico retirado.

A última diluição do inóculo foi homogeneizada com o auxílio do agitador, vertida em reservatório "V" estéril e aplicada 100 µL na microplaca, com pipeta multicanal, no sentido horizontal do poço 2 ao 12, nas linhas A e B. Outra levedura foi aplicada nas linhas C e D e outra nas E e F. De modo que para cada microrganismo foi feito o teste em duplicata.

Nas linhas G e H foram inoculadas as cepas do controle de qualidade American Type Culture Collection (ATCC): *C. parapsilosis* (ATCC 22019) e *C. krusei*

(ATCC 6258), fornecidas pelo Laboratório Central de Mato Grosso do Sul (LACEN-MS). Nos poços da coluna 12, o qual já continha a levedura teste e não foi adicionado antifúngico, foi adicionado 100  $\mu$ L de RPMI e foi considerado o controle de crescimento. Nos poços da coluna 1, que estavam vazios, adicionou-se somente 200  $\mu$ L de RPMI sendo, então, o controle de esterilidade.

O preenchimento das placas foi feito da mesma forma para todos os antifúngicos testados (AMB, FLC, ITC e VRC), conforme ilustrado na Figura 5.

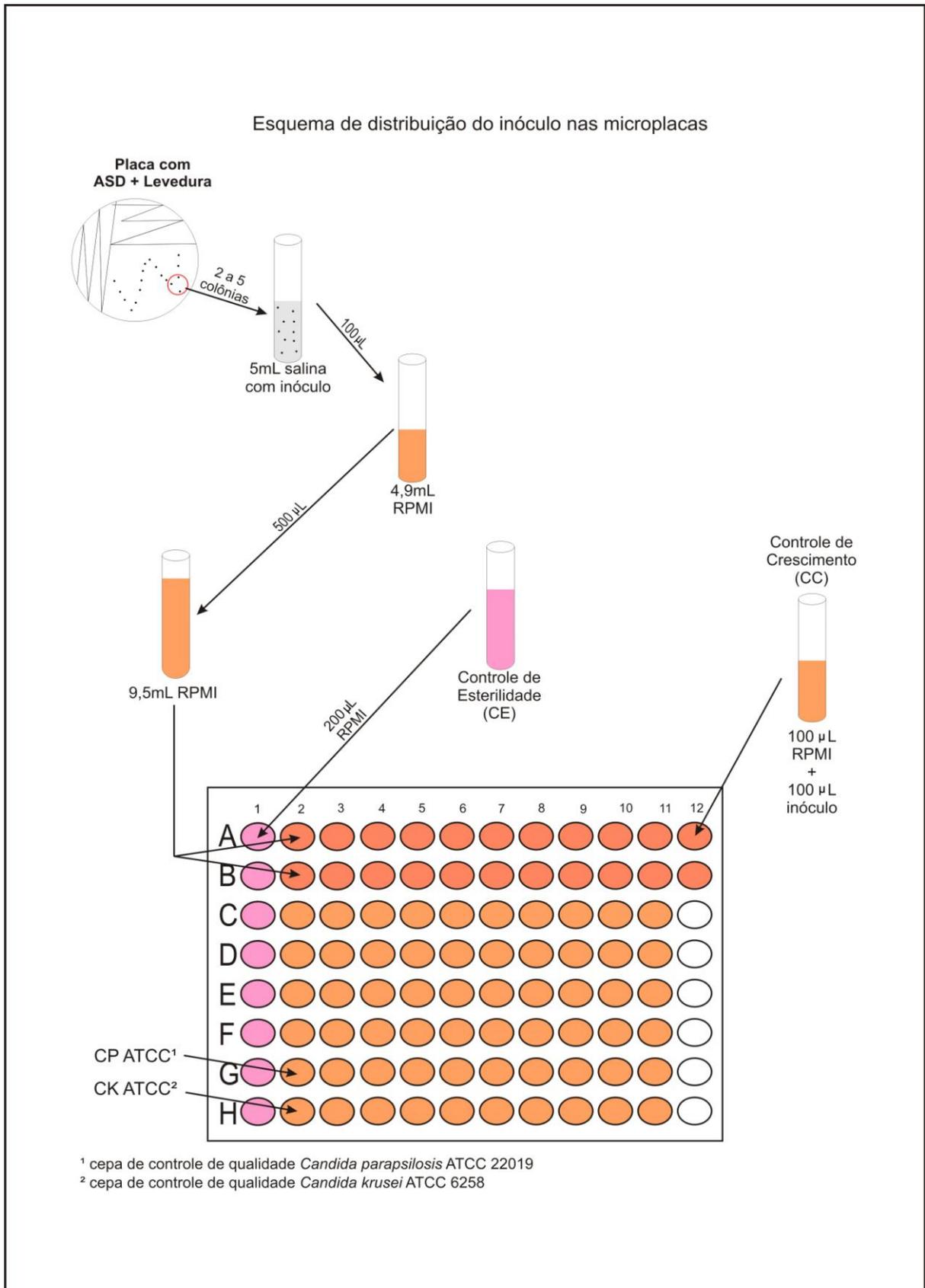


Figura 5 – Desenho esquemático da distribuição do inóculo, controle de esterilidade e de crescimento nas microplacas.

Ao adicionar 100 µL da suspensão da levedura, nos poços contendo 100 µL do antifúngico, houve uma diluição 1:2, ficando uma concentração final do inóculo variando de  $0,5 \times 10^3$  a  $2,5 \times 10^3$  UFC/mL e do antifúngico variando de 0,125 a 64 µg/mL para FLC e 0,015 a 8 µg/mL para AMB, ITC e VRC.

Essas placas foram incubadas à 35°C e a leitura visual feita conforme crescimento ótimo após 48 a 72 horas. As placas de anfotericina B foram embaladas com papel alumínio para evitar a exposição à luz.

#### 4.5.2.5 Leitura e interpretação dos resultados

Para a anfotericina B (fungicida) foi considerada concentração inibitória mínima (CIM) a menor concentração do fármaco que inibiu totalmente o crescimento da levedura.

Para fluconazol, itraconazol e voriconazol (fungiostáticos), a CIM foi definida como a concentração que inibiu 50% do crescimento da levedura, comparado com o controle de crescimento (coluna 12), onde não havia o antifúngico.

Os pontos de corte da CIM, para as cepas de referência utilizadas como controle qualidade dos testes realizados são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1 – Variação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de cepas de referência (CLSI, 2008)

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

Como o documento, M27-A3 (CLSI, 2008) não propôs valores limites de suscetibilidade para *Cryptococcus*, foram considerados resistentes os isolados que apresentaram CIM  $\geq 64$  µg/mL para fluconazol, CIM  $\geq 1$  µg/mL para itraconazol e voriconazol e CIM  $\geq 2$  µg/mL para anfotericina B. E foram considerados sensíveis dose dependente os isolados que apresentaram CIM de 16 a 32 µg/mL para fluconazol, de 0,25 a 0,5 µg/mL para itraconazol e voriconazol, conforme sugerido previamente por outros autores (MONDON et al., 1999; HONG NGYEN; YU, 1998;

PEDROSO; FERREIRA; CANDIDO, 2006; SILVA et al., 2008; SOARES et al., 2005; SOUZA et al., 2005).

#### 4.5.3 Tipagem molecular

As leveduras foram tipadas por meio da técnica de RFLP, utilizando o primer URA5. Na análise molecular foi utilizada metodologia baseada no protocolo do *Latin American Cryptococcal Network Project*.

##### 4.5.3.1 Tipos moleculares de referência

Para identificação dos tipos moleculares foram incluídas cepas de referência: *Cryptococcus neoformans* WM 148 (sorotipo A, VNI), WM 626 (sorotipo A, VNII), WM 628 (sorotipo AD, VNIII), WM 629 (sorotipo D, VNIV) e *Cryptococcus gattii* WM 179 (sorotipo B, VGI), WM 178 (sorotipo B, VGII), WM 175 (sorotipo B, VGIII), WM 779 (sorotipo C, VGIV) (TRILLES, et al., 2008). Essas cepas foram cedidas pelo Laboratório de Micologia Médica do Instituto de Pesquisa do Hospital Evandro Chagas da FIOCRUZ/RJ.

##### 4.5.3.2 Extração do DNA genômico (FERRER et al., 2001)

Com o auxílio de uma alça descartável transferiu-se a cultura de *Cryptococcus* de 72 horas para um tubo de microcentrifuga estéril de 1,5 mL e estocou-se a -20°C por, no mínimo, 2 horas. Nesse microtubo adicionou-se 500 µL de tampão de lise (ANEXO A) e 5 µL de β-mercaptoetanol (Sigma, EUA). Em seguida, incubou-se a 65°C por 1 hora e agitou-se vigorosamente no agitador em três momentos: antes da incubação, com 30 minutos e no final da incubação. Na sequência, adicionou-se 500 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (v:v:v 25:24:1) [Sigma, EUA], agitou-se, no agitador, até obtenção de suspensão homogênea. Após esse período, centrifugou-se 16.110 xg por 20 minutos. O sobrenadante foi removido (aproximadamente 400 µL) e colocado em um novo tubo de microcentrifuga de 1,5 mL com 400 µL de isopropanol (Synth, Brasil) com uma homogeneização leve.

Posteriormente, o tubo foi acondicionado a  $-20^{\circ}\text{C}$  *overnight*, para a precipitação do DNA. No dia seguinte, centrifugou-se a  $4^{\circ}\text{C}$  a  $15.000\text{ xg}$ , por 15 minutos. Após a retirada da fase líquida lavou-se o precipitado por três vezes, com  $500\ \mu\text{L}$  de etanol 70% (Fluka, EUA), centrifugando por 5 minutos a  $10.0000\text{ xg}$  a cada lavagem. Após secagem em estufa, o DNA (precipitado) foi suspenso em  $100\ \mu\text{L}$  de água bi-destilada estéril, e colocado em banho-maria a  $50^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos. O DNA extraído foi armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.5.3.3 RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*) – URA5

A análise de fragmentos de DNA gerados por enzimas de restrição foi realizada conforme descrito por Meyer et al. (2003), com pequena modificação.

Um teste piloto demonstrou não haver diferença entre as bandas dos amplificadas utilizando  $30\text{ ng}/\mu\text{L}$  de DNA ou DNA total. Assim, optou-se por utilizar o DNA total na realização da PCR.

##### 4.5.3.3.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para a realização da PCR preparou-se um *mix* com um volume final de  $25\ \mu\text{L}$ . Cada reação continha  $2,5\ \mu\text{L}$  de tampão PCR 10X,  $0,75\ \mu\text{L}$  de cloreto de magnésio  $50\text{ mM}$ ,  $0,1\ \mu\text{L}$  de Platinum Taq DNA polimerase  $500\text{ U}$  (Invitrogen, EUA),  $0,5\ \mu\text{L}$  mix de dNTPS  $10\text{ mM}$  (Biotools, Espanha),  $0,5\ \mu\text{L}$  de cada *primer* ( $10\text{ pmol}$ ),  $1,0\ \mu\text{L}$  de DNA total e  $19,15\ \mu\text{L}$  água bi-destilada estéril.

Os *primers* utilizados para a amplificação do DNA foram: URA5 (5` ATGTCCTCCCAAGCCCTCGACTCCG 3`) e SJ01 (5` TTAAGACCTCTGAACACCGTACTC 3`) [IDT, EUA].

A amplificação foi realizada por meio de 35 ciclos no termociclador (XP Thermal Cycle, Bioer) a  $94^{\circ}\text{C}$  por 2 minutos para desnaturação inicial, 45 segundos de desnaturação a  $94^{\circ}\text{C}$ , 1 minuto de anelamento a  $55,7^{\circ}\text{C}$  e 2 minutos de extensão a  $72^{\circ}\text{C}$ , seguido de um ciclo de extensão final a  $72^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos. Para cada reação foi incluído um controle negativo, sem adição do DNA. O produto da PCR permaneceu armazenado a  $4^{\circ}\text{C}$  até o uso.

#### 4.5.3.3.2 Eletroforese da amplificação de DNA

A eletroforese foi realizada em gel de agarose (Promega, EUA) a 1,4%, em tampão Tris-borate-EDTA (TBE) 1X (Sigma, EUA) por 30 minutos, a 90 volts, contendo 8  $\mu\text{L}$  do amplificado misturado com 3  $\mu\text{L}$  do tampão de carregamento azul de bromofenol 2X. Em cada gel de eletroforese foi aplicado o marcador de peso molecular de 100 pares de base (pb) [Biotools, Espanha]. Ao término da eletroforese, o gel foi corado em solução de 400 mL TBE, contendo 100  $\mu\text{L}$  brometo de etídio. A amplificação do DNA foi visualizada sob luz ultravioleta pela presença de banda com peso molecular aproximado de 750 pb.

#### 4.5.3.3.3 Reação de RFLP

A partir do DNA amplificado, fez-se uma dupla digestão com as enzimas de restrição *Sau96I* (5000 U/mL; Biolabs, EUA) e *HhaI* (20000 U/mL; Biolabs, EUA).

Ao microtubo da PCR, contendo 17  $\mu\text{L}$  do produto da reação, foi adicionado 2,5  $\mu\text{L}$  de master mix, contendo 1, 5  $\mu\text{L}$  de NeBuffer (tampão, acompanha a enzima), 0,15  $\mu\text{L}$  de BSA (albumina, acompanha a enzima), 0,2  $\mu\text{L}$  *HhaI*, 0,35  $\mu\text{L}$  *Sau96I* e 0,3  $\mu\text{L}$  de água bi-destilada estéril. Em seguida, a mistura foi incubada a 37°C por 12 horas no termociclador (Biocycler MJ96G).

#### 4.5.3.3.4 Eletroforese do RFLP

A separação dos fragmentos, por eletroforese, foi realizada em gel de agarose (Promega, EUA) a 2,0%, em tampão Tris-borate-EDTA (TBE) 1X (Sigma, EUA) por 2 horas, a 110 volts, contendo 15  $\mu\text{L}$  do produto da digestão misturado com 5  $\mu\text{L}$  do tampão de carregamento azul de bromofenol 2X. Em cada gel de eletroforese foi aplicado o marcador de peso molecular de 100 pb (Biotools, Espanha). Ao término da eletroforese o gel foi corado na solução contendo brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta.

#### 4.5.3.3.5 Análise dos perfis gerados pelo RFLP

A determinação do tipo molecular, de cada amostra, foi realizada pela comparação visual das bandas do RFLP com as bandas das cepas padrão, ilustradas na Figura 6.

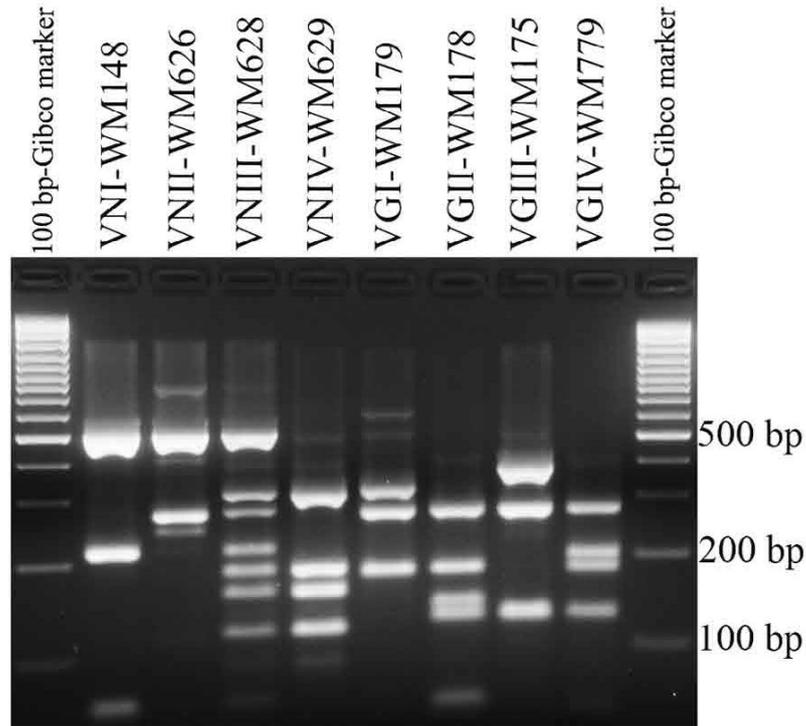


Figura 6 – Perfil *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) do gene *URA5* duplamente digerido com *Sau96I* e *HhaI* das oito cepas padrão de *Cryptococcus* caracterizando os oito tipos moleculares conhecidos. FONTE: TRILLES et al., 2008.

#### 4.6 Organização e análise dos dados

Os dados demográficos, clínicos e laboratoriais obtidos foram tabulados em planilha no Excel<sup>®</sup> 2007 e analisados em programa Epi-Info<sup>®</sup> versão 3.5.1. A determinação da média geométrica das CIMs foi feita no programa BioEstat<sup>®</sup>, versão 5.0. A análise estatística foi realizada no programa SigmaStat<sup>®</sup>, versão 2.0, considerando significância estatística para valores de  $p \leq 0,05$ . A associação entre infecção pelo HIV e as variáveis sexo, faixa etária, procedência, naturalidade, zona, forma clínica, tratamento, evolução, espécie de *Cryptococcus*, foi avaliada por meio do teste de qui-quadrado.

A comparação entre infecção pelo HIV e percentuais de sintomas e tipos moleculares foi realizada por meio do teste Z. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para: associação entre infecção pelo HIV e as variáveis mediana de idade, mediana de tempo de internação; associação entre CIMs das drogas antifúngicas com infecção pelo HIV e espécie de *Cryptococcus*.

#### **4.7 Considerações éticas**

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, e aprovado sob o protocolo de nº 1617, no ano de 2010 (ANEXO B).

## 5 RESULTADOS

No período de maio de 1997 a dezembro de 2008 foram diagnosticados, no HU-UFMS, 143 casos de criptococose com comprovação laboratorial. Foram excluídos do estudo 27 pacientes, nove devido ao não isolamento do microrganismo em cultura, e dezoito devido à inviabilidade das leveduras armazenadas. A distribuição dos casos de criptococose, por ano de diagnóstico, está ilustrada na Figura 7.

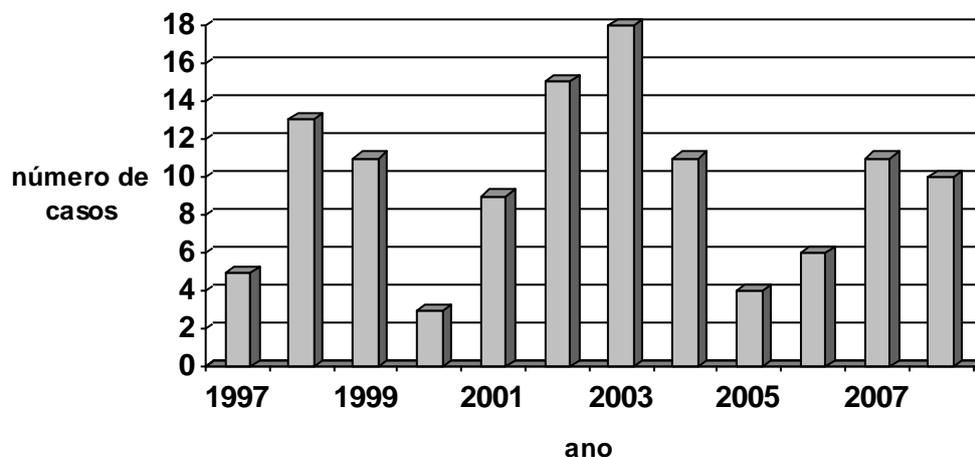


Figura 7 – Distribuição dos casos de criptococose, por ano de diagnóstico, Campo Grande-MS, maio de 1997 a dezembro de 2008.

Entre os 116 pacientes com diagnóstico de criptococose, 96 (82,8%) eram portadores do HIV, dezessete (14,7%) não tinham essa infecção. Em três (2,6%) a sorologia para HIV não foi realizada e, por isso, foram excluídos da análise epidemiológica.

Dados demográficos dos pacientes estão descritos na Tabela 2. Oitenta e dois pacientes (72,6%) eram do sexo masculino e 31 (27,4%) do sexo feminino. Entre os pacientes infectados e os não infectados pelo vírus HIV também houve predomínio em pacientes do sexo masculino, setenta (72,9%) e doze (70,6%), respectivamente.

A idade dos pacientes variou de 10 a 88 anos (mediana 35,0 e média 36,9 anos). O maior número de casos de criptococose foi observado na faixa etária de 31 a 40 anos (41,6%). Nos pacientes infectados pelo HIV a idade variou de 10 a 68

anos (mediana 34,5 e média 35,5 anos) e entre os não infectados, de 24 a 88 anos (mediana 35,0 e média 41,6 anos).

Cento e um (89,4%) pacientes residiam em áreas urbanas, sendo 82 (72,5%) na cidade de Campo Grande - MS, um (0,9%) em Uberlândia - MG e 28 (24,8%) no interior do Estado de Mato Grosso do Sul: cidades de Naviraí, Ponta Porã, São Gabriel do Oeste (n=3), Aquidauana, Corumbá, Costa Rica, Ribas do Rio Pardo (n=2), Angélica, Bataguassu, Caarapó, Chapadão do Sul, Coxim, Dourados, Maracaju, Miranda, Paranaíba, Rio Brilhante e Sonora (n=1). Cerca de 65% (n=74) era natural do próprio Estado, o restante era de diferentes Estados do Brasil, como São Paulo (n=10), Minas Gerais (n=4), Goiás, Paraná (n=3), Rio de Janeiro, Pernambuco (n=2), Bahia, Ceará, Espírito Santo, Mato Grosso, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Sergipe (n=1). Somente um paciente era de origem estrangeira (Angola).

A análise estatística mostrou significância entre a zona de procedência e a infecção do paciente pelo HIV ( $p < 0,01$ ).

Tabela 2 – Características demográficas de pacientes com criptococose segundo infecção pelo HIV, Campo Grande-MS, maio de 1997 a dezembro de 2008

Características demográficas	Infecção pelo HIV				Total		p
	Sim (n=96)		Não (n=17)				
	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	
Sexo							
Masculino	70	72,9	12	70,6	82	72,6	0,923 <sup>(1)</sup>
Feminino	26	27,1	5	29,4	31	27,4	
Idade (anos)							
Mediana (variação)	34,5 (10-68)		35,0 (24-88)		35,0 (10-88)		0,335 <sup>(2)</sup>
Até 20 anos	2	2,1	-	-	2	1,8	0,230 <sup>(1)</sup>
De 21 a 30 anos	28	29,2	4	23,5	32	28,3	
De 31 a 40 anos	41	42,7	6	35,3	47	41,6	
De 41 a 50 anos	19	19,8	3	17,6	22	19,5	
Acima de 50 anos	6	6,2	4	23,5	10	8,8	
Procedência							
Mato Grosso do Sul	94	97,9	17	100,0	111	98,2	0,330 <sup>(1)</sup>
Minas Gerais	1	1,0	-	-	1	0,9	
Não Consta	1	1,0	-	-	1	0,9	
Naturalidade							
Mato Grosso do Sul	63	65,6	11	64,7	74	65,5	0,845 <sup>(1)</sup>
Outros	27	28,1	5	29,4	32	28,3	
Não Consta	6	6,3	1	5,9	7	6,2	
Zona							
Urbana	92	95,8	9	52,9	101	89,4	<0,001 <sup>(1)</sup>
Rural	4	4,2	8	47,1	12	10,6	

Obs: Não foram computados os dados de três pacientes que não realizaram sorologia para HIV.

<sup>(1)</sup> Teste do qui-quadrado

<sup>(2)</sup> Teste de Mann-Whitney

Meningoencefalite foi a forma clínica mais encontrada (74; 65,5%), seguida da forma disseminada (26; 23,0%), fungemia sem foco aparente (7; 6,2%), pneumonia (5; 4,4%) e ganglionar (1; 0,9%). Entre os pacientes HIV positivo foram encontrados 65 (67,7%) casos de meningoencefalite, vinte (20,8%) casos de criptococose disseminada e sete (7,3%) de infecção da corrente sanguínea sem outro foco aparente. Entre os HIV negativos foram nove (52,9%) casos de meningoencefalite, seis (35,3%) de infecção disseminada e um (5,9%) caso de infecção ganglionar (Tabela 3). Todos os três pacientes que não realizaram sorologia para HIV apresentaram a forma disseminada da doença.

As principais manifestações clínicas apresentadas descritas pelo corpo clínico nos prontuários foram: febre (83; 73,5%), cefaleia (83; 73,5%) e vômito (75; 66,4%) (Tabela 3).

Tabela 3 – Características clínicas de pacientes com criptococose segundo infecção pelo HIV, Campo Grande-MS, maio de 1997 a dezembro de 2008

Características clínicas	Infecção pelo HIV				Total		p
	Sim (n=96)		Não (n=17)		Nº.	%	
	Nº.	%	Nº.	%			
<b>Forma clínica</b>							
Meningoencefalite	65	67,7	9	52,9	74	65,5	0,067 <sup>(1)</sup>
Disseminada	20	20,8	6	35,3	26	23,0	
Fungemia sem foco aparente	7	7,3	-	-	7	6,2	
Pneumopatia	4	4,2	1	5,9	5	4,4	
Ganglionar	-	-	1	5,9	1	0,9	
<b>Manifestações gerais</b>							
Febre	72	75,0	11	64,7	83	73,5	0,556 <sup>(2)</sup>
Emagrecimento	43	44,8	4	23,5	47	41,6	0,169 <sup>(2)</sup>
Diarreia	41	42,7	3	17,6	44	38,9	0,092 <sup>(2)</sup>
Hiporexia	40	41,7	5	29,4	45	39,8	0,493 <sup>(2)</sup>
<b>Manifestações neurológicas</b>							
Cefaleia	72	75,0	11	64,7	83	73,5	0,556 <sup>(2)</sup>
Vômito	64	66,7	11	64,7	75	66,4	0,906 <sup>(2)</sup>
Rigidez de nuca	46	47,9	6	35,3	52	46,0	0,486 <sup>(2)</sup>
Confusão mental	40	41,7	5	29,4	45	39,8	0,493 <sup>(2)</sup>
Náusea	42	43,8	8	47,1	50	44,2	0,990 <sup>(2)</sup>
Alteração visual	36	37,5	6	35,3	42	37,2	0,921 <sup>(2)</sup>
Convulsão	29	30,2	3	17,6	32	28,3	0,441 <sup>(2)</sup>
<b>Manifestações respiratórias</b>							
Tosse	51	53,1	8	47,1	59	52,2	0,847 <sup>(2)</sup>
Expectoração	34	35,4	5	29,4	39	34,5	0,839 <sup>(2)</sup>
Dispneia	29	30,2	5	29,4	34	30,1	0,825 <sup>(2)</sup>

Obs: Não foram computados os dados de três pacientes que não realizaram sorologia para HIV.

<sup>(1)</sup> Teste do qui-quadrado

<sup>(2)</sup> Teste Z

A maioria dos pacientes tinha outras co-infecções, principalmente HIV (96; 84,9%), candidíase oral (44; 38,9%), herpes (13; 11,5%), hepatite (11; 9,7%), toxoplasmose (10; 8,8%) e tuberculose (9; 7,9%).

A AIDS foi a condição predisponente mais relatada (96; 84,9%). Nos dezessete pacientes sem infecção pelo HIV, três (17,7%) tinham diabetes mellitus, três (17,7%) faziam uso de imunossupressor por tempo prolongado e dois (11,8%)

tinham lúpus eritematoso sistêmico. Em oito (47,1%) pacientes não foi observado nenhum fator predisponente evidente.

Em relação ao tratamento, 102 (91,1%) pacientes usaram algum antifúngico (Tabela 4). A maioria dos pacientes que recebeu tratamento específico usou anfotericina B (95/102), isolada (45/95), associada com fluconazol (49/95) ou com flucitosina (1/95). Seis pacientes foram tratados somente com fluconazol e um recebeu a combinação de anfotericina B, fluconazol e itraconazol. Não foram computados nestes dados tratamento efetuado após a alta hospitalar.

Os pacientes estiveram internados por período que variou de 2 a 131 dias (mediana 25 dias). Somente um paciente foi atendido a nível ambulatorial. Os portadores do HIV ficaram internados por período variou de 2 a 131 dias e os HIV negativos por período de 3 a 72 dias (Tabela 4).

Entre os 96 pacientes HIV positivo, vinte (20,8%) faziam uso regular de antirretoviral.

No que diz respeito à evolução clínica, 58 (51,8%) pacientes foram a óbito, 53,1% dos HIV positivos e 43,8% dos HIV negativos (Tabela 4).

Tabela 4 – Paciente com criptococose segundo tratamento, tempo de internação, evolução e infecção pelo HIV, Campo Grande-MS, maio de 1997 a dezembro de 2008

Tratamento e evolução	Infecção pelo HIV				Total		p
	Sim (n=96)		Não (n=16)		Nº.	%	
	Nº.	%	Nº.	%			
Tratamento							
Sim	88	91,6	14	87,5	102	91,1	0,685 <sup>(1)</sup>
Não	5	5,2	1	6,3	6	5,4	
Não Consta	3	3,1	1	6,3	4	3,6	
Drogas antifúngicas							
Anfotericina B	84	87,5	11	64,7	95	84,8	-
Fluconazol	46	47,9	10	58,8	56	50,0	-
Fluocitosina	-	-	1	5,9	1	0,9	-
Itraconazol	1	1,0	-	-	1	0,9	-
Tempo de internação (dias)							
Mediana (variação)	25,0 (2-131)		20,0 (3-72)		25,0 (2-131)		0,453 <sup>(2)</sup>
Evolução							
Alta	45	46,9	9	56,3	54	48,2	0,671 <sup>(1)</sup>
Óbito	51	53,1	7	43,8	58	51,8	

Obs: Não foram computados os dados de três pacientes que não realizaram sorologia para HIV e um atendido a nível ambulatorial.

<sup>(1)</sup> Teste do qui-quadrado

<sup>(2)</sup> Teste de Mann-Whitney

Os principais espécimes clínicos de isolamento de *Cryptococcus* foram líquido cefaloespinal (95; 81,9%) e sangue (31; 26,7%). Outros espécimes menos frequentes incluem: escarro (14; 12,1%), urina (12; 10,3%), lavado brônquico (6; 5,2%), aspirado de medula óssea (4; 3,4%), secreção (3; 2,6%), biópsia de pulmão (2; 1,7%) e biópsia de pele (1; 0,9%).

Punção líquórica foi realizada em 95 pacientes. A citologia global do LCE variou de 1 a 1940 células/mm<sup>3</sup>. Em 32 pacientes essa citologia foi igual ou inferior a 5 células/mm<sup>3</sup>, 29 eram portadores do HIV, um tinha LES e fazia uso de imunossupressor por tempo prolongado e dois pacientes não fizeram o teste para diagnóstico de HIV. Com relação à citologia diferencial, observou-se o predomínio de células mononucleares (32/37). Proteinorraquia variou de 15 a 1700 mg/dL, sendo que em 73,6% das análises foi superior a 50 mg/dL. A glicorraquia variou de 2 a 72 mg/dL, e em 76,7% das amostras foi inferior a 50 mg/dL.

Contagem de linfócitos T CD4 e carga viral foram determinadas em 45 pacientes. Os níveis séricos de células CD4 variaram de 2 a 305 células/mm<sup>3</sup>

(mediana 33 células/mm<sup>3</sup> e média 51,9 células/mm<sup>3</sup>). Em 38 (84,4%) pacientes a contagem de CD4 estava abaixo de 100 células/mm<sup>3</sup>. A carga viral variou de 550 a 1.500.000 cópias/mL (mediana 68.663 e média 216.231,9 cópias/mL).

Dos 116 pacientes com criptococose e agente isolado em cultura, 111 (95,7%) realizaram exame micológico direto. Em 21 (18,9%) ocasiões o fungo não foi observado no exame micológico a fresco.

Quanto a etiologia, 93 (96,9%) pacientes portadores do HIV foram infectados por *Cryptococcus neoformans* e três (3,1%) por *Cryptococcus gattii*. Nos HIV negativo *Cryptococcus neoformans* foram isolados de onze (64,7%) pacientes e *Cryptococcus gattii* de seis (35,3%). A análise estatística desses dados mostrou significância ( $p < 0,001$ ). Os três pacientes sem informação sobre HIV foram infectados por *Cryptococcus neoformans* (Tabela 5).

Tabela 5 - Espécies de *Cryptococcus* responsáveis pelos casos de criptococose segundo infecção pelo HIV, Campo Grande-MS, maio de 1997 a dezembro de 2008

Espécies	Infecção pelo HIV						Total	
	Sim (n=96)		Não (n=17)		Desconhecida (n=3)			
	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%
<i>Cryptococcus neoformans</i>	93	96,9	11	64,7	3	100,0	107	92,2
<i>Cryptococcus gattii</i>	3	3,1	6	35,3	-	-	9	7,8

De todas as leveduras incluídas no estudo foi realizada a determinação da suscetibilidade antifúngica. Na Tabela 6 são mostrados os valores da concentração inibitória mínima (CIM) de acordo com a presença do HIV e de acordo com a espécie de *Cryptococcus*. Todos os isolados foram sensíveis (S) à anfotericina B, uma levedura de *C. neoformans* foi sensível dose dependente (SDD) ao fluconazol e ao voriconazol e dois isolados de *C. gattii* foram SDD ao itraconazol.

A análise estatística entre cada antifúngico em relação à infecção do paciente pelo HIV e em relação às espécies de *Cryptococcus* foi realizada por meio do teste Mann-Whitney. Houve associação estatisticamente significativa entre o valor de CIM de itraconazol e a infecção do paciente pelo HIV ( $p = 0,042$ ) e a espécie de *Cryptococcus* isolada ( $p = 0,003$ ).

Tabela 6 – Variação e média geométrica da concentração inibitória mínima (CIM) dos agentes antifúngicos segundo infecção pelo HIV e espécie de *Cryptococcus* isolado, Campo Grande-MS, maio de 1997 a dezembro de 2008

Variável	Parâmetro CIM	CIM (µg/mL) de:			
		Anfotericina B	Fluconazol	Itraconazol	Voriconazol
HIV Positivo (96)	Variação	0,125-1,00	0,25-16,00	0,015-0,25	0,015-0,25
	Média Geométrica	0,41	1,50	0,07	0,03
HIV Negativo (17)	Variação	0,25-0,50	0,25-8,00	0,03-0,50	0,015-0,125
	Média Geométrica	0,46	1,38	0,10	0,03
Não Realizado (3)	Variação	0,25-0,50	0,25-2,00	0,06-0,125	0,015-0,03
	Média Geométrica	0,40	0,79	0,08	0,02
<i>C. neoformans</i> (107)	Variação	0,125-1,0	0,25-16,00	0,015-0,125	0,015-0,25
	Média Geométrica	0,41	1,45	0,07	0,03
<i>C. gattii</i> (9)	Variação	0,25-0,50	0,25-8,00	0,03-0,50	0,015-0,125
	Média Geométrica	0,46	1,59	0,13	0,04
Total (116)	Variação	0,125-1,00	0,25-16,00	0,015-0,50	0,015-0,25
	Média Geométrica	0,42	1,46	0,07	0,03

Com relação à avaliação genotípica realizada, observou-se que de 107 *C. neoformans*, 102 (87,9%) eram do tipo molecular VNI e cinco (4,3%) do tipo VNII. Todos os nove (7,8%) *C. gattii* eram do tipo VGII (Tabela 7).

Análise estatística realizada por meio do teste Z mostrou que houve associação estatística entre o tipo molecular do *Cryptococcus* e infecção do paciente pelo HIV ( $p < 0,001$ ).

Tabela 7 – Tipos moleculares de *Cryptococcus* responsáveis pelos casos de criptococose segundo infecção pelo HIV, Campo Grande-MS, maio de 1997 a dezembro de 2008

Tipos Moleculares	Infecção pelo HIV						Total	
	Sim (n=96)		Não (n=17)		Desconhecida (n=3)		Nº.	%
	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%		
VNI	89	92,7	11	64,7	2	66,7	102	87,9
VNII	4	4,2	-	-	1	33,3	5	4,3
VGII	3	3,1	6	35,3			9	7,8

A Figura 8 ilustra a perfil de amplificação do gene URA5 (= 734 pb) de *Cryptococcus* pela técnica de PCR e a Figura 9 mostra os três tipos moleculares determinados pela técnica RFLP-URA5.

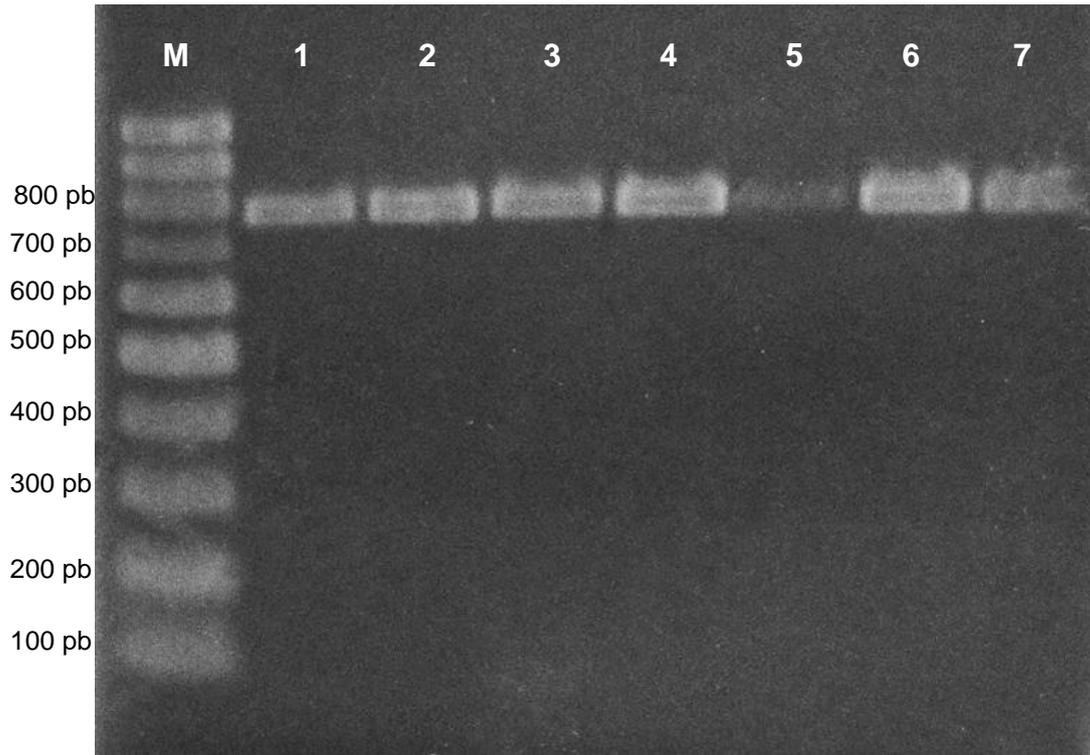


Figura 8 – Perfil da amplificação do gene URA5 (734 pb) pela PCR de isolados de *Cryptococcus*. M: marcador de peso molecular de 100 pb. Linha 1-7: isolados de *Cryptococcus*.

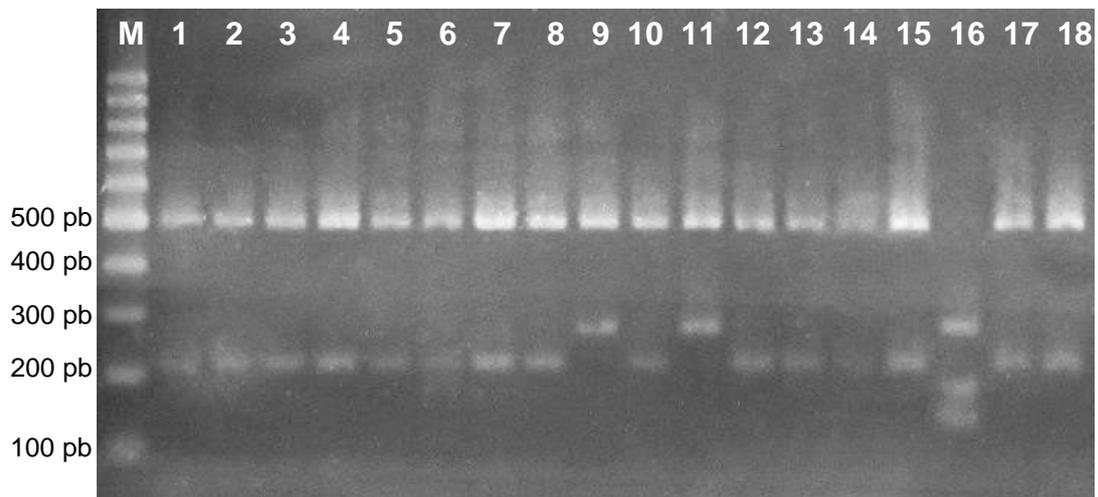


Figura 9 – Perfil *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) do gene URA5 duplamente digerido com *Sau96I* e *HhaI* dos isolados de *Cryptococcus*. M: marcador de peso molecular de 100 pb. Linhas 1-8, 10, 12-15, 17 e 18: isolados do tipo molecular VNI; linhas 9 e 11: isolados do tipo molecular VNII; linha 16: isolado do tipo molecular VGII.

## 6 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo mostram que a maioria dos casos de criptococose ocorreu em pacientes HIV positivos (82,8%). Esses dados corroboram com estudos prévios que afirmam que essa doença é bastante comum nesse grupo de pacientes (DROMER et al., 2004; PASQUALOTTO et al., 2004; SILVA et al., 2008).

Em pacientes com AIDS, a criptococose é a segunda infecção fúngica mais frequente, sendo a candidíase a primeira (WANKE; LAZÉRA; NUCCI, 2000). A alta frequência dessa doença, entre os pacientes HIV positivo, justifica o fato de o Ministério da Saúde classificar a criptococose como doença indicativa de AIDS (BRASIL, 2010).

Pesquisas realizadas na Europa e na Tailândia descreveram 77,0% e 83,7% de criptococose em HIV positivos, respectivamente, (JONGWUTIWES; SUNGKANUPARPH; KIERTIBURANAKUL, 2008; VIVIANI et al., 2006).

No HU-UFMS, entre maio de 1997 e dezembro de 2008, a criptococose foi diagnosticada com maior frequência em pacientes do sexo masculino tanto nos infectados pelo vírus HIV (72,9%) quanto nos não infectados (70,6%), corroborando com resultados de outros autores (CASTAÑÓN-OLIVARES et al., 2000; DARZÉ et al., 2000; DROMER et al., 2004; FERNANDES et al., 2000; PASQUALOTTO et al., 2004).

Na presente casuística, em ambos os grupos, a maioria dos pacientes tinha idade entre 31 e 40 anos. Essa faixa etária coincide com a dos portadores do HIV no Brasil (BRASIL, 2009).

Já está estabelecido na literatura, que a criptococose é mais comum em adulto jovem, e menos frequente em criança (CASTAÑÓN-OLIVARES et al., 2000; OLIVEIRA; NEGREIROS; TREVISOL-BITTERNCOURT, 2000; PASQUALOTTO et al., 2004; VIVIANI et al., 2006). Do total de casos estudados, apenas um caso foi documentado em criança, de dez anos de idade e portadora do HIV. De acordo com Abadi et al. (1999) a prevalência de criptococose em crianças com AIDS é menor (1,4%) que em adultos (6-10%). Diferente do observado em outras regiões do Brasil, no Norte e Nordeste tem sido descrito um número maior de casos em pacientes pediátricos (CORRÊA et al., 1999; DARZÉ et al., 2000; SANTOS et al., 2008). A

maioria dos casos relatados foi associada a *C. gattii* (CORRÊA et al., 1999; SANTOS et al., 2008).

No que diz respeito à procedência e naturalidade dos pacientes, os resultados encontrados foram semelhantes à pesquisa anterior, no mesmo hospital, realizado por Lindenberg et al. (2008). Apenas um (0,9%) paciente era proveniente de outro estado (MG) e 82 (72,5%) da capital Campo Grande - MS. Como descrito, 28 pacientes foram encaminhados do interior do estado, buscando atendimento no HU-UFMS, considerado hospital de referência no diagnóstico e tratamento de doenças infecto parasitárias. Grande parte dos pacientes (65,6%) nasceu no Estado de Mato Grosso do Sul, o que sugere que esses casos sejam autóctones.

Cerca de 90% dos pacientes incluídos no presente estudo residiam na área urbana, fato também relatado por outros autores (OLIVEIRA; NEGREIROS; TREVISOL-BITTENCOURT, 2000; LEIMANN; KOIFMAN, 2008).

A análise geral das características demográficas e a infecção pelo HIV mostrou que houve associação estatisticamente significativa entre residir em zona urbana e ser portador do vírus HIV, assim como residir em zona rural e não ser portador do vírus HIV ( $p < 0,001$ ). Isso mostra padrão demográfico de distribuição dos pacientes com AIDS, que vivem principalmente, nas cidades, e da espécie *C. gattii* que acomete, principalmente pacientes hígidos provenientes da zona rural (CHEN et al., 2000; KWON-CHUNG; BENETT, 1992).

Quanto às formas clínicas, meningoencefalite foi a mais descrita (74; 65,5%) independente de ser portador ou não do HIV. Esses dados são similares aos da literatura e reforçam que o fungo tem tropismo pelo SNC (BICANIC; HARRISON, 2004; BIVANCO; MACHADO; MARTINS, 2006; KWON-CHUNG; BENNETT, 1992).

Segundo Ecosteguy et al. (2004), de 694 casos estudados de meningite em hospital do Rio de Janeiro, 85 (12,3%) tiveram como agente etiológico *Cryptococcus* sp e entres estes, 84,7% tinham co-infecção com o HIV.

Neste estudo, a ocorrência de criptococemia sem foco aparente só foi observada em pacientes imunocomprometidos. Esse dado sugere que a infecção da corrente sanguínea por esse fungo pode estar relacionado com a imunidade celular. Pasqualotto et al. (2004) em estudo realizado com 28 pacientes com criptococemia, encontrou apenas um imunocompetente. Em estudo realizado em Taiwan, de 52 pacientes com criptococemia, três não tinham nenhuma condição predisponente (JEAN et al., 2002).

No período estudado, cinco (4,4%) pacientes apresentaram apenas acometimento pulmonar, esses dados são similares ao relatado por Silva et al. (2008) em estudo realizado no Triângulo Mineiro; e por Micol et al. (2007), no Camboja.

De acordo com o consenso brasileiro de criptococose, a infecção pulmonar por *Cryptococcus* é de difícil diagnóstico, pode passar despercebida e algumas vezes mimetizar outras patologias como tuberculose, histoplasmose e neoplasias (MORETTI et al., 2008). A forma pulmonar tende a disseminar nos pacientes imunocomprometidos, e a forma cutânea pode funcionar como marcador dessa disseminação (BIVANCO; MACHADO; MARTINS, 2006; KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; MITCHELL; PERFECT, 1995).

Na presente casuística, dos cinco casos de criptococose pulmonar, apenas um foi em HIV negativo. Por outro lado, em estudo realizado na Tailândia, a frequência encontrada dessa apresentação clínica foi de 2,7% e 34,5% em pacientes soropositivos e soronegativos, respectivamente (JONGWUTIWES; SUNGKANUPARPH; KIERTIBURANAKUL, 2008).

Neste trabalho, os principais sintomas relatados pelo corpo clínico nos prontuários foram febre, cefaleia e vômito, dados esses, semelhantes ao encontrado por outros autores e que correspondem a manifestações meníngeas (DARZÉ et al., 2000; FERNANDES et al., 2000; MORGAN et al., 2006; VIVIANI et al., 2006).

Co-infecção por outros patógenos, como candidíase oral, tem sido descrita por outros autores (MICOL et al., 2007; MORGAN et al., 2006) e também foi observada na presente casuística.

A criptococose é considerada uma doença oportunista, geralmente acomete pacientes debilitados ou com alguma doença de base. A esse respeito, 92,9% dos pacientes deste estudo apresentaram alguma condição de risco e a AIDS foi a principal (84,9%). Esse fato também foi observado em outras pesquisas (CASTAÑÓN-OLIVARES et al., 2000; DANNAOUI et al., 2006; DARZÉ et al., 2000; ECOSTEGUY et al., 2004; FAVALESSA et al., 2009; JONGWUTIWES; SUNGKANUPARPH; KIERTIBURANAKUL, 2008; NISHIKAWA et al., 2003; SILVA et al., 2008; VIVIANI et al., 2006).

Nos pacientes HIV negativo, outras condições de risco foram observadas, como: diabetes mellitus; uso de imunossupressor; e lúpus eritematoso sistêmico, condições essas também relatadas por outros pesquisadores (DARZÉ et al., 2000;

JONGWUTIWES; SUNGKANUPARPH; KIERTIBURANAKUL, 2008; SILVA et al., 2008; VIVIANI et al., 2006).

Faz-se importante destacar que entre os pacientes HIV negativo, 47,1% não tinham nenhuma condição de risco aparente. Resultado este, superior ao relatado por outros autores (DROMER et al., 2004; JONGWUTIWES; SUNGKANUPARPH; KIERTIBURANAKUL, 2008; VIVIANI et al., 2006) que mostram variação de 25,4% a 31,0% em estudos realizados na Europa, Tailândia e França.

Quanto ao uso de antifúngicos, o consenso brasileiro de criptococose (MORETTI et al., 2008) e a sociedade de doenças infecciosas da América (PERFECT et al., 2010) recomendam na fase de indução o uso combinado de anfotericina B mais fluocitosina, para tratamento da neurocriptococose ou sua forma disseminada, e na fase de consolidação o fluconazol.

No Brasil, a alternativa para o tratamento na fase de indução é o uso de anfotericina B associado ao fluconazol, visto que a fluocitosina não está disponível no País.

Neste estudo, seis (5,4%) pacientes não receberam tratamento antifúngico e todos evoluíram para óbito. Esse fato mostra que a criptococose é uma doença de grande impacto na atualidade, e que o tratamento deve ser instituído de forma rápida.

Entre os pacientes tratados, o antifúngico mais utilizado foi anfotericina B associado ou não ao fluconazol, conforme também descrito por outros pesquisadores (JONGWUTIWES; SUNGKANUPARPH; KIERTIBURANAKUL, 2008; SILVA et al., 2008).

No que diz respeito ao tempo de internação, a mediana foi de 25 dias para pacientes HIV positivos e 20 dias para os HIV negativos. Dados similares foram encontrados por Micol et al. (2007) em pacientes infectados pelo HIV, no Camboja. O maior tempo de internação entre esses pacientes pode ser justificado pela imunodepressão e pela presença de doenças associadas.

O uso de terapia antiretroviral foi relatado em apenas 20,8% dos pacientes HIV positivo. Apesar desse dado não ter sido investigado no presente estudo, muitos pacientes só tomam conhecimento de que é portador do vírus HIV a partir do diagnóstico da criptococose.

Em pesquisa realizada na Europa, Viviani et al. (2006) encontraram uma frequência de 10,1% de uso de terapia antiretroviral nos pacientes com criptococose.

Jongwutiwes, Sungkanuparph e Kiertiburanakul (2008), em estudo na Tailândia, encontraram frequências de recaída de criptococose de 13,5%, 24,7% e 10,3% para pacientes HIV positivo com uso de antiretroviral, HIV positivo sem uso de antiretroviral e HIV negativo, respectivamente. Os autores destacam a importância do uso correto de antiretroviral para a prevenção de doenças oportunistas, como a criptococose.

Na presente casuística, mais de 50% dos pacientes com criptococose foram a óbito. Dados sobre letalidade em pacientes com essa micose, variam de 23,0% a 74,2% em diferentes estudos (ABADI et al., 1999; DARZÉ et al., 2000; JONGWUTIWES; SUNGKANUPARPH; KIERTIBURANAKUL, 2008; MORGAN et al., 2006; PASQUALOTTO et al., 2004; SILVA et al., 2008).

De acordo com Prado et al. (2009), entre 1996 e 2006, no Brasil, de 125.633 mortes de pacientes portadores de HIV, 5.898 (47%) foram associadas a micose sistêmica como causa da morte e o *Cryptococcus* sp foi o segundo agente etiológico mais encontrado.

Segundo Ribeiro et al. (2009), criptococose foi a micose sistêmica mais frequente e responsável pelo maior número de óbitos em pacientes infectados pelo HIV, em Cuiabá, no período de 2005 a 2008.

*Cryptococcus* foi isolado de diferentes sítios no presente estudo, principalmente LCE (95; 81,9%); e sangue (31; 26,7%), como também relatado por outros autores (DROMER et al., 2004; VIVIANI et al., 2006).

É importante destacar que dos 26 pacientes com a forma disseminada da criptococose quase 50% (n = 12) tiveram o agente etiológico isolado na urina. Em seis a urina foi a primeira amostra clínica de isolamento da levedura e em quatro foi a única. Esse dado reforça a idéia de Pinto Junior et al. (2006), que refere a importância da realização de exames micológicos na urina, para o diagnóstico da criptococose, por ser uma amostra clínica de fácil obtenção comparado com outras.

De acordo com os especialistas (MORETTI et al., 2008), a maioria dos pacientes com meningite criptocócica apresenta celularidade liquórica com valores acima de 10 células/mm<sup>3</sup> com predomínio de células linfomonocitárias, hiperproteínorraquia e hipoglicorraquia, como também observado no presente estudo.

O fato de 33,7% dos pacientes terem apresentado citologia liquórica igual ou inferior a 5 células/mm<sup>3</sup>, mostra a importância de se realizar investigação de agentes

infeciosos, mesmo que não haja pleocitose, pois a baixa celularidade pode estar associada a imunidade celular do paciente.

Os dois parâmetros laboratoriais que permitem estimar o prognóstico da AIDS são a contagem de linfócitos CD4 e determinação do número de cópias virais do HIV. A destruição de linfócitos T CD4, um dos principais alvos do vírus HIV, resulta em grave disfunção no sistema imunológico do portador. Com o agravamento da infecção há um aumento da carga viral e uma diminuição da contagem das células CD4, de forma significativa (BRASIL, 2010).

Essa avaliação foi realizada em 46,9% dos pacientes portadores desta doença. Os resultados evidenciaram importante imunodepressão pela baixa contagem de células CD4 com mediana de 33 células/mm<sup>3</sup> e alta carga viral. A elevada frequência (84,4%) de pacientes com contagem de células CD4 abaixo de 100 células/mm<sup>3</sup> evidencia a gravidade do quadro dos pacientes com criptococose estudados. Esses dados são similares ao encontrados por outros pesquisadores (MICOL et al., 2007; OLIVEIRA; NEGREIROS; TREVISOL-BITTENCOURT, 2000; VIVIANI et al., 2006).

Micol et al. (2007), em pesquisa no Camboja, constataram que a prevalência da criptococose diminui com o aumento da contagem de células CD4. Os autores enfatizam a investigação desta micose em pacientes com contagem de células CD4 inferior a 100 células/mm<sup>3</sup>.

Em relação ao micológico direto, houve positividade no LCE de 83,9% entre os pacientes com a cultura positiva. Oliveira; Negreiros; Trevisol-Bittencourt (2000) relataram 86,7% de micológico direto positivo em pacientes com neurocriptococose. Morgan et al. (2006) e Viviani et al. (2006) encontraram frequência de 96,0% e 93,6% respectivamente, de positividade entre os pacientes que realizaram esta pesquisa.

Na presente investigação *C. neoformans* foi a espécie mais isolada (92,2%), como mostrado na tabela 5. A análise estatística mostrou associação significativa entre as espécies de *Cryptococcus* e a infecção do paciente pelo HIV, revelando que *C. neoformans* foi responsável pela criptococose na maioria dos pacientes com AIDS, e *C. gattii* acometeu principalmente pacientes com sorologia negativa para o HIV ( $p < 0,001$ ).

Já está bem estabelecido na literatura que *C. neoformans* é o agente mais frequente isolado de amostras clínicas. Costuma ser mais prevalente em

imunocomprometidos, variando de 93,3% a 99%, em diferentes casuísticas (DROMER et al.; 2004; FAVALESSA et al., 2009; FERNANDES et al., 2003; NISHIKAWA et al. 2003; PASQUALOTTO et al., 2004). Infecção em imunocompetentes também tem sido descrita (FAVALESSA et al., 2009; LINDENBERG et al., 2008; NISHIKAWA et al. 2003).

Outras pesquisas na região Centro-Oeste também mostraram *Cryptococcus neoformans* como a principal espécie causadora de criptococose (FAVALESSA et al., 2009; FERNANDES et al., 2003; RIBEIRO et al., 2009; SILVA et al., 2008; SOUZA et al., 2005).

Estudo realizado com isolados clínicos provenientes de diversos Estados brasileiros, por Nishikawa et al. (2003), demonstrou que a maioria dos casos de criptococose, descritos nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, tem como agente etiológico *Cryptococcus neoformans*, sorotipo A, enquanto que nas regiões Norte e Nordeste, o mais encontrado é *C. gattii*, sorotipo B.

Corroborando com essa ideia, pesquisas feitas na Europa, países da América Latina, Austrália, Nova Zelândia, África do Sul e Canadá, também tiveram *C. neoformans* como espécie mais prevalente (CALVO et al., 2001; CASTAÑÓN-OLIVARES et al., 2000; CHEN et al., 2000; DROMER et al., 2004; HOANG et al., 2004; MEYER et al., 2003; MORGAN et al., 2006; VIVIANI et al., 2006).

Com o intuito de detectar emergência de *Cryptococcus* resistentes aos antifúngicos, a suscetibilidade *in vitro* tem sido estudada por diversos pesquisadores (ALVES et al., 2001; ILLNAIT-ZARAGOZI et al., 2008; PFALLER et al., 2005; SILVA et al., 2008; SOUZA et al., 2005; THOMPSON III et al., 2009).

No presente trabalho, os isolados clínicos de *Cryptococcus* apresentaram-se, em sua maioria, sensíveis a todos os antifúngicos testados, como também observado por outros autores (CALVO et al., 2001; CHEN et al., 2000; FAVALESSA et al., 2009; SILVA et al. 2008; PFALLER et al., 2005).

Na presente investigação destaca-se um isolado de *Cryptococcus neoformans*, proveniente de um paciente HIV positivo, sensível dose dependente (SDD) ao fluconazol (CIM=16,0) e ao voriconazol (CIM=0,25) no teste *in vitro*. Esse paciente havia sido atendido anteriormente em outra unidade hospitalar e interrompeu, de forma indevida, o uso do fluconazol durante o tratamento da fase de manutenção da criptococose. Esse resultado sugere que o uso de fluconazol pode ser responsável pela elevação da concentração inibitória mínima *in vitro* tanto do

fluconazol quanto do voriconazol, corroborando com a ideia de alguns autores de que o uso prolongado de fluconazol pode estar associado ao desenvolvimento de resistência aos azóis (ALLER et al., 2000; ALVES et al., 2001; BENNETT, 2006; MACHADO, 2006; SILVA et al., 2008).

Dois pacientes com criptococose causada por *C. gattii* foram SDD ao itraconazol, um HIV negativo, proveniente de área rural, com infecção pulmonar e outro HIV positivo, com forma disseminada. Como esses pacientes não faziam uso de antifúngico, acredita-se que os valores de CIM, na faixa de SDD, podem ser decorrentes da espécie envolvida, pois dados da literatura mostram que valores de CIM de *C. gattii*, em geral, são mais elevados em testes *in vitro* (DE BEDOUT et al., 1999; FAVALESSA et al., 2009; FERNANDES et al., 2003; SILVA et al., 2008). No presente estudo, *C. gattii* foi, de forma estatisticamente significativa, menos sensível *in vitro* que *C. neoformans* apenas ao itraconazol ( $p = 0,003$ ).

Sob outra perspectiva, estudo realizado por Thompson III et al. (2009), não encontrou diferença significativa nas CIMs, entre as espécies de *Cryptococcus*, com seis antifúngicos testados pela técnica de microdiluição descrita pela no documento M27-A2 do CLSI.

Apesar de três pacientes terem amostras de *Cryptococcus* não sensíveis a algum antifúngico, apenas o que teve a levedura SDD ao fluconazol (CIM = 16 µg/mL) e ao voriconazol (CIM = 0,25 µg/mL) foi a óbito. Esses dados corroboram com estudo de Aller et al. (2000), que observou que todos os pacientes com isolados que apresentaram CIM  $\geq 16$  µg/mL tiveram insucesso na terapia antifúngica utilizada (AMB associada ao FLC) e concluiu que este valor de CIM pode prever a evolução clínica do paciente. Assim, faz-se importante o monitoramento do perfil de suscetibilidade *in vitro* dessas leveduras, principalmente em casos de falha terapêutica, a fim de orientar corretamente o tratamento.

A anfotericina B é utilizada na fase inicial da criptococose, associada ao fluconazol ou isolada, entretanto, a sua nefrotoxicidade limita sua utilização (DE BEDOUT et al., 1999; ILLNAIT-ZARAGOZI et al., 2008; SERENA et al., 2005). No presente estudo todos os *Cryptococcus* isolados foram sensíveis a esse fármaco, corroborando com outros pesquisadores (ALVES et al., 2001; CALVO et al., 2001; ILLNAIT-ZARAGOZI et al., 2008, PAPPALARDO et al., 2009; SERENA et al., 2005; TRILLES et al., 2004). Resistência a anfotericina B é incomum, mas já foi relatada em pesquisas anteriores (DE BEDOUT et al., 1999; SILVA et al., 2008).

Apesar de não utilizado no tratamento de criptococose, o antifúngico com melhor atividade *in vitro* contra *Cryptococcus* foi voriconazol (CIM = 0,015 a 0,25 µg/mL), dados também observados por outros pesquisadores (ILLNAIT-ZARAGOZI et al., 2008; SOUZA et al., 2005; THOMPSON III et al., 2009).

Com os avanços das técnicas de biologia molecular, pesquisas têm sido realizadas em diferentes locais do mundo, a fim de se obter um melhor entendimento da epidemiologia da criptococose e da distribuição do agente etiológico no ambiente (CASALI et al., 2003; CHEN et al., 2010; ESCADÓN et al., 2006; FRASÉS et al., 2009; LITVINTSEVA et al., 2005).

Dados de análise genética de *Cryptococcus*, na região Centro-Oeste, ainda são escassos. No presente estudo foram encontrados três, dos oito tipos moleculares de *Cryptococcus* classificados por Meyer et al. (1999, 2003): VNI (87,9%), VGII (7,8%) e VNII (4,3%).

Analisando, independentemente, tipo molecular do isolado e infecção do paciente pelo HIV, foi observada associação significativa entre VNI e HIV positivo e entre VGII e HIV negativo ( $p < 0,001$ ). Outros autores também verificaram essa prevalência (CASALI et al., 2003; ESCADÓN et al., 2006; KIDD et al., 2004; SANTOS et al., 2008).

Em recente estudo realizado no mesmo hospital, por Pasa (2011), com quinze amostras clínicas de pacientes atendidos no período de fevereiro de 2009 a julho de 2010, os tipos moleculares identificados foram VNI (73,3%) e VGII (26,7%).

No Rio Grande do Sul, em estudo conduzido por Casali et al. (2003), houve predomínio de VNI em amostras clínicas (89,5%) e ambientais (52,6%).

De forma semelhante, no Estado de São Paulo, Matsumoto et al. (2007) mostraram que houve prevalência do tipo molecular VNI (95,7%) em estudo realizado com isolados de 35 pacientes HIV positivos de São José do Rio Preto, Santos, Araraquara e Ribeirão Preto.

Pesquisa conduzida no Pará, em hospital da cidade de Belém, por Santos et al. (2008) mostraram prevalência de VNI (50%), entretanto, ao contrário das outras regiões do Brasil, foi encontrado uma alta frequência de VGII (44,6%). Reforçando a ideia de que infecção por *C. gattii* é mais encontrada nas Regiões Norte e Nordeste (NISHIKAWA et al., 2003).

Entre os isolados brasileiros incluídos no estudo de Meyer et al. (2003) houve predomínio do tipo molecular VNI (82,3%), seguido de VGII (13,6%) e VNII (3%), esses resultados são similares ao observado pela presente casuística.

Estudo multicêntrico foi realizado por Trilles et al. (2008) com 443 leveduras isoladas de amostras clínicas, ambientais e duas veterinárias provenientes de onze Estados brasileiros. O tipo molecular mais encontrado foi VNI (64%), seguido por VGII (21%), VNII (5%), VGIII (4%), VGI (3%) e VNIV (3%). Nas regiões Norte e Nordeste a prevalência foi de VGII (63,6%).

Diferenças na distribuição geográfica entre os tipos moleculares têm sido descritas. Meyer et al. (1999) em estudo multicêntrico com isolados de amostras clínicas provenientes da Austrália, Argentina, Brasil, Índia, Itália, Nova Zelândia, África do Sul, Tailândia e EUA, encontraram prevalência do tipo molecular VNI em quase todos os países, com exceção da Itália, onde o tipo molecular mais encontrado foi VNIII.

Estudo posterior realizado por Meyer et al. (2003) com *Cryptococcus* isolados de amostras clínicas, ambientais e veterinárias, observou predominância de VNI em oito países da América Latina, incluindo Argentina, Brasil, Chile, Colômbia, Guatemala, México, Peru e Venezuela. Na Espanha o predomínio foi de VNIII.

Um surto do tipo molecular VGII foi descrito por Kidd et al. (2004) na Ilha de Vancouver, Canadá, local de clima temperado, notando uma mudança de distribuição deste tipo molecular, que até o momento do estudo acreditava-se ser restrito a climas tropicais e subtropicais.

Pesquisa realizada por Escadón et al. (2006), na Colômbia, e por Chen et al. (2010), no Sudeste da China, mostrou que o tipo molecular predominante entre os pacientes com criptococose é o VNI.

Frasés et al. (2009) verificaram a elevada presença do tipo molecular VNIII em isolados clínicos (28,9%) e isolados ambientais provenientes fezes de pombos (50%), na Espanha.

Veron et al. (2009) demonstraram que a PCR em tempo real pode ser realizada diretamente de amostras clínicas. De acordo com os autores, observou-se alta sensibilidade, especificidade e rapidez. O resultado pode ser obtido em três horas, utilizando amostras de LCE, lavado bronco alveolar, aspirado de medula óssea e sangue. A grande desvantagem é o alto custo do equipamento que ainda não é acessível para os laboratórios que realizam exames de rotina.

Com os resultados obtidos na presente pesquisa que incluiu *Cryptococcus* isolados de amostras clínicas de um período de 11 anos, foi possível estimar a frequência de criptococose com identificação do agente etiológico ao nível de espécie, tipo molecular e a susceptibilidade aos antifúngicos em um Hospital público de referência no estado do Mato Grosso do Sul. Acredita-se que os resultados encontrados poderão servir para documentar as características epidemiológicas dos pacientes com criptococose, bem como o perfil fenotípico e genético das leveduras encontradas na região e contribuir com a ecoepidemiologia nacional da criptococose em estudos futuros.

## 7 CONCLUSÕES

Em síntese, a epidemiologia da criptococose, em hospital público de referência no diagnóstico e tratamento de doenças infecciosas do Estado de Mato Grosso do Sul, reflete o consenso mundial: ocorrem em maior número em homens, adultos, procedentes da própria região e residentes na área urbana.

Houve significância estatística entre área de residência e infecção pelo HIV. Entre os pacientes que residiam na área urbana a maioria era soropositivo, enquanto nos da área rural houve predomínio de soronegativos. Poucos pacientes (20,8%) faziam o uso de antiretroviral. Trinta e oito de quarenta e cinco pacientes apresentavam células CD4 inferior a 100 células/mm<sup>3</sup>.

Não foi observado nenhum fator predisponente evidente para a infecção por *Cryptococcus* spp. em 47% dos pacientes HIV negativos.

Em relação às características clínicas, observou-se predomínio de meningoencefalite e infecção disseminada. Elevada letalidade foi observada: 53,1% entre os pacientes co-infectados pelo HIV e 43,8% entre os não infectados.

A urina foi uma importante amostra clínica para o diagnóstico de criptococose disseminada.

Na maioria dos pacientes que realizaram punção liquórica foi observado hiperproteínoorraquia e hipoglicorraquia. Cerca de 34,0% apresentaram citologia com parâmetros normais.

A análise das características laboratoriais mostrou que houve significância estatística entre as espécies causadoras da criptococose e a infecção pelo HIV. *C. neoformans* foi mais encontrado em pacientes HIV positivo, enquanto *C. gattii* em HIV negativo.

No teste de suscetibilidade antifúngica, todos foram sensíveis a anfotericina B. Apenas uma levedura foi sensível dose dependente ao fluconazol e ao voriconazol e duas outras ao itraconazol. A levedura com baixa sensibilidade ao fluconazol e voriconazol, foi isolada de um paciente com exposição prévia ao fluconazol, alertando para o possível desenvolvimento de resistência cruzada aos azóis.

Na análise molecular foram identificados três tipos moleculares: VNI, VNII e VGII. Em pacientes HIV positivo VNI foi o mais encontrado e em HIV negativo VGII, dado esse estatisticamente significativo.

A distribuição dos tipos moleculares em Mato Grosso do Sul, com predomínio de VNI, se assemelha às regiões Sul e Sudeste do Brasil.

## REFERÊNCIAS

ABADI, J.; NACHMAN, S.; KRESSEL, A. B.; PIROFSKI, L. Cryptococcosis in children with AIDS. **Clinical Infections Disases**, Boston, v. 28, n. 2, p. 309-313, Feb.1999.

ALLER, A. I.; MARTIN-MARZUELOS, E.; LOZANO, F.; GOMEZ-MATEOS, J.; STEELE-MORE, L.; HOLLOWAY, W. J.; GUTIÉRREZ, M. J.; RECIO, F. J.; ESPINEL-INGROFF, A. Correlation of fluconazole MICs with clinical outcome in cryptococcal infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 44, n. 6, p. 1544-1548, June 2000.

ALVES, S. H.; OLIVEIRA, L. T.; COSTA, J. M.; LUBECK, I.; CASALI, A. K.; VAINSTEINS, M. H. In vitro susceptibility to antifungal agents of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolated in southern of Brazil. **Revista do Instituto Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 43, n. 5, p. 267-270, set./out. 2001.

ANDRADE, C. S. **Atividade de novos antifúngicos sobre *Cândida spp* e *Cryptococcus neoformans***. 2004. 124 f. Tese (Mestrado em Ciência e Tecnologia Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria/UFSM, Santa Maria, 2004.

BENNETT, J. E. Antimicrobianos: agentes antifúngicos. In: Goodman, L. S.; GILMAN, A. G.; HARDMAN, J. G.; LIMBRID, L. E. (Org). **Goodman & Gilman As bases farmacológicas da terapêutica**. 11 ed, Rio de Janeiro: McGraw-Hill; 2006. p. 1103-1118.

BIALEK, R.; WEISS, M.; BEKURE-NEMARIAM, K.; NAJVAR, L. K.; ALBERDI, M. B.; GRAYBILL, J. R.; REISCHL, U. Detection of *Cryptococcus neoformans* DNA in tissue samples by nested and real-time PCR assays. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 2, p. 461-469, Mar. 2002.

BICANIC, T.; HARRISON, T. S. Cryptococcal meningitis. **British Medical Bulletin**, v. 72, n. 1, p. 99-118, Dec. 2004.

BIVANCO, F. C.; MACHADO, C. A. S.; MARTINS, E. L. Criptococose cutânea. **Arquivos Médicos do ABC**, Santo André, v. 31, n. 2, p. 102-109, jul./dez. 2006.

BOEKHOUT, T.; VAN BELKUM, A.; LEENDERS, A. C. A. P.; VERBRUGH, H. A.; MUKAMURANGWA, P.; SWINNE, D.; SCHEFFERS, A. Molecular typing of *Cryptococcus neoformans*: taxonomic and epidemiological aspects. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, n. 2, p. 432-442, Apr. 1997.

BOEKHOUT, T.; THEELEN B.; DIAZ, M.; FELL, J. W.; HOP, W. C. J.; ABELN, E. C. A.; DROMER, F.; MEYER, W. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology**, Reading UK, v. 147, n. 4, p. 891-907, Apr. 2001.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAIS, R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 32, n. 3, p. 114-131, May 1980.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Boletim epidemiológico – AIDS e DST (ano VI n 1). Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso, 8 ed., Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

CALVO, B. M.; COLOMBO, A. L.; FISCHMAN, O.; SANTIAGO, A.; THOMPSON, L.; LAZERA, M.; TELLES, F.; FUKUSGIMA, K.; NISHIMURA, K.; TANAKA, R.; MYIAJY, M.; MORETTI-BRANCHINI, M. L. Antifungal susceptibilities varieties, and electrophoretic karyotypes of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* from Brazil, Chile, and Venezuela. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 6, p. 2348-2350, June 2001.

CASALI, A. K.; GOULART, L.; SILVA, L. K. R.; RIBEIRO, A. M.; AMARAL, A. A.; ALVES, S. H.; SCHRANK, A.; MEYER, W.; VAINSTEIN, M. H. Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. **FEMS Yeast Research**, Flórida, v. 3, n. 4, p. 405-415, June 2003.

CASTAÑÓN-OLIVARES, L. R.; ARREGUIN-ESPINOSA, R.; SANTOS, G. R.; LÓPEZ-MARTINÉZ, R. Frequency of *Cryptococcus* species and varieties in México and their comparison with some Latin American Countries. **Revista Latino Americana de Microbiologia**, v. 42, n. 1, p. 35-40, jan./mar. 2000.

CHANG, M. R.; PANIAGO, A. M. M.; SILVA, M. M.; LAZÉRA, M. S.; WANKE, B. Prostatic cryptococcosis – a case report. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, Botucatu, v. 14, n. 2, p. 378-385, May 2008.

CHEN, S.; SORREEL, T.; NIMMO, G.; SPEED, B.; CURRIE, B.; ELLIS, D.; MARRIOTT, D.; PFEIFFER, T.; PARR, D.; BYTH, K. Epidemiology and host- and variety-dependent characteristics of infection due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zeland. **Clinical Infectious Diseases**, Boston, v. 31, n. 2, p. 499-508, Aug. 2000.

CHEN, M.; LI, X. R.; WU, S. X.; TANG, X. P.; FENG, B. W.; YAO, Z. R.; PAN, W. H.; LIAO, Q. W.; QUAN, Z. X. Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* species complex isolates from HIV-positive and HIV-negative patients in southeast China. **Frontiers of Medicine in China**, v. 4, n. 1, p. 117-126, 2010.

CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; third informational supplement. CLSI document M27-A3, Pennsylvania, v. 28, n. 15, 2008.

CORRÊA, M. P. S. C.; OLIVEIRA, E. C.; DUARTE, R. R. B. S.; PARDAL, P. P. O.; OLIVEIRA, F. M.; SEVERO, L. C. Criptococose em crianças no Estado do Pará, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 32, n. 5, p. 505-508, set./out. 1999.

DANNAOUI, E.; ABDUL, M.; ARPIN, M.; MICHEL-NGUYEN, A.; PIENS, M. A.; FAVEL, A.; LORTHOLARY, O.; DROMER, F.; FRENCH CRYPTOCOCCOSIS STUDY GROUP. Results obtained with various antifungal susceptibility testing methods do not predict early clinical outcome in patients with cryptococcosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 50, n. 7, p. 2464-2470, July 2006.

DARZÉ, C.; LUCENA, R.; GOMES, I.; MELO, A. Fatores prognósticos da meningoencefalite criptocócica. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, São Paulo, v. 57, n. 3, p. 649-652, set. 1999.

DARZÉ, C.; LUCENA, R.; GOMES, I.; MELO, A. Características clínicas laboratoriais de 104 casos de meningoencefalite criptocócica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 33, n.1, p. 21-26, jan./fev. 2000.

DE BEDOUT, C.; ORDÓÑEZ, N.; GÓMEZ, B. L.; RODRÍGUEZ, M. C.; ARANGO, M.; RESTREPO, A.; CASTAÑEDA, E. In vitro antifungal susceptibility of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* and *C. neoformans* var. *gattii*. **Revista Iberoamericana de Micología**, Bilbao, v. 16, n.1, p. 36-39, 1999.

DIAZ, M. R.; BOEKHOUT, T.; THEELEN, B.; FELL, J. M. Molecular sequence analyses of the intergenic spacer (IGS) associated with rDNA of the two varieties of the pathogenic yeast, *Cryptococcus neoformans* (abstract). **Systematic and Applied Microbiology**, v. 23, n. 4, p. 535-545, Dec. 2000.

DIAZ, M. R.; BOEKHOUT, T.; KIESLING, T.; FELL, J. W. Comparative analysis of the intergenic spacer regions and population structure of the species complex of pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. **FEMS Yeast Research**, Flórida, v. 5, n. 12, p. 1129-1140, July 2005.

DROMER, F.; MATHOULIN-PÉLISSIER, S.; FONTANET, A.; RONIN, O.; DUPONT, B.; LORTHOLARY, O. Epidemiology of HIV-associated cryptococcosis in France (1985-2001): comparison of the pre-and post-HAART eras. **AIDS**, London, v. 18, n. 3, p. 555-562, Feb. 2004.

ELLIS, D.H; PFEIFFER, T. J. Ecology, life cycle, and infectious propagule of *Cryptococcus neoformans*. **The Lancet**, London, vol. 336, n. 8720, p. 923-925, Oct. 1990.

ESCADÓN, P.; SÁNCHEZ, A.; MARTÍNEZ, M.; MEYER, W.; CASTAÑEDA, E. Molecular epidemiology of clinical and environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex reveals a high genetic diversity and the presence of the molecular type VGII mating type a in Colombia. **FEMS Yeast Research**, Flórida, v. 6, n. 4, p. 625-635, June 2006.

ESCOSTEGUY, C. C.; MEDRONHO, R. A.; MADRUGA, R.; DIAS, H. G.; BRAGA, R. C.; AZEVEDO, O. P. Vigilância epidemiológica e avaliação da assistência às meningites. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 38, n. 5, p. 657-663, out. 2004.

FAVALESSA, O. C.; RIBEIRO, L. C.; TADANO, T.; FONTES, C. J. F.; DIAS, F. B.; COELHO, B. P. A.; HAHN, R. C. Primeira descrição da caracterização fenotípica e susceptibilidade *in vitro* a drogas de leveduras do gênero *Cryptococcus* spp isoladas de pacientes HIV positivos e negativos, Estado de Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 42, n. 6, p. 661-665, nov./dez. 2009.

FERNANDES, O. F. L.; COSTA, T. R.; COSTA, M. R.; SOARES, A. J.; PEREIRA, A. J. S. C.; SILVA, M. R. R. *Cryptococcus neoformans* isolados de pacientes com AIDS. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 33, n. 1, p. 75-78, jan./fev. 2000.

FERNANDES, O. F. L.; PASSOS, X. S.; SOUZA, L. K. H.; MIRANDA, A. T. B.; CERQUEIRA, C. H. P. V.; SILVA, M. R. R. In vitro susceptibility characteristics of *Cryptococcus neoformans* varieties from AIDS patients in Goiânia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 98, n. 6, p. 839-841, set. 2003.

FERRER, C.; COLOM, F.; FRASÉS, S.; MULET, E.; ABAD, J. L.; ALIÓ, J. L. Detection and identification of fungal pathogens by ITS2 and 5.8S ribosomal DNA typing in ocular infections. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 8, p. 2873-2879, Aug. 2001.

FRANZOT, S. P.; HAMDAN, J. S.; CURRIE, B. P.; CASADEVALL, A. Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* in Brazil and the United States: Evidence for both local genetic differences and a global clonal population structure. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 35, n. 9, p. 2243-2251, Sep. 1997.

FRASÉS, S.; FERRER, C.; SÁNCHEZ, M.; COLOM-VALIENTE, M. F. Molecular epidemiology of isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex from Spain. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 26, n. 2, p. 112-117, June 2009.

HOANG, L. M. N.; MAGUIRE, J. A.; DOYLE, P.; FYFE, M.; ROSCOE, D. L. *Cryptococcus neoformans* infections at Vancouver Hospital and Health Sciences centre (1997-2002): epidemiology, microbiology and histopathology. **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, n. 9, p. 935-940, Sept. 2004.

HONG NGYEN, M.; YU, C. Y. In vitro comparative efficacy of voriconazole and itraconazole against fluconazole-susceptible and -resistant *Cryptococcus neoformans* isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 42, n. 2, p. 471-472, Feb. 1998.

HUFFNAGLE, G. B.; LIPSCOMB, M. F.; LOVCHIK, J. A.; HOAG, K. A.; STREET, N. E. The role of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in the protective inflammatory response to a pulmonary cryptococcal infection. **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v. 55, n. 1, p. 35-42, Jan. 1994.

ILLNAIT-ZARAGOZI, M. T.; MARTINEZ, G. F.; CURFS-BREUKER, I.; FERNÁNDEZ, C. M.; BOEKHOUT, T.; MEIS, J. F. In vitro activity of the new azole isavuconazole (BAL4815) compared with six other antifungal agents against 162 *Cryptococcus neoformans* isolates from Cuba. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 52, n. 4, p. 1580-1582, Apr. 2008.

JEAN, S. S.; FANG, C. T. ; SHAU, W. Y. ; CHEN, Y. C. ; CHANG, S. C. ; HSUEH, P. R. ; HUNG, C. C.; LUH, K. T. Cryptococcaemia: clinical features and prognostic factors. **QJM: An International Journal of Medicine**, v. 95, n. 8, p. 511-518, Aug. 2002.

JONGWUTIWES, U.; SUNGKANUPARPH, S.; KIERTIBURANAKUL, S. Comparison of clinical features and survival between cryptococcosis in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative patients. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 61, n. 2, p. 111-115, Mar. 2008.

KIDD, S. E.; HAGEN, F.; TSCHARKE, R. L.; HUYNH, M.; BARTLETT, K. H.; MACDOUGALL, L.; BOEKHOUT, T.; KWON-CHUNG, K. J.; MEYER, W. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 111, n. 49, p. 17258-17263, Nov. 2004.

KWON-CHUNG, K. J.; POLACHECK, I.; BENNETT, J. E. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotype A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotype B and C). **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 15, n. 3, p. 535-537, Mar. 1982.

KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. Cryptococcosis. **Medical mycology**. Philadelphia: Lea & Febiger, p. 397-446, 1992.

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

LARONE, D. H. **Medical Important Fungi: a guide to identification**. 3 ed. Washington: American Society for Microbiology, 1995.

LAZÉRA, M. S.; PIRES, F. D. A.; CAMILLO-COURA, L.; NISHIKAWA, M. M.; BEZERRA, C. C. F.; TRILLES, L.; WANKE, B. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in decaying wood forming hollows in living trees. **Medical Mycology**, London, v. 34, n. 2, p. 127-31, Apr. 1996.

LAZÉRA, M. S.; CAVALCANTI, M. A. S.; LONDERO, A. T.; TRILLES, L.; NISHIKAWA, M. M.; WANKE, B. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. **Medical Mycology**, London, v. 38, n. 5, p. 379-383, Oct. 2000.

LEIMMAN, B. C. Q.; KOIFMAN, R. J. Cryptococcal meningitis in Rio de Janeiro State, Brazil, 1994-2004. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 11, p. 2582-2592, Nov. 2008.

LINDENBERG, A. S. C.; CHANG, M. R.; PANIAGO, A. M. M.; LAZÉRA, M. S.; MONCADA, P. M. F.; BONFIM, G. F.; NOGUEIRA, S. A.; WANKE, B. Clinical and epidemiological features of 123 cases of cryptococcosis in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 50, n. 2, p. 75-78, mar./abr., 2008.

LITVINTSEVA, A. P.; KESTENBAUM, L.; VILGALYS, R.; MITCHELL, T. G. Comparative analysis of environmental and clinical populations of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 2, p. 556-564, Feb. 2005.

LULLMANN, H.; MOHR, K.; HEIN, L.; BIEGER, D. Fármacos usados no tratamento de infecções por fungos. **Farmacologia**. 5. ed. São Paulo: Artmed, 2005. p. 298-299.

MACHADO, A. R. L. Antifúngicos. In: FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. **Farmacologia clínica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 431-449.

MATSUMOTO, M. T.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; BAEZA, L. C.; MELHEM, M. S. C.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Genotyping, serotyping and determination of mating-type of *Cryptococcus neoformans* clinical isolates from São Paulo state, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 49, n. 1, p. 41-47, jan./fev., 2007.

MEYER, W.; MARSZEWSKA, K.; AMIRMOSTOFLAN, M.; IGREJA, R. P.; HARDTKE, C.; METHLING, K.; VIVIANI, M. A.; CHINDAMPORN, A.; SUKROONGREUNG, S.; JOHN, M. A.; ELLIS, D. H.; SORRELL, T. C. Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA – a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. **Electrophoresis**, v. 20, n. 8, p. 1790-1799, Jun. 1999.

MEYER, W.; CASTAÑEDA, A.; JACKSON, S.; HUYNH, M.; CASTAÑEDA, E; IBEROAMERICAN CRYPTOCOCCAL STUDY GROUP. Molecular typing of iberoamerican *Cryptococcus neoformans* isolates. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 9, n. 2, p. 189-195, Feb. 2003.

MICOL, R.; LORTHOLARY, O.; SAR, B.; LAUREILLARD, D.; NGETH, C.; DOUSSET, J. P.; CHANROEUN, H.; FERRADINI, L.; GUERIN, P. J.; DROMER, F.; FONTANET, A. Prevalence, determinants of positivity, and clinical utility of cryptococcal antigenemia in Cambodian HIV-infected patients. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, New York, v. 45, n. 5, p. 555-559, Aug. 2007.

MITCHELL, T. G.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis in the era of AIDS-100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Clinical Microbiology Reviews**, Philadelphia, v. 8, n. 4, p. 515-548, Oct. 1995.

MONDON, P.; PETTER, R.; AMALFITANO, G.; LUZZATI, R.; CONCIA, E.; POLACHECK, I.; KWON-CHUNG, K. J. Heteroresistance to Fluconazole and Voriconazole in *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 43, n. 8, p. 1856-1861, Aug. 1999.

MORETTI, M. L.; RESENDE, M. R.; LAZÉRA, M. S.; COLOMBO, A. L.; SHIKANAI-YASUDA, M. A. Consenso em criptococose – 2008. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 41, n. 5, p. 524-544, set./out. 2008.

MORGAN, J.; MCCARTHY, K. M.; GOULD, S.; FAN, K.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; IQBAL, N.; STAMEY, K.; HAJJEH, R. A.; BRANDT, M. E.; GAUTEND CRYPTOCOCCAL SURVEILLANCE INITIATIVE GROUP. *Cryptococcus gattii* infection: characteristics and epidemiology of cases identified in a south African province with high HIV seroprevalence, 2002-2004. **Clinical Infectious Disease**, Chicago, v. 43, n. 8, p. 1077-1080, Oct. 2006.

NISHIKAWA, M. M.; LAZERA, M. S.; BARBOSA, G. G.; TRILLES, L.; BALASSIANO, B. R.; MACEDO, R. C. L.; BEZERRA, C. C. F.; PÉREZ, M. A.; CARDARELLI, P.; WANKE, B. Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental source in Brazil: analysis of host and regional patterns. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, vol. 41, n. 1, p. 73-77, Jan. 2003.

OLIVEIRA, O. V.; NEGREIROS, D. P.; TREVISOL-BITTENCOURT, P. C. Neurocriptococose em pacientes com AIDS no Hospital Nereu Ramos, Florianópolis-SC. **Jornal Brasileiro de AIDS**, São Paulo, v. 1, n. 4, p. 28-38, 2000.

PAPPALARDO M. C. S. M.; SZESZS, M. W.; MARTINS, M. A.; BACETI, L. B.; BONFIETTI, L. X.; PURISCO, S. U.; BAEZ, A. A.; MELHEM, M. S. C. Susceptibility of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* to amphotericin B using time-kill methodology. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 64, n. 2, p. 146-151, Jun. 2009.

PASA, C. R. Tipagem molecular e suscetibilidade antifúngica de *Cryptococcus* isolados de pacientes em Hospital Universitário com investigação domiciliar. 2011. 125 f. Tese (Mestrado em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul/UFMS, Campo Grande, 2011.

PASQUALOTTO, A. C.; SEVERO, C. B.; OLIVEIRA, F. M.; SEVERO, L. C. Cryptococcemia. An analysis of 28 cases with emphasis on the clinical outcome and its etiologic agent. **Revista Iberoamericana de Micología**, Bibao, v. 21, p. 143-146, Sep. 2004.

PEDROSO, R. S.; FERREIRA, J. C.; CANDIDO, R. C. In vitro susceptibility to antifungal agents of environmental *Cryptococcus* spp. isolated in the city of Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 3, p. 239-243, May 2006.

PERFECT, J. R.; CASADEVALL, A. Cryptococcosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 16, n. 4, p. 837-874, Dec. 2002.

PERFECT, J. R.; DISMUKES, W. E.; DROMER, F.; GOLDMAN, D. L.; GRAYBILL, J. R.; HAMILL, R. J.; HARRISON, T. S.; LARSEN, R. A.; LORTHOLARY, O.; NGUYEN, M. H.; PAPPAS, P. G.; POWDERLY, W. G.; SINGH, N.; SOBEL, J. D.; SORRELL, T. C. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Disease**, Boston, v. 50, n. 3, p. 291-322, Feb. 2010.

PFALLER, M. A.; MESSER, S. A.; BOYKEN, L.; RICE, C.; TENDOLKAR, S.; HOLLIS, R. J.; DOERN, G. V.; DIEKEMA, D. J. Global trends in the antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* (1999 to 2004). **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 5, p. 2163-2167, May 2005.

PFALLER, M. A.; DICKEMA, D. J.; GIBBS, D. L.; NEWELL, V. A.; BIJIE, H.; DZIERZANOWSKA, D.; KLIMKO, N. N.; LETSCHER-BRU, V.; LISALOVA, M.; MUEHLETHALER, K.; RENNISON, C.; ZAIDI, M.; GLOBAL ANTIFUNGAL SURVEILLANCE GROUP. Results from the ARTEMIS DISK global antifungal surveillance study, 1997 to 2007: 10.5-year analysis of susceptibilities of noncandidal yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 47, n. 1, p. 117-123, Jan. 2009.

PINTO JUNIOR, V. L.; GALHARDO, M. C. G.; LAZÉRA, M.; WANKE, B.; REIS, R. S.; PEREZ, M. Criptococose associada à AIDS. A importância do cultivo da urina no seu diagnóstico. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 39, n. 2, p. 230-232, mar./abr. 2006.

PRADO, M.; SILVA, M. B.; LAURENTI, R.; TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS em Brazil: a review from 1996 to 2006. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 3, p. 513-521, May 2009.

REX, J. H.; PFALLER, M. A.; WALSH, T. J.; CHATUVERDI, V.; ESPINEL-INGROFF, A.; GHANNOUM, M. A.; GOSEY, I. L.; ODDS, F. C.; RINALDI, M. G.; SHEEHAN, D. J.; WARNOCK, D. W. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. **Clinical Microbiology Reviews**, Philadelphia, v. 14, n. 4, p. 643-658, Oct. 2001.

RIBEIRO, L. C.; HAHN, R. C.; FAVALESSA, O. C.; TADANO, T.; FONTES, C. J. F. Micoses sistêmicas: fatores associados ao óbito em pacientes com infecção pelo vírus da imunodeficiência humana, Cuiabá, Estado de Mato Grosso, 2005-2008. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 42, n. 6, p. 698-705, nov./dez. 2009.

SANTOS, W. R. A.; MEYER, W.; WANKE, B.; COSTA, S. P. S. E.; TRILLES, L.; NASCIMENTO, J. L. M.; MEDEIROS, R.; MORALES, B. P.; BEZERRA, C. C. F.; MACÊDO, R. C. L.; FERREIRA, S. O.; BARBOSA, G. G.; PEREZ, M. A.; NISHIKAWA, M. M.; LAZÉRA, M. S. Primary endemic *Cryptococcosis gattii* by molecular type VGII in the state of Pará, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 103, n. 8, p. 813-818, Dec. 2008.

SERENA, C.; FERNANDES-TORRES, B.; PASTOR, F. J.; TRILLES, L.; LAZERA, M. S.; NOLARD, N.; GUARRO, J. In vitro interactions of micafungin with other antifungal drugs against clinical isolates of four species of *Cryptococcus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 49, n. 7, p. 2994-2996, July 2005.

SILVA, P. R.; RABELO, R. A. S.; TERRA, A. P. S.; TEIXEIRA, D. N. S. Suscetibilidade a antifúngicos de variedades de *Cryptococcus neoformans* isoladas de pacientes em hospital universitário. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 41, n. 2, p. 158-162, mar./abr. 2008.

SOARES, M. C. B.; PAULA, C. R.; DIAS, A. L. T.; CASEIRO, M. M.; COSTA, S. O. P. Environmental strains of *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* in the city of Santos, SP, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 47, n. 1, p. 31-36, Jan./Feb. 2005.

SORRELL, T. C.; ELLIS, D. H. Ecology of *Cryptococcus neoformans*. **Revista Iberoamericana de Micología**, Bilbao, v. 14, p. 42-43, 1997.

SORRELL, T. C. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. **Medical Mycology**, London, v. 39, n. 2, p. 155-168, Apr. 2001.

SOUZA, L. K. H.; FERNANDES, O. F. L.; KOBAYASHI, C. C. B. A.; PASSOS, X. S.; COSTA, C. R.; LEMOS, J. A.; SOUZA-JUNIOR, A. H.; SILVA, M. R. R. Antifungal susceptibilities of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* in Goiânia city, Goiás, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 46, n. 5, p. 253-256, Sept./Oct. 2005.

SPRINGER, D. J.; CHATUVERDI, V. Projecting global occurrence of *Cryptococcus gattii*. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 16, n. 1, p. 14-20, Jan. 2010.

THOMPSON III, G. R.; WIEDERHOLD, N. P.; FOTHERGILL, A. W.; VALLOR, A. C.; WICKES, B. L.; PATTERSON, T. F. Antifungal susceptibilities among different serotypes of *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 53, n. 1, p. 309-311, Jan. 2009.

TREJO, W. H.; BENNETT, R. E. *Streptomyces nodosus* sp. n., the amphotericin-producing organism. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 85, n. 2, p. 436-439, Feb. 1963.

TRILLES, L.; FERMANDEZ-TORRES, B.; LAZERA, M. S.; WABKE, B.; GUARRO, J. In vitro antifungal susceptibility of *Cryptococcus gattii*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 10, p. 4815-4817, Oct. 2004.

TRILLES, L.; LAZÉRA, M. S.; WANKE, B.; OLIVEIRA, R. V.; BARBOSA, G. G.; NISHIKAWA, M. M.; MORALES, B. P.; MEYER, W. Regional pattern of molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 103, n. 5, p. 415-462, Aug. 2008.

VERON, V.; SIMON, S.; BLANCHET, D.; AZNAR, C. Real-time polymerase chain reaction detection of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in human samples. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 65, n. 1, p. 69-72, Sep. 2009.

VIVIANI, M. A.; MASSIMO, C.; ESPOSTO, M. C.; LEMMER, K.; TINTELNOT, K.; VALIENTE, M. F. C.; SWINNE, D.; VELEGRAKI, A.; VELHO, R.; ECMM CRYPTOCOCCOSIS WORKING GROUP. Molecular analysis of 311 *Cryptococcus neoformans* isolates from a 30-month ECMM survey of cryptococcosis in Europe. **FEMS Yeast Research**, Flórida, v. 6, n. 4, p. 614-619, Jun. 2006.

WANKE, B.; LAZÉRA, M. S.; NUCCI, M. Fungal infections in the immunocompromised host. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95, n. 1, p. 153-158, Jan./Feb. 2000.

WINN, W. C.; WESTENFELD, F.W. Micoses. In: HENRY, J. B. (Org.). **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais**. 20. ed. Barueri: Manole, 2008. cap. 54, p. 1331-1371.



Culturas realizadas para identificação do agente etiológico:

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

Agentes etiológicos isolados: \_\_\_\_\_

Micológico: Amostra: \_\_\_\_\_ ( ) Direto: ( ) raros ( ) alguns ( ) numerosos,

( ) Nanquim: ( ) raros ( ) alguns ( ) numerosos, Cultura: \_\_\_\_\_ CGB: \_\_\_\_\_

Antifungigrama: Anfo B \_\_\_\_\_, Fluconazol \_\_\_\_\_, Itraconazol \_\_\_\_\_, Voriconazol \_\_\_\_\_

Micológico: Amostra: \_\_\_\_\_ ( ) Direto: ( ) raros ( ) alguns ( ) numerosos,

( ) Nanquim: ( ) raros ( ) alguns ( ) numerosos, Cultura: \_\_\_\_\_ / CGB: \_\_\_\_\_

Antifungigrama: Anfo B \_\_\_\_\_, Fluconazol \_\_\_\_\_, Itraconazol \_\_\_\_\_, Voriconazol \_\_\_\_\_

Parâmetros líquóricos \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_:

Citologia global: leucócitos: \_\_\_\_ e hemácias: \_\_\_\_; Glicose: \_\_\_\_, Proteínas: \_\_\_\_,

Citologia diferencial: PMN \_\_\_\_% e MN \_\_\_\_%; LDH: \_\_\_\_, Cloretos: \_\_\_\_

Evolução: dias de internação: \_\_\_\_ ( ) alta ( ) óbito, causa principal: \_\_\_\_\_

**APÊNDICE B – Suscetibilidade a antifúngicos e tipo molecular *Cryptococcus* spp., isolados de 116 pacientes, Grande Grande-MS, maio de 1997 a dezembro de 2008.**

Amostra	Tipo Molecular	CIM (µg/mL) de:			
		Anfotericina B	Fluconazol	Itraconazol	Voriconazol
744L-97	VNI	0,5	4,0	0,125	0,06
113L-97	VGII	0,5	2,0	0,125	0,03
155L-97	VNI	0,5	2,0	0,125	0,06
121L-97	VNI	0,5	1,0	0,06	0,015
278L-97	VNI	0,5	2,0	0,125	0,03
393L-98	VNI	0,5	2,0	0,125	0,03
502L-98	VNI	0,5	1,0	0,125	0,03
527LB-98	VNI	0,5	1,0	0,03	0,03
319H-98	VNI	0,25	2,0	0,06	0,03
515L-98	VNI	0,25	2,0	0,125	0,015
650L-98	VNI	0,5	1,0	0,06	0,03
622L-98	VNI	0,125	1,0	0,06	0,03
740L-98	VNI	0,5	2,0	0,06	0,03
937L-98	VNI	0,5	2,0	0,06	0,03
221H-98	VNI	0,25	1,0	0,06	0,03
236L-98	VNI	0,25	1,0	0,06	0,03
910L-98	VGII	0,5	2,0	0,125	0,03
350L-98	VNI	0,5	2,0	0,125	0,03
964L-99	VNI	0,5	1,0	0,06	0,03
285L-99	VNI	0,25	1,0	0,06	0,03
174L-99	VNI	0,5	1,0	0,06	0,03
778L-99	VNI	0,25	1,0	0,06	0,03
1200L-99	VNI	1,0	2,0	0,125	0,03
482LB-99	VNI	0,5	2,0	0,06	0,03
668L-99	VNI	0,5	2,0	0,06	0,03
1022L-00	VNI	0,5	2,0	0,06	0,03
909L-99	VNI	0,5	1,0	0,125	0,03
597L-99	VNI	0,5	4,0	0,125	0,06
1075L-99	VNII	0,5	0,25	0,06	0,015
370L-00	VGII	0,5	2,0	0,125	0,06
53L-00	VNI	0,25	2,0	0,06	0,03
510M-00	VNI	0,5	2,0	0,03	0,03
288U-01	VNI	0,5	2,0	0,125	0,03
465L-01	VNI	0,5	2,0	0,06	0,03
525L-01	VNI	0,5	4,0	0,125	0,03
45L-01	VNII	0,5	0,25	0,015	0,015
449H-01	VNII	0,5	0,5	0,015	0,015
589L-01	VGII	0,5	1,0	0,125	0,03
415L-01	VNI	0,25	1,0	0,06	0,015
410-L01	VNI	0,5	2,0	0,125	0,03
704H-01	VNI	0,5	0,5	0,06	0,03
398H-02	VNI	0,5	2,0	0,06	0,03
371H-02	VNI	0,5	1,0	0,06	0,03
577L-02	VNI	0,25	1,0	0,06	0,03
601L-02	VNI	0,5	2,0	0,03	0,03
619L-02	VNI	0,5	0,5	0,06	0,03
593L-03	VNI	0,5	2,0	0,06	0,06
655L-02	VNI	0,5	4,0	0,125	0,03
809L-02	VNI	0,5	2,0	0,06	0,03
756L-02	VNI	0,25	1,0	0,06	0,03

Amostra	Tipo Molecular	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) de:			
		Anfotericina B	Fluconazol	Itraconazol	Voriconazol
917L-02	VNI	0,5	2,0	0,125	0,03
932H-02	VNI	0,5	1,0	0,06	0,015
58E-02	VNI	0,5	2,0	0,06	0,06
67L-02	VNI	0,5	1,0	0,06	0,03
305L-02	VNI	0,5	2,0	0,125	0,03
317L-02	VNI	0,5	2,0	0,125	0,03
437L-03	VNI	0,25	1,0	0,06	0,015
600L-03	VNI	0,25	1,0	0,06	0,015
704L-03	VNI	0,25	1,0	0,03	0,015
705-L-03	VNI	0,25	1,0	0,06	0,03
716H-03	VNI	0,5	2,0	0,03	0,03
851H-03	VNI	0,5	2,0	0,06	0,06
141L-03	VNI	0,5	2,0	0,06	0,015
75L-03	VNII	0,5	1,0	0,125	0,015
167LB-03	VNI	0,25	1,0	0,06	0,03
178H-03	VNI	0,125	1,0	0,06	0,03
628L-03	VNI	0,5	1,0	0,06	0,03
751H-03	VNI	0,25	2,0	0,06	0,015
771H-03	VNI	0,25	1,0	0,06	0,03
807L-03	VNI	0,25	1,0	0,06	0,03
838L-03	VNI	0,5	1,0	0,06	0,125
913L-03	VNI	0,5	2,0	0,06	0,03
926L-03	VNI	0,25	2,0	0,06	0,03
660U-03	VGII	0,5	1,0	0,125	0,03
58L-04	VNII	0,25	0,5	0,06	0,03
261L-04	VNI	0,25	2,0	0,03	0,015
224L-04	VNI	0,25	1,0	0,06	0,03
450L-04	VNI	0,5	4,0	0,125	0,06
483L-04	VNI	1,0	16,0	0,125	0,25
283L-04	VNI	0,25	2,0	0,06	0,15
639L-04	VNI	0,5	0,5	0,06	0,06
53AMO-04	VNI	0,25	2,0	0,06	0,06
813L-04	VNI	1,0	2,0	0,125	0,03
452L-04	VNI	0,25	1,0	0,06	0,03
643L-04	VNI	0,5	2,0	0,06	0,03
487L-05	VNI	0,5	2,0	0,06	0,03
726BP-05	VGII	0,5	8,0	0,5	0,125
800L-05	VNI	0,5	1,0	0,06	0,03
180S-05	VGII	0,25	0,25	0,03	0,015
707AMO-06	VNI	0,5	2,0	0,125	0,06
936H-06	VNI	0,5	1,0	0,03	0,015
134L-06	VGII	0,5	4,0	0,25	0,125
518LB-06	VNI	0,5	2,0	0,125	0,03
857L-06	VGII	0,5	1,0	0,125	0,03
905H-06	VNI	0,25	1,0	0,06	0,015
451L-06	VNI	0,5	2,0	0,125	0,03
735H-07	VNI	0,5	2,0	0,06	0,03
761L-07	VNI	0,5	1,0	0,125	0,03
60L-07	VNI	0,125	1,0	0,03	0,03
182LB-07	VNI	1,0	2,0	0,03	0,03
515L-07	VNI	1,0	2,0	0,125	0,03
710H-07	VNI	0,5	2,0	0,125	0,03
948H-07	VNI	1,0	1,0	0,125	0,03
947H-07	VNI	0,25	1,0	0,06	0,015
492U-07	VNI	0,5	2,0	0,06	0,03
136L-08	VNI	0,5	2,0	0,125	0,03

Amostra	Tipo Molecular	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) de:			
		Anfotericina B	Fluconazol	Itraconazol	Voriconazol
397L-08	VNI	1,0	2,0	0,06	0,03
528L-08	VNI	0,25	2,0	0,125	0,03
754L-08	VNI	0,25	1,0	0,125	0,03
861U-08	VNI	0,5	1,0	0,06	0,03
911L-08	VNI	0,25	2,0	0,125	0,03
990H-08	VNI	0,5	2,0	0,06	0,03
226L-08	VNI	0,5	2,0	0,06	0,03
349L-08	VNI	0,5	1,0	0,03	0,03
680UR-08	VNI	1,0	2,0	0,06	0,03
662L-08	VNI	0,25	1,0	0,06	0,06

**ANEXO A**Tampão lise (100 mL)

Doecil sulfato de sódio (USB, EUA).....	0,50 g
Cloreto de Sódio (Sigma, EUA).....	1,40 g
EDTA (Bioagency Brasil).....	0,73 g
Tris-HCl 1M (Sigma, EUA).....	20 mL
Água bi-destilada estéril q.s.p.....	100 mL

Homogeneizar até completa dissolução e filtrar com filtro milipore (poro de 0,22 µm).  
Armazenado a temperatura ambiente no máximo por seis meses.

## ANEXO B – CARTA DE APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP/UFMS)



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



### *Carta de Aprovação*

*A minha assinatura neste documento, atesta que o protocolo nº 1617 da Pesquisadora Mariê dos Santos Gomes intitulado "Criptococose em hospital de referência em Mato Grosso do Sul: caracterização epidemiológica, fenotípica e genética", foi revisado por este comitê e aprovado em reunião ordinária no dia 1 de março de 2010, encontrando-se de acordo com as resoluções normativas do Ministério da Saúde.*

*Prof. Celso Pimentel Martins*

*Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS*

*Campo Grande, 26 de março de 2010.*

Comitê de Ética da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul  
 Hospital de Referência em Doenças Crônicas  
 Av. Costa Rica, s/n, Campo Grande, MS  
 Fone: (51) 345-7187