

ROSIANNE ASSIS DE SOUSA TSUJISAKI

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICO-LABORATORIAL DE CRIPTOCOCCEMIA
COM TIPAGEM MOLECULAR E DETERMINAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE
ANTIFÚNGICA DE SEUS AGENTES ETIOLÓGICOS**

**CAMPO GRANDE
2013**

ROSIANNE ASSIS DE SOUSA TSUJISAKI

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICO-LABORATORIAL DE CRIPTOCOCCEMIA
COM TIPAGEM MOLECULAR E DETERMINAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE
ANTIFÚNGICA DE SEUS AGENTES ETIOLÓGICOS**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de mestre no Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias da FAMED/UFMS, sob orientação da Profa. Dra. Marilene Rodrigues Chang.

**CAMPO GRANDE
2013**



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

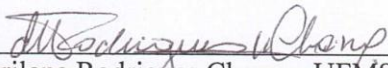
Programa de Pós Graduação em
Doenças Infecciosas e Parasitárias

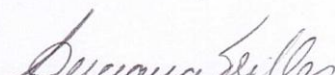


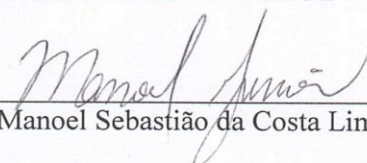
TERMO DE APROVAÇÃO

A dissertação intitulada “**Caracterização clínico-laboratorial de criptococcemia com tipagem molecular e determinação da suscetibilidade antifúngica de seus agentes etiológicos**”, apresentada à banca examinadora por ROSIANNE ASSIS DE SOUSA TSUJISAKI, 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


Luciana Trilles – FIOCRUZ


Manoel Sebastião da Costa Lima Junior – IFMS

Campo Grande, 27 de março de 2013.

DEDICATÓRIA

A Deus, por me conceder saúde a cada dia.

Ao meu esposo, Flávio

Aos meus pais, Rosalia e Manoel

Aos meus irmãos, Amannda e Júnior

Aos meus sogros, Célia e Roberto

Pelo incentivo e apoio concedido no decorrer da
realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora Dra. Marilene Rodrigues Chang, pela orientação, dedicação e contribuição com seus conhecimentos na realização deste trabalho.

À equipe do laboratório de Micologia do Hospital Universitário/UFMS, especialmente as bioquímicas Maína de Oliveira Nunes e Gláucia Moreira Espíndola Lima, por terem cedido os isolados de *Cryptococcus* e pelo esclarecimento de dúvidas.

À Chrystiane Rodrigues Pasa, pelo esclarecimento de dúvidas sobre as técnicas de antifungograma e tipagem molecular.

À amiga e companheira de mestrado Débora de Souza Olartechea de Alencar, pelo acompanhamento e auxílio no preparo de materiais e meios de cultura, e ainda, na realização dos experimentos.

À técnica do laboratório de Pesquisas Microbiológicas e amiga, Fernanda Luíza Espinosa Spositto, pela colaboração no decorrer do trabalho.

Às professoras de Microbiologia, Dra. Sônia Maria Fernandes Fitts e Dra. Ana Paula da Costa Marques, pelo incentivo e apoio, principalmente na reta final deste trabalho.

Às amigas Ana Paula Machado e Joslaine de Oliveira Nunes, pela amizade, incentivo e conselhos, especialmente nos momentos mais difíceis.

Ao professor Dr. Manoel Sebastião da Costa Lima Júnior, pelo esclarecimento de dúvidas e auxílio concedido na técnica de biologia molecular.

À professora Dra. Maria de Fátima Cepa Matos, pela disponibilização do laboratório de Biologia Molecular e Culturas Celulares/UFMS, onde foi realizada a tipagem molecular.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (PROPP/UFMS), pelo apoio financeiro.

Ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina “Dr. Hélio Mandetta” da UFMS, pela oportunidade.

Ao meu esposo e à minha família, pela compreensão nas vezes em que estive ausente pela dedicação para o cumprimento deste trabalho.

À todos que, de alguma forma, colaboraram para o sucesso deste trabalho.

RESUMO

A criptococose é uma doença fúngica sistêmica causada por leveduras do complexo *Cryptococcus neoformans* e está associada à elevada letalidade, principalmente em indivíduos imunocomprometidos. Criptococemia é a infecção de corrente sanguínea causada pelo *Cryptococcus* sp., através da qual o fungo pode se disseminar para outros sítios. O objetivo deste estudo foi descrever o quadro clínico-laboratorial de pacientes com criptococemia, identificar o tipo molecular e determinar a suscetibilidade antifúngica *in vitro* de *Cryptococcus* isolados de hemoculturas no período de julho de 1998 a julho de 2012 de pacientes atendidos em hospital público terciário de Mato Grosso do Sul, Brasil. A tipagem molecular foi realizada pelo método PCR-RFLP do gene *URA5*. A concentração inibitória mínima dos antifúngicos fluconazol, itraconazol, voriconazol e anfotericina B foi determinada pelo método de microdiluição em caldo padronizado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute*. No período de estudo, 48 pacientes tiveram diagnóstico de criptococemia. A idade dos pacientes variou de 10 a 90 anos, com mediana de 40 anos. A maioria (72,9%) era do sexo masculino e 62,5% era procedente de Campo Grande-MS. Trinta e nove (81,3%) pacientes tinham HIV/Aids. Além da corrente sanguínea, *Cryptococcus* foi isolado do líquido céfalo-espinhal em 50,0% dos pacientes. As manifestações clínicas mais frequentes foram febre (83,3%), emagrecimento (58,3%), vômito (58,3%), tosse (58,3%) e cefaléia (56,3%). Entre todos, a letalidade geral observada foi de 72,9%, sendo 66,7% em HIV/Aids e 100,0% em pacientes HIV negativos. Em 97,9% dos casos foi isolado *Cryptococcus neoformans*. A análise molecular revelou os genótipos VNI (93,7%), VNII (4,2%) de *C. neoformans* e VGII (2,1%) de *C. gattii*. O predomínio de *C. neoformans* VNI é similar ao descrito na literatura mundial. Quanto à suscetibilidade antifúngica, todos os *Cryptococcus* spp. foram sensíveis no teste *in vitro* frente aos antifúngicos testados. A alta letalidade observada indica que as infecções de corrente sanguínea por *Cryptococcus* podem ser fatais, tanto em HIV positivos quanto em HIV negativos.

Palavras-chave: criptococose, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*, fungemia, tipagem molecular.

ABSTRACT

Cryptococcosis, a systemic fungal disease caused by yeasts of the *Cryptococcus neoformans* complex, is associated with high mortality, particularly in immunocompromised individuals. Cryptococchemia is the infection caused by *Cryptococcus* species in the bloodstream, via which these fungi can spread to other sites. The objectives of this study were to describe the clinical and laboratory features of patients with cryptococchemia, identify molecular types of this infective agent, and determine the *in vitro* antifungal susceptibility of *Cryptococcus* specimens isolated from blood cultures of patients treated in a public tertiary-care hospital in Mato Grosso do Sul state, Brazil, from July 1998 to July 2012. Molecular typing was performed by *URA5*-RFLP analysis. Minimum inhibitory concentration of antifungal agents (fluconazole, itraconazole, voriconazole, and amphotericin B) was determined by broth microdilution, as standardized by the Clinical and Laboratory Standards Institute. In the study period, 48 patients were diagnosed with cryptococchemia. Patient age ranged from 10 to 90 years, with a median age of 40. Most patients were male (72.9%) and lived in Campo Grande (62.5%), the state capital. Thirty-nine (81.3%) had HIV/Aids. In addition to infecting the bloodstream, *Cryptococcus* was found in cerebrospinal fluid in 50.0% of the patients. The most common clinical manifestations were fever (83.3%), weight loss (58.3%), vomiting (58.3%), cough (58.3%), and headache (56.3%). Overall mortality was 72.9%, with 66.7% for HIV/Aids cases and 100.0% among HIV-negative patients. *Cryptococcus neoformans* was the species isolated in 97.9% of the cases. Molecular analysis revealed genotypes VNI (93.7%), *C. neoformans* VNII (4.2%), and *C. gattii* VGII (2.1%). The predominance of *C. neoformans* VNI mirrored findings described in the international research literature. With regard to antifungal susceptibility, all *Cryptococcus* species were sensitive *in vitro* to the antifungal agents tested. The high mortality observed indicates that bloodstream infection by *Cryptococcus* can be fatal both in HIV-positive and HIV-negative patients.

Keywords: cryptococcosis, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*, fungemia, molecular typing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Formas de apresentação clínica da criptococose.....	29
Figura 2	Colônias marrons características do complexo <i>C. neoformans</i> em ágar níger.....	39
Figura 3	Meio de CGB: A. positivo (azul, <i>C. gattii</i>); B. negativo (verde, <i>C. neoformans</i>).....	39
Figura 4	Desenho esquemático da extração de DNA de <i>Cryptococcus</i> spp.....	41
Figura 5	Reagentes que compõem o mix da reação de PCR com seus respectivos volumes e concentrações.....	42
Figura 6	Reagentes da reação de RFLP com seus respectivos volumes.....	43
Figura 7	Desenho esquemático das diluições dos fármacos anfotericina B, itraconazol e voriconazol.....	46
Figura 8	Desenho esquemático das diluições do fármaco fluconazol.....	48
Figura 9	Desenho esquemático da distribuição dos fármacos diluídos nas microplacas.....	49
Figura 10	Desenho esquemático das distribuições do inóculo, dos controles de crescimento e de esterilidade e das cepas ATCC do controle de qualidade, nas microplacas.....	51
Figura 11	Valores de concentração inibitória mínima para as cepas ATCC utilizadas como controle de qualidade.....	53
Figura 12	Setores de internação dos pacientes com criptococcemia, HU/UFMS - julho 1998-2012 (n = 48).....	60
Figura 13	Perfil representativo de amplificação do gene <i>URA5</i> de <i>Cryptococcus</i> isolados de hemocultivos.....	61
Figura 14	Perfil representativo de RFLP- <i>URA5</i> de <i>Cryptococcus</i> após digestão com enzimas de restrição <i>HhaI</i> e <i>Sau96I</i>	62
Figura 15	Características de 48 pacientes com criptococcemia e tipagem molecular dos <i>Cryptococcus</i> spp. isolados de hemocultivos, HU/UFMS - julho 1998-2012.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição dos pacientes com criptococemia segundo dados demográficos, HU/UFMS - julho 1998-2012 (n = 48).....	55
Tabela 2	Condições clínicas dos pacientes HIV negativos com criptococemia, HU/UFMS - julho 1998-2012 (n = 4).....	57
Tabela 3	Aspectos clínicos de 48 pacientes com criptococemia, HU/UFMS - julho 1998-2012.....	58
Tabela 4	Citologia global e análise bioquímica do líquido céfalo-espinhal de pacientes com criptococemia, HU/UFMS - julho 1998-2012 (n = 23).....	59
Tabela 5	Número e porcentagem dos pacientes com criptococemia segundo a infecção pelo HIV, tratamento antifúngico e evolução clínica, HU/UFMS - julho 1998-2012 (n = 48).....	61
Tabela 6	Variação da concentração inibitória mínima (CIM) dos antifúngicos testados, HU/UFMS - julho 1998-2012 (n = 48).....	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFLP – *Amplified Fragment Length Polymorphism* – Polimorfismo de tamanho de fragmentos amplificados

Aids – *Acquired Immunodeficiency Syndrome* – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

AMB – Anfotericina B

ASD – Ágar Saboraud Dextrose

ATCC – *American Type Culture Collection*

BHI – *Brain Heart Infusion*

CC – Controle de Crescimento

CD4 – *Cluster of Differentiation 4*

CDC – *Centers for Disease Control and Prevention*

CE – Controle de Esterilidade

CGB – Canavanina, Glicina, Azul de Bromotimol

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CM – Clínica Médica

CN – Controle Negativo

CP – Controle Positivo

CTI – Centro de Terapia Intensiva

DIP – Doenças Infecciosas e Parasitárias

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucléico

dNTP – Desoxirribonucleotídeo trifosfato

EDTA – *Ethylenediaminetetraaceticacid*

ENF Ped – Enfermaria Pediátrica

EUA – Estados Unidos da América

EUCAST – *European Committee Antimicrobial on Susceptibility Testing*

FIOCRUZ – Fundação Instituto Oswaldo Cruz

FLC – Fluconazol

HAART – *Highly active antiretroviral therapy* – Terapia antiretroviral altamente ativa

HIV – *Human Immunodeficiency Virus* – Vírus da Imunodeficiência Humana

HU/UFMS – Hospital Universitário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

ICS – Infecção de Corrente Sanguínea

ITC – Itraconazol

LCE – Líquido Céfalo-Espinal

MOPS – Ácido 3-morfolinopropano-1-sulfônico

NaCl – Cloreto de Sódio

NCCLS – *National Committee for Clinical Laboratory Standards*

PAM – Pronto Atendimento Médico

PCR – *Polimerase Chain Reaction* – Reação em Cadeia da Polimerase

PFGE – *Pulsed Field Gel Electrophoresis* – Eletroforese em Gel de Campo Pulsado

QT – Quimioterapia

RAPD – *Random Amplification of Polymorphic DNA* – DNA polimórfico amplificado ao acaso

RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism* – Polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição

RPMI – *Roswell Park Memorial Institute Medium*

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

SNC – Sistema Nervoso Central

sp – Espécie

spp – Espécies

TBE – Tris/Borato/EDTA

UV – Ultravioleta

VCR – Voriconazol

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	23
2.1 Histórico.....	23
2.2 Agentes etiológicos da criptococose.....	24
2.3 Ecoepidemiologia da criptococose.....	25
2.4 Patogênese da criptococose.....	28
2.5 Apresentação clínica.....	29
2.6 Diagnóstico laboratorial.....	31
2.7 Antifúngicos e Tratamento.....	32
3 OBJETIVOS.....	35
3.1 Objetivo geral.....	35
3.2 Objetivos específicos.....	35
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.1 Tipo de pesquisa.....	37
4.2 Local e período da pesquisa.....	37
4.3 Sujeitos da pesquisa.....	37
4.4 Procedimentos para coleta de dados.....	37
<u>4.4.1 Dados clínicos e laboratoriais.....</u>	<u>38</u>
<u>4.4.2 Critérios e considerações para interpretação dos dados.....</u>	<u>38</u>
4.5 Caracterização laboratorial.....	39
<u>4.5.1 Amostras.....</u>	<u>39</u>
<u>4.5.2 Genotipagem.....</u>	<u>40</u>
4.5.2.1 Padrões moleculares.....	40
4.5.2.2 Extração do DNA.....	40
4.5.2.3 <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (RFLP) - <i>URA5</i>	42
4.5.2.3.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	42
4.5.2.3.2 Eletroforese do produto da PCR.....	42
4.5.2.3.3 Reação de polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP).....	43
4.5.2.3.4 Eletroforese do RFLP.....	43
<u>4.5.3 Suscetibilidade antifúngica <i>in vitro</i>.....</u>	<u>44</u>
4.5.3.1 Fármacos antifúngicos.....	44

4.5.3.2 Preparo das soluções estoque (soluções padrão ou soluções-mãe).....	44
4.5.3.3 Diluições dos agentes antifúngicos e preparo das microplacas.....	45
4.5.3.4 Preparo do inóculo e distribuição nas microplacas.....	50
4.5.3.5 Controle de qualidade.....	52
4.5.3.6 Incubação das microplacas, leitura e interpretação dos testes.....	52
4.6 Organização e análise dos dados.....	53
4.7 Aspectos éticos.....	53
5 RESULTADOS.....	55
6 DISCUSSÃO.....	65
7 CONCLUSÕES.....	73
REFERÊNCIAS.....	75
APÊNDICE A - FORMULÁRIO PARA COLETA DE DADOS EM PRONTUÁRIOS.....	85
APÊNDICE B - PREPARO DAS SOLUÇÕES PARA GENOTIPAGEM.....	87
APÊNDICE C - TIPO MOLECULAR E CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DE <i>CRYPTOCOCCUS</i> SPP. ISOLADOS DE HEMOCULTIVOS, HU/UFMS - julho 1998-2012 (n = 48).....	89
ANEXO A - CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UFMS.....	91

1 INTRODUÇÃO

A criptococose é uma doença fúngica sistêmica causada por leveduras do complexo *Cryptococcus neoformans* e está associada à elevada letalidade, principalmente em indivíduos imunocomprometidos.

A via mais comum de infecção é a inalatória, através da qual o fungo se instala nos pulmões causando infecção primária. A seguir, pode se disseminar via hematogênica para outros sítios, com especial tropismo pelo sistema nervoso central.

A criptococemia é a infecção de corrente sanguínea causada por *Cryptococcus* sp. O encontro de *Cryptococcus* no sangue do paciente normalmente está associado a mal prognóstico, com elevado risco de morte, principalmente em pacientes com Aids. Sendo assim, o diagnóstico precoce e a introdução da terapia antifúngica adequada são cruciais na evolução clínica do paciente.

A epidemiologia da criptococose tem sido amplamente descrita, entretanto, estudos focados em criptococemia têm sido pouco realizados. A importância do assunto aliada à precariedade de dados na literatura nacional e regional motivou a realização deste estudo para melhor compreensão sobre a ocorrência de criptococose sistêmica em pacientes atendidos em hospital público terciário de Mato Grosso do Sul.

O Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul é um centro de referência no diagnóstico e tratamento de doenças infecciosas e parasitárias. Atende pacientes encaminhados de todas as regiões do estado, assumindo um papel importante na saúde da população regional.

A genotipagem das leveduras permite ampliar o conhecimento de aspectos epidemiológicos quanto à caracterização dos agentes etiológicos e sua região geográfica, bem como de aspectos patogênicos dos agentes da criptococose.

O conhecimento do perfil de suscetibilidade aos antifúngicos se faz importante pela previsão de falência terapêutica e pelo monitoramento da emergência de micro-organismos resistentes aos antifúngicos utilizados na instituição hospitalar.

Os dados obtidos neste estudo podem ser úteis quanto à introdução do esquema terapêutico antifúngico mais apropriado, possibilitando um melhor prognóstico aos pacientes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Criptococose, também conhecida como torulose, blastomicose européia ou blastomicose de Busse-Buschke, é uma doença fúngica sistêmica que ocorre em indivíduos imunocompetentes, mas com maior frequência em imunocomprometidos, principalmente os portadores de doenças de base (CASADEVALL; PERFECT, 1998; LACAZ *et al.*, 2002). É causada por leveduras do complexo *Cryptococcus neoformans*, constituído das espécies *C. neoformans* e *C. gattii* (KWON-CHUNG; VARMA, 2006).

2.1 Histórico

A criptococose foi descrita pela primeira vez na Alemanha por Busse, em 1894. Esse pesquisador observou “corpúsculos” arredondados em uma lesão tibial semelhante a um sarcoma em uma mulher de 31 anos de idade. O micro-organismo isolado foi denominado de *Saccharomyces hominis*. No mesmo ano, na Itália, Sanfelice isolou uma levedura encapsulada do suco de pêssago, dando-lhe o nome de *Saccharomyces neoformans* (*apud* CASADEVALL; PERFECT, 1998).

Em 1896, na França, Curtis isolou uma levedura de um tumor de quadril, denominada *Saccharomyces tumefaciens*. Em 1901, Vuillemin reclassificou no gênero *Cryptococcus* as leveduras de Busse e Sanfelice como *C. hominis* e *C. neoformans* devido à incapacidade de fermentação de carboidratos e a não formação de ascósporos, como ocorre no gênero *Saccharomyces* (*apud* KWON-CHUNG; BENNETT, 1992).

Em 1905, Von Hansemann descreveu a criptococose como “tuberculose”, ao observar a levedura como um “cisto gelatinoso” na meninge humana. Essa foi a primeira descrição de meningite criptocócica (*apud* KWON-CHUNG; BENNETT, 1992). Em 1916, nos Estados Unidos, Stoddard e Cutler isolaram uma levedura a partir da observação de lesões cutâneas e células do sistema nervoso central, atribuindo-lhe o nome de *Torula histolytica* (LACAZ *et al.*, 2002).

Em 1935, Benham concluiu que as leveduras dos gêneros *Saccharomyces*, *Cryptococcus* e *Torula* pertenciam a uma mesma espécie: *Cryptococcus hominis*, com duas variedades que se distinguem de acordo com a virulência e tipos antigênicos (*apud* KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; LACAZ *et al.*, 2002).

Em 1950, o termo *C. neoformans* passou a ser utilizado na literatura médica (*apud* CASADEVALL; PERFECT, 1998).

2.2 Agentes etiológicos da criptococose

As leveduras do gênero *Cryptococcus* são globosas ou ovaladas, com diâmetro que varia de 3 a 8µm e podem apresentar-se com brotamento único ou múltiplo (MORETTI *et al.*, 2008). Reproduzem-se por brotamento e apresentam cápsula formada por polissacarídeos, polímeros da xilose, manose e ácido glucurônico (LEVINSON; JAWETZ, 2005; LACAZ *et al.*, 2002). O principal constituinte da cápsula é a glucuronoxilomanana, que determina os cinco sorotipos existentes (MORETTI *et al.*, 2008).

O ciclo de vida do *Cryptococcus* foi estabelecido por Kwon-Chung em 1975 através da identificação da forma sexuada ou teleomórfica (estado perfeito), descrita como *Filobasidiella neoformans* (COLOMBO, 2003; KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; LACAZ *et al.*, 2002).

De acordo com especialistas, já foram descritas em torno de 39 espécies de *Cryptococcus*, sendo consideradas patogênicas apenas as espécies *C. neoformans* e *C. gattii*. *Cryptococcus laurentii*, *C. albidus*, *C. humicola* e *C. curvatus* são consideradas espécies emergentes, responsáveis por causar desde lesões cutâneas a fungemia, especialmente em indivíduos imunocomprometidos (MORETTI *et al.*, 2008).

A espécie *Cryptococcus neoformans* era subdividida em duas variedades, baseado em seus antígenos capsulares: *C. neoformans* var. *neoformans* e *C. neoformans* var. *gattii* (KWON-CHUNG; POLACHEK; BENNETT, 1982). Uma outra variedade, *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A) foi descrita ao se observar diferenças genéticas entre isolados do sorotipo A (FRANZOT; SALKIN; CASADEVALL, 1999).

Mais recentemente, dados da literatura relatam que as espécies pertencem ao complexo *Cryptococcus neoformans* incluindo: *C. neoformans*, com os sorotipos A, D e AD e *C. gattii*, com os sorotipos B e C (KWON-CHUNG; VARMA 2006). Essas espécies diferem em aspectos bioquímicos, ecológicos, antigênicos e genéticos (BENNETT; KWON-CHUNG; HOWARD, 1977; BENNETT; KWON-CHUNG; THEODORE, 1978; KWON-CHUNG; BENNETT, 1992).

Um novo híbrido (sorotipo AB) foi descrito por Bovers *et al.*, (2008) proveniente de *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A) x *C. gattii* (sorotipo B), isolado de um paciente com Aids da cidade de Montreal, Canadá.

Estudos prévios com utilização de técnicas moleculares mostram oito genótipos de *Cryptococcus*: VNI (sorotipo A), VNII (sorotipo A), VNIII (sorotipo AD) e VNIV (sorotipo D) de *C. neoformans* e VGI, VGII, VGIII e VGIV (sorotipos B e C) de *C. gattii* (MEYER *et al.*, 1999, 2003).

São conhecidos dois tipos sexuais de *Cryptococcus*: *mating-type* α e a . A conjugação dessas hifas leva à obtenção do estado sexuado (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; LACAZ *et al.*, 2002). Estudo de Liaw, Wu e Hsueh (2010) com isolados clínicos e ambientais revelou por meio da técnica de PCR que todos eram positivos para MAT α , sendo este tipo sexual o mais comumente encontrado.

2.3 Ecoepidemiologia da criptococose

A doença criptocócica ocorre em humanos, animais domésticos e silvestres. A transmissão de animal para humano ou de humano para humano não tem sido documentada (LIN; HEITMAN, 2006).

Anterior à década de 80, a criptococose era descrita no homem e em outros animais de modo esporádico. Após o advento da Aids, os casos da micose em humanos passaram a ser frequentemente registrados em aproximadamente um terço dos pacientes HIV positivos, tendo como principal agente *C. neoformans* (LACAZ *et al.*, 2002).

A criptococose ocorre com maior frequência em pacientes adultos e do sexo masculino. A nível mundial, a incidência de criptococose em pacientes com idade inferior à puberdade é rara (MITCHELL; PERFECT, 1995). Porém, existem publicações que mostram que a criptococose em crianças nas regiões norte e nordeste do Brasil não é incomum (FREIRE *et al.*, 2012; MARTINS *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2008).

Abadi *et al.*, (1999) relataram prevalência de criptococose de 1,4% em população pediátrica com Aids no período de 1985 a 1994, sendo menor que a descrita em indivíduos adultos, que é de 6 a 10%.

Nos EUA, os casos de criptococose em pacientes com Aids representam mais de 50%, cuja principal apresentação clínica é a meningite criptocócica (LACAZ *et al.*, 2002). No

Brasil (1980-2002) foram registrados mais de 215.000 pacientes com Aids; 6% apresentavam criptococose na época do diagnóstico (LEAL *et al.*, 2008).

A criptococose é uma micose sistêmica, cosmopolita, com significativa morbidade e mortalidade (PERFECT *et al.*, 2010). Nos países desenvolvidos, a mortalidade por criptococose é cerca de 10% a 12%, atingindo 43% em países em desenvolvimento, enquanto na África subsaariana está estimada em 50 a 70% (Centers for Disease Control and Prevention, 2012; MORETTI *et al.*, 2008).

Em pacientes com criptococose, o isolamento de *Cryptococcus neoformans* de hemocultivos ocorre em 10 a 30% dos casos. A presença de *Cryptococcus* no sangue de pacientes com meningite criptocócica normalmente está associada a mal prognóstico (JEAN *et al.*, 2002; PASQUALOTTO *et al.*, 2004).

Cryptococcus neoformans encontra-se disseminado na natureza em vários substratos orgânicos, principalmente em excretas secas de aves, ricas em fontes nitrogenadas (LACAZ *et al.*, 2002; MORETTI *et al.*, 2008). Reolon, Perez e Mezzari (2004) estudaram 88 amostras de excretas de pombos (*Columba livia*) coletadas em diferentes praças na cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, e encontraram 100% de positividade para *C. neoformans*. É interessante observar que os pombos são resistentes à infecção criptocócica devido a sua elevada temperatura corporal interna (41-43°C) e à presença de componentes endógenos na microbiota intestinal que inibem sua multiplicação (CASADEVALL; PERFECT, 1998; SORRELL; ELLIS, 1997).

Dados da literatura revelam também isolamento de *C. neoformans* de fontes ambientais incluindo vegetais, madeira em decomposição, produtos lácteos e frutas (LAZÉRA *et al.*, 1996; LÓPEZ-MARTÍNEZ; CASTAÑÓN-OLIVARES, 1995; SORRELL; ELLIS, 1997).

Na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Filiú *et al.*, (2002) estudaram 20 amostras de excretas de aves em cativeiro e identificaram *C. neoformans*, sorotipo A em 50% delas, comprovando a ocorrência saprofítica de *C. neoformans* neste tipo de habitat.

Cryptococcus gattii foi primeiramente descrito em árvores de *Eucalyptus camaldulensis*, causando uma alta incidência de infecções em aborígenes australianos expostos (ELLIS; PFEIFFER, 1990). Estudos posteriores mostraram que essa espécie não tem associação específica com eucaliptos, pois também pode ser encontrada em outros tipos de árvores, como por exemplo, *Syzygium jambolana* (LAZÉRA; WANKE; NISHIKAWA, 1993), *Cassia grandis*, *Senna multijuga*, *Ficus microcarpa* (LAZÉRA *et al.*, 1996), *Moquilea*

tomentosa no Brasil (LAZÉRA *et al.*, 1998) e *Terminalia catappa* na Colômbia (CALLEJAS *et al.*, 1998). Costa *et al.*, (2009) descreveram o isolamento concomitante de *C. gattii* VGII e *C. neoformans* VNI colonizando o oco de árvore de *Senna siamea*.

Classicamente, *Cryptococcus neoformans* é predominantemente responsável pela criptococose oportunista e cosmopolita, que acomete indivíduos com imunodepressão celular, enquanto *C. gattii*, pela criptococose primária endêmica em regiões de clima tropical e subtropical em indivíduos aparentemente imunocompetentes (MORETTI *et al.*, 2008).

Estudos prévios mostram que técnicas de biologia molecular são consideradas importantes ferramentas para caracterizar os tipos moleculares e avaliar aspectos clínicos, epidemiológicos e genéticos das espécies de *Cryptococcus*. Entre essas técnicas, as mais utilizadas são: *Polymerase Chain Reaction (PCR) fingerprinting* utilizando *primers* microssatélite (M13) ou minissatélite (GACA)₄, (GTG)₅ específicos, *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP), *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) e cariotipagem eletroforética (BOEKHOUT *et al.*, 1997, 2001; CASALI *et al.*, 2003; FRANZOT *et al.*, 1997; MARTINS *et al.*, 2007; MEYER *et al.*, 1999, 2003; TRILLES *et al.*, 2008).

A utilização de técnicas moleculares em estudos epidemiológicos pode auxiliar na observação de mudança na distribuição geográfica das espécies. Além disso, podem ser utilizadas na detecção de surtos. A exemplo disso, Kidd *et al.*, (2004) documentou um surto de criptococose causado por *C. gattii*, tipo molecular VGII, ocorrido na Ilha de Vancouver, Canadá, região de clima temperado. Na investigação realizada, foram isolados *C. gattii* em amostras ambientais, clínicas e veterinárias. Esse fato serve de alerta para a comunidade científica quanto ao monitoramento da epidemiologia global das espécies de *Cryptococcus*.

Meyer e Trilles (2010) estudaram a distribuição mundial dos oito tipos moleculares entre 2.755 isolados de *Cryptococcus*. O tipo molecular VNI (sorotipo A) foi encontrado em 63% das amostras clínicas de humanos e animais e em 41% das amostras ambientais. Os pesquisadores constataram que esse tipo molecular foi mais prevalente na América Central (78%), Ásia (77%), África (72,6%), América do Sul (64%), Europa (45%) e América do Norte (41%). Na Oceania foi observado predomínio de *C. gattii*, tipo molecular VGI (43%).

Neste estudo, os autores referem que infecções causadas pelos tipos moleculares de *C. gattii* (20%) são menos comuns que as causadas por *C. neoformans* (80%), corroborando com estudos prévios (FREIRE *et al.*, 2012; MATOS *et al.*, 2012; TRILLES *et al.*, 2008).

2.4 Patogênese da criptococose

A inalação de propágulos viáveis do patógeno provenientes do ambiente ocasiona uma infecção pulmonar primária frequentemente assintomática. Após um período de latência, pode ocorrer disseminação para sítios extrapulmonares, com especial tropismo pelo sistema nervoso central, rico em catecolaminas, as quais são utilizadas pelo *C. neoformans* para a síntese de melanina que parece interferir na sua virulência (BICANIC; HARRISON, 2004; LACAZ *et al.*, 2002).

Com frequência, a criptococemia precede o envolvimento do sistema nervoso central e pode persistir por um período de até 16 semanas, apesar do tratamento (ROZENBAUM; GONÇALVES, 1994).

Infecções de corrente sanguínea e doença extra-SNC são frequentes em pacientes com Aids. Dados da literatura mostram o isolamento do *C. neoformans* no sangue em pelo menos 50% dos casos de criptococose (COLOMBO, 2003).

Um dos principais mecanismos de patogenicidade da levedura é a produção da cápsula, que impede a fagocitose (LACAZ *et al.*, 2002). As citocinas secretadas na resposta imune desencadeiam uma cascata de sinalização responsável por ativar ou suprimir os mecanismos necessários para a erradicação da infecção criptocócica (XIA *et al.*, 2010).

O estado imunológico do hospedeiro, a quantidade do inóculo e a virulência da levedura infectante são fatores relacionados ao curso da criptococose no paciente (MITCHELL; PERFECT, 1995; TSUJI; BARBABOSA; RIVERA, 2005).

De acordo com estudos prévios, são importantes fatores de virulência de *Cryptococcus* sp.: capacidade de crescimento a 37°C (termotolerância), produção de cápsula polissacarídica, síntese de melanina, *mating type* α , moléculas de adesão, produção de enzimas fenoloxidase, fosfolipase, proteinase, urease e moléculas de transdução do sinal (CASADEVALL; PERFECT, 1998; KUROKAWA; SUGIZAKI; PERAÇOLI, 1998; LIAW, WU, HSUEH, 2010).

De acordo com o *Centers for Disease Control and Prevention* (2012), HIV/Aids, uso de corticosteróides e outros imunossupressores, transplante de órgão sólido, doenças cardíaca, pulmonar ou hepática, diabetes e gravidez são as principais condições clínicas de risco para a infecção criptocócica.

2.5 Apresentação clínica

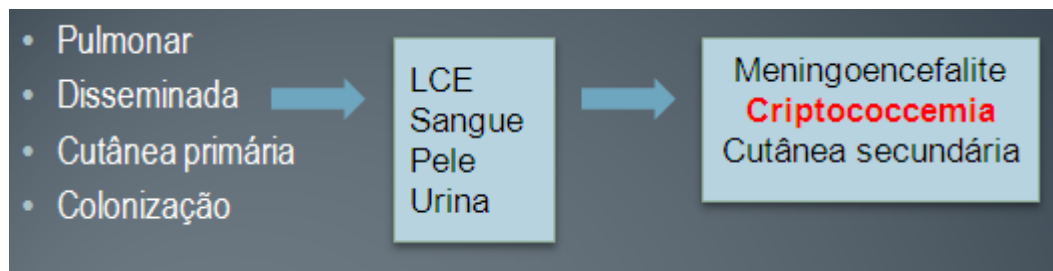
As apresentações clínicas da criptococose variam de manifestações localizadas autolimitadas a doença disseminada com falência respiratória e têm relação direta com a condição imunológica do indivíduo (MORETTI *et al.*, 2008).

Geralmente, uma média de 30 dias decorre entre o início dos sintomas e o diagnóstico da doença (SILVA, 2004). De caráter insidioso e subagudo, o quadro clínico do paciente com criptococose revela cefaléia de intensidade moderada, febre e rara alteração do estado mental. Em pacientes HIV positivos, é necessário um alto índice de suspeita dessa doença oportunista (OSUNA *et al.*, 2008).

Em indivíduos imunocompetentes, a infecção é caracterizada como subclínica, localizada e assintomática na maioria das vezes, enquanto nos imunodeprimidos, normalmente ocorre disseminação sistêmica (OSUNA *et al.*, 2008).

De forma didática, baseado em estudos prévios, as apresentações clínicas da criptococose estão ilustradas na figura 1 (BICANIC; HARRISON, 2004; BIVANCO; MACHADO; MARTINS, 2006; KWON-CHUNG; BENNET, 1992; PASA; CHANG; HANS-FILHO, 2012; PINTO JÚNIOR *et al.*, 2006; TSUJI, BARBABOSA; RIVERA, 2005).

Figura 1 - Formas de apresentação clínica da criptococose



Normalmente, a infecção pulmonar primária é assintomática, uma vez que pode ser contida com a formação de granuloma e até mesmo erradicada (BICANIC; HARRISON, 2004). Em pacientes imunodeprimidos, a infecção pulmonar pode variar de assintomática a grave (TSUJI, BARBABOSA, RIVERA, 2005).

A forma disseminada da doença é quando via hematogênica, *Cryptococcus* atinge outros sítios do organismo, podendo ser isolado em amostras clínicas de líquido céfalo-espinhal (meningite ou meningoencefalite), sangue (criptococcemia), pele (forma cutânea secundária) e urina (PINTO JÚNIOR *et al.*, 2006; TSUJI, BARBABOSA, RIVERA, 2005).

A apresentação clínica mais frequente é a meningoencefalite (BICANIC; HARRISON, 2004; ROZENBAUM; GONÇALVES, 1994). Na primeira década de vida, a neurocriptococose é rara e quase sempre está relacionada à desnutrição (LACAZ *et al.*, 2002). É imprescindível que em todos os pacientes com envolvimento pulmonar por *Cryptococcus* spp. seja investigada doença disseminada com possível presença do fungo no sistema nervoso central (MORETTI *et al.*, 2008). A meningite criptocócica pode se manifestar através de febre prolongada em indivíduos imunossuprimidos, em especial nos estágios mais avançados da Aids (SILVA, 2004).

Oliveira *et al.*, (2006) estudaram as doenças neurológicas em pacientes com HIV/Aids cuja maioria estava em uso da terapia antiretroviral altamente ativa (HAART) em Belo Horizonte, Minas Gerais, e identificaram a meningite criptocócica como a segunda doença neurológica mais prevalente nesse grupo de pacientes, sendo a toxoplasmose a mais comum.

Nas infecções por *C. gattii*, as sequelas neurológicas são mais graves devido à formação de granulomas no SNC (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2006a).

Criptococcemia ocorre com frequência em pacientes HIV positivos que apresentam disseminação da infecção criptocócica (PERFECT *et al.*, 2010).

Moreira *et al.*, (2006) realizaram um estudo prospectivo em 96 pacientes com diagnóstico de criptococose, no qual a fungemia foi a segunda manifestação clínica mais descrita com 13,5% dos casos.

Jean *et al.*, (2002) estudaram 52 pacientes com diagnóstico de criptococcemia e quanto às manifestações clínicas, 81% dos pacientes tiveram sepse. Dezoito (34,6%) apresentaram cefaléia, vômito, alteração da consciência, rigidez de nuca e convulsões.

A forma cutânea primária é observada quando ocorre inoculação traumática na pele (BIVANCO; MACHADO; MARTINS, 2006; PASA; CHANG; HANS-FILHO, 2012). Existem ainda os casos de colonização, em que o paciente pode apresentar amostras respiratórias positivas para *Cryptococcus* e outras amostras clínicas, como sangue, líquido e urina negativas, sem sintomatologia (KWON-CHUNG; BENNET, 1992; PINTO JÚNIOR *et al.*, 2006).

A próstata pode ser um importante reservatório para *Cryptococcus* e pode ser causa de recidivas em pacientes tratados (CHANG *et al.*, 2008; TSUJI, BARBABOSA, RIVERA, 2005).

Em suma, criptococose se manifesta com variados quadros clínicos. Pelo fato das manifestações clínicas serem inespecíficas, o agravamento da doença é muitas vezes consequência do atraso no diagnóstico (PINTO JÚNIOR *et al.*, 2006).

2.6 Diagnóstico laboratorial

Os principais sítios de importância no diagnóstico da criptococose são os pulmões, SNC, pele, próstata e olhos (MITCHELL; PERFECT, 1995).

Em pacientes com HIV, a doença geralmente ocorre naqueles com contagem de linfócitos T CD4⁺ menor que 100 céls./μL (COLOMBO, 2003).

O diagnóstico laboratorial da criptococose pode ser realizado por meio da microscopia direta, onde a levedura é visualizada em fundo preto, envolta em uma cápsula não corada, após preparação do líquido céfalo-espinhal (LCE) com tinta nanquim (tinta da China) (LEVINSON; JAWETZ, 2005). O exame micológico direto com a tinta nanquim é positivo em 70 a 90% dos pacientes com Aids, enquanto nos pacientes sem Aids a positividade é de aproximadamente 50% (BICANIC; HARRISON, 2004).

Nos casos de doença disseminada e fungemia, que ocorre em até um quarto dos casos de meningoencefalite, o diagnóstico é feito através da detecção do fungo em hemocultura (MORETTI *et al.*, 2008).

A partir de variadas amostras clínicas, como por exemplo, líquido, sangue e urina, o fungo pode ser cultivado em meios com ausência de cicloheximida, como o ágar sangue, ágar sabouraud dextrose (ASD) e ágar infusão de cérebro-coração. Nesses, observam-se colônias lisas e mucóides de cor branca a creme, após 48 a 72 horas de incubação à temperatura de 25 a 37°C (COLOMBO, 2003; MORETTI *et al.*, 2008).

A cultura em ágar níger mostra colônias marrons características devido à síntese de melanina pelas espécies *C. neoformans* e *C. gattii* que produzem a enzima fenoloxidase capaz de oxidar substâncias fenólicas do meio (LACAZ *et al.*, 2002; MORETTI *et al.*, 2008).

No meio de L-Canavanina, Glicina e Azul de Bromotimol (CGB), *C. gattii* utiliza a glicina como fonte de carbono, modificando a coloração do meio para azul cobalto, o que permite sua discriminação da espécie *C. neoformans* (KWON-CHUNG; POLACHEK; BENNETT, 1982).

O diagnóstico laboratorial da criptococose também pode ser feito por testes sorológicos. O antígeno capsular polissacarídeo é detectado em amostras de líquido ou soro

através da aglutinação em látex com anticorpos monoclonais disponibilizada em kits comerciais (BICANIC; HARRISON, 2004; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2006a). Trata-se de um método simples, rápido e de elevadas sensibilidade e especificidade, com positividade em mais de 90% dos casos de meningite criptocócica (MORETTI *et al.*, 2008).

As técnicas de biologia molecular são ferramentas disponíveis em laboratórios especializados que permitem uma melhor diferenciação das espécies de *Cryptococcus* e têm sido utilizadas em estudos epidemiológicos. Acredita-se que a ampliação dos conhecimentos a respeito da patogenicidade das diferentes espécies de *Cryptococcus* possa contribuir com novas perspectivas no tratamento das infecções fúngicas, possibilitando a diferenciação entre recidivas e novas infecções (CASALI *et al.*, 2001).

2.7 Antifúngicos e Tratamento

Para o tratamento da criptococose tem sido recomendada a anfotericina B e suas formulações lipídicas e triazólicos.

De acordo com estudos prévios, a principal droga antifúngica utilizada com sucesso no tratamento de todas as formas clínicas da criptococose é a anfotericina B, sendo considerada fungicida no combate à maioria dos fungos (COLOMBO, 2003; MITCHELL; PERFECT, 1995; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2006b).

A anfotericina B pertence ao grupo dos polienos e não é absorvida pelas vias intramuscular ou oral devido sua baixa solubilidade em água. A anfotericina B desoxicolato é a formulação convencional, administrada intravenosamente (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2006b).

As formulações lipídicas são recomendadas principalmente nos casos em que não há resposta ao tratamento com anfotericina B desoxicolato ou em pacientes com insuficiência renal, devido à nefrotoxicidade (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2006b).

A partir dos dados de seu estudo, Yuchong *et al.*, (2012) observaram que a injeção intratecal de anfotericina B é uma terapia que além de aumentar significativamente a concentração da droga no líquido céfalo-espinhal também reduz a pressão intracraniana.

Pacientes sensíveis a anfotericina B podem apresentar reações adversas como mialgia, insuficiência renal e hipocalemia, que desaparecem ao suspender o tratamento com tal antifúngico (TSUJI, BARBABOSA, RIVERA, 2006).

O grupo dos triazóis possui atividade sistêmica e dele fazem parte os antifúngicos fluconazol, itraconazol e voriconazol. De modo geral, os azóis exercem atividade fungistática contra leveduras (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2006b).

O fluconazol, triazol de primeira geração, tem excelente biodisponibilidade oral e baixa toxicidade. É solúvel em água e pode ser administrado via intravenosa ou oral. Exerce função importante no tratamento de micoses como candidíase, criptococose e coccidioidomicose por ser de fácil administração e pouco tóxico (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2006b).

Em pacientes com Aids, o fluconazol é utilizado no tratamento da meningite criptocócica a longo prazo (LEVINSON; JAWETZ, 2005). A emergência de resistência do *Cryptococcus* ao fluconazol (CIM > 64µg/mL) e ao itraconazol (CIM > 0,5µg/mL) pode ser atribuída ao uso prolongado de fluconazol nos casos de meningite criptocócica em pacientes com Aids durante a terapia de manutenção (MORETTI *et al.*, 2008).

O itraconazol é um triazol lipofílico que possui amplo espectro de atividade antifúngica, com apresentação oral e intravenosa. Em pacientes com meningite criptocócica tem sido usado como terapia de manutenção (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2006b).

O voriconazol é um triazol com amplo espectro de atividade antifúngica e pode ser administrado pelas vias oral ou intravenosa. Tem excelente penetração no sistema nervoso central e em outros tecidos (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2006b).

A 5-fluorocitosina é utilizada em associação com a anfotericina B para o tratamento de meningite criptocócica e não isoladamente, a fim de se evitar o surgimento de cepas resistentes. O fluconazol e o itraconazol podem ser utilizados como alternativas de tratamento (COLOMBO, 2003).

De acordo com especialistas a terapia antifúngica consiste de três fases: indução, consolidação e manutenção (MORETTI *et al.*, 2008; PERFECT *et al.*, 2010).

O objetivo da primeira fase é reduzir de forma efetiva ou até mesmo erradicar a carga fúngica, com tratamento realizado em pelo menos duas semanas. A segunda fase, realizada em tempo mínimo de oito semanas, visa manter a negatividade fúngica, além de normalizar parâmetros clínico-laboratoriais. A terceira fase é realizada por período mínimo de um ano devido ao elevado risco de recidiva, principalmente em pacientes com Aids com CD4 < 100 células/mm³ (MORETTI *et al.*, 2008).

Pacientes com criptococemia ou infecção disseminada são tratados da mesma forma que pacientes com infecção do sistema nervoso central, durante um período de 12 meses (PERFECT *et al.*, 2010).

Quando a CIM torna-se superior a quatro vezes nos isolados posteriores em comparação ao primeiro isolado, o recomendado é a troca do esquema antifúngico, pois esse fato sugere falha terapêutica devido ao desenvolvimento de resistência antifúngica (MORETTI *et al.*, 2008).

Para avaliar a suscetibilidade antifúngica de leveduras recomendam-se métodos que utilizam a técnica de microdiluição em caldo. São comumente utilizados os documentos padronizados pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), anteriormente denominado *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) e pelo *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST).

Na literatura, há relatos de isolados da espécie *C. gattii* que apresentaram valores de CIM mais elevados que a espécie *C. neoformans* frente a alguns antifúngicos (FERNANDES *et al.*, 2003; TRILLES *et al.*, 2004).

Em pacientes que utilizam antifúngicos sistêmicos a longo prazo, especialmente aqueles com Aids, podem ser reconhecidos casos de recidivas de criptococose através do acompanhamento do perfil de suscetibilidade da amostra, o qual pode apresentar menor sensibilidade ao antifúngico empregado na fase de manutenção (COLOMBO, 2003).

Enfim, é consenso que o sucesso no tratamento do paciente com criptococose depende do controle da imunidade do hospedeiro, do sítio de infecção, da toxicidade da droga antifúngica e das doenças de base associadas (PERFECT *et al.*, 2010).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Identificar as características clínicas e laboratoriais de pacientes com criptococemia atendidos em um hospital público de Campo Grande-MS.

3.2 Objetivos específicos

Para cumprir o objetivo geral, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- a) descrever o quadro clínico-laboratorial de pacientes que apresentaram criptococemia, relacionando com as variáveis de interesse;
- b) identificar o tipo molecular das espécies de *Cryptococcus* responsáveis pelos casos de criptococemia;
- c) determinar a suscetibilidade antifúngica *in vitro* das leveduras.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Tipo de pesquisa

Pesquisa do tipo descritiva seccional.

4.2 Local e período da pesquisa

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Pesquisas Microbiológicas e no Laboratório de Biologia Molecular e Culturas Celulares da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, com amostras de pacientes atendidos no Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian e no Hospital Dia Professora Esterina Corsini da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (HU/UFMS), na cidade de Campo Grande-MS, no período de julho de 1998 a julho de 2012.

O HU/UFMS é um hospital público terciário, de 255 leitos e, por se tratar de um centro de referência no diagnóstico e tratamento de doenças infecciosas e parasitárias, atende pacientes encaminhados de várias regiões do interior do estado.

4.3 Sujeitos da pesquisa

A população do estudo foi composta por pacientes com criptococemia diagnosticados laboratorialmente por meio do isolamento de *C. neoformans* ou *C. gattii* em hemoculturas no período proposto. Considerou-se apenas a primeira hemocultura positiva de cada paciente para a realização dos experimentos.

4.4 Procedimentos para coleta de dados

Os pacientes foram selecionados a partir da consulta ao livro de registro de exames do Laboratório de Micologia do Hospital Universitário.

Foram coletados dados demográficos, epidemiológicos e clínicos nos prontuários médicos. Resultados de exames laboratoriais foram obtidos do sistema de informação do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário. As informações foram registradas em um formulário específico (Apêndice A).

4.4.1 Dados clínicos e laboratoriais

Os dados clínicos e laboratoriais incluem:

- a) dados demográficos: sexo, idade, naturalidade, procedência, área e profissão/ocupação habitual;
- b) antecedentes: transplantes, uso de drogas imunossupressoras, quimioterapia, entre outros;
- c) manifestações clínicas: sinais e sintomas relatados no prontuário, na época do diagnóstico;
- d) doenças de base: Aids, diabetes mellitus, neoplasia, entre outras, conforme relato médico e/ou resultados de exames laboratoriais;
- e) coinfeções: outras infecções descritas no prontuário e/ou que tenham sido evidenciadas por exames laboratoriais como HIV, histoplasmose, toxoplasmose, candidíase oral, hepatite, citomegalovirose, tuberculose, pneumocistose;
- f) contagem de células CD4 e carga viral em pacientes HIV positivos;
- g) culturas positivas para *Cryptococcus* sp. provenientes de outras amostras clínicas na época da hemocultura positiva;
- h) antifúngicos administrados para o tratamento;
- i) exames complementares: hemograma, parâmetros líquidos e exames de imagem;
- j) evolução clínica: alta hospitalar ou óbito e período de internação.

4.4.2 Critérios e considerações para interpretação dos dados

Episódio de criptococcemia foi considerado quando pelo menos uma hemocultura foi positiva para *Cryptococcus* sp. na presença de sinais e sintomas de infecção de corrente sanguínea, independente do isolamento da levedura em outros sítios.

Na interpretação do hemograma considerou-se anemia quando a concentração de hemoglobina foi inferior a 13g/dL no homem adulto, 12g/dL na mulher adulta e 12g/dL em crianças entre 6 e 14 anos de idade. Foram ainda consideradas leucopenia (leucócitos < 4.000), leucocitose (leucócitos > 11.000) e plaquetopenia quando plaquetas < 100.000 (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2004).

4.5 Caracterização laboratorial

4.5.1 Amostras

Foram estudados *Cryptococcus* spp. isolados de hemoculturas encaminhadas ao laboratório de micologia do Hospital Universitário da UFMS a pedido médico para fins diagnósticos e tratamento dos pacientes com suspeita de infecção.

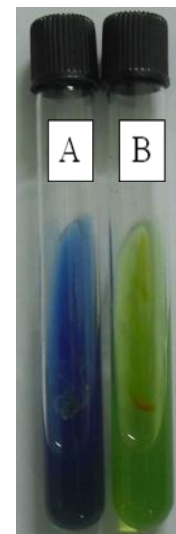
A identificação das leveduras foi realizada por meio de técnicas convencionais como ágar níger (Figura 2) e meio de canavanina-glicina-azul de bromotimol - CGB (Figura 3), e sistema automatizado Vitek 2 (bioMérieux, França).

Figura 2 - Colônias marrons características do complexo *C. neoformans* em ágar níger



Fonte: Tsujisaki (2012)

Figura 3 - Meio de CGB: A. positivo (azul, *C. gattii*). B. negativo (verde, *C. neoformans*)



Fonte: Tsujisaki (2012)

Cryptococcus isolados de 1998 a 2010 estavam armazenados em *skim milk* e glicerol a -20°C ou em caldo *Brain Heart Infusion* - BHI (Oxoid, Inglaterra) e glicerol a -20°C.

Durante a realização dos testes, os micro-organismos foram mantidos em tubos de Ágar Sabouraud Dextrose - ASD (Oxoid, Inglaterra) à temperatura de 2-4°C.

4.5.2 Genotipagem

A tipagem molecular dos *Cryptococcus* isolados foi baseada na metodologia de Meyer *et al.*, (2003).

4.5.2.1 Padrões moleculares

Para interpretar os resultados da PCR-RFLP foi utilizado *Cryptococcus neoformans* WM 148 (VNI, sorotipo A), WM 626 (VNII, sorotipo A), WM 628 (VNIII, sorotipo AD), WM 629 (VNIV, sorotipo D) e *Cryptococcus gattii* WM 179 (VGI, sorotipo B), WM 178 (VGII, sorotipo B), WM 175 (VGIII, sorotipo B), WM 779 (VGIV, sorotipo C) (MEYER *et al.*, 1999, 2003; TRILLES *et al.*, 2008). Esses foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Micologia do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (FIOCRUZ/RJ).

4.5.2.2 Extração do DNA

Realizou-se a extração do DNA segundo Ferrer *et al.* (2001) com pequenas modificações. Antes de iniciar a extração do DNA, as leveduras foram cultivadas em placas de ASD a 27(±2)°C por 72 horas. Com alças descartáveis, transferiu-se uma alçada das colônias para tubos de microcentrífuga de 1,5mL, armazenando-os a -20°C *overnight*.

Adicionou-se 500µL do tampão de lise (Apêndice B) e 5µL de 2-mercaptoetanol (Sigma, EUA) aos microtubos e, após agitar vigorosamente em vórtex, foram incubados a 65°C em banho seco durante 1 hora, com nova homogeneização em vórtex a cada 30 minutos.

O lisado foi extraído com a adição de 500µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1, v/v/v) (Sigma, EUA) seguido de agitação em vórtex para se obter uma suspensão homogênea.

Após a centrifugação dos tubos a 16.110xg durante 20 minutos, transferiu-se a fase aquosa superior para outro tubo de 1,5mL, onde foi adicionado igual volume de isopropanol (Synth, Brasil) seguido de delicada homogeneização.

Para a precipitação do DNA com melhor rendimento, os tubos foram armazenados a -20°C *overnight*.

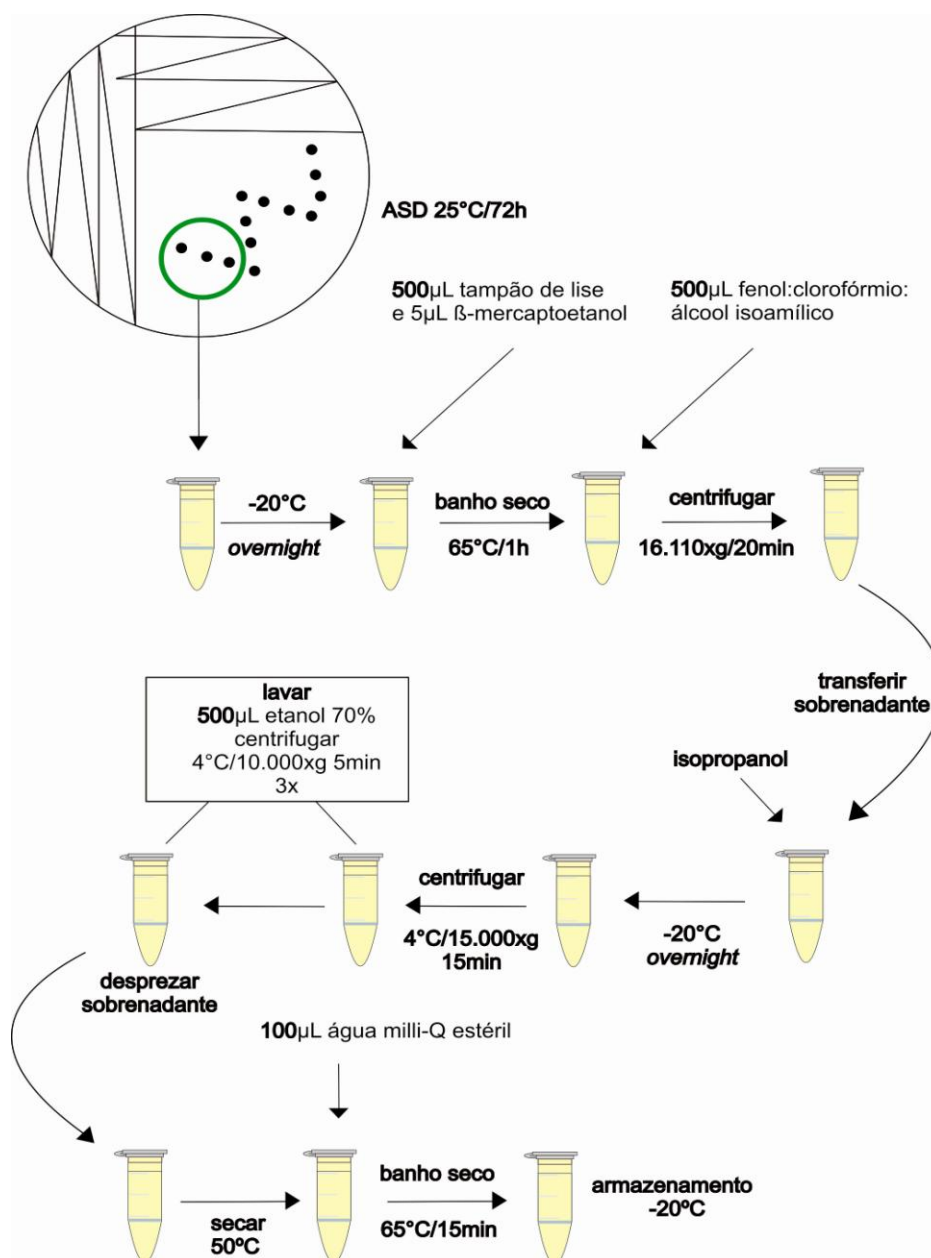
Os tubos foram centrifugados a 4°C a 15.000xg durante 15 minutos. Após descartar o sobrenadante, o *pellet* de DNA foi lavado com 500µL de etanol a 70% a fim de retirar as

impurezas remanescentes. Os tubos foram centrifugados a 4°C a 10.000xg durante 5 minutos. O sobrenadante foi mais uma vez descartado, repetindo-se três vezes este processo de lavagem.

Após o último descarte, os tubos foram dispostos em estufa a 50°C para secagem do *pellet*. O DNA precipitado foi ressuspensionado com a adição de 100µL de água milli-Q estéril e aquecido em banho seco a 65°C durante 15 minutos, seguido de armazenamento a -20°C.

A figura 4 resume o processo de extração do DNA.

Figura 4 - Desenho esquemático da extração de DNA de *Cryptococcus* spp



Fonte: Adaptado de Pasa (2011)

4.5.2.3 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) - URA5

A reação de polimorfismo de tamanho dos fragmentos de restrição do gene *URA5* foi realizada de acordo com Meyer *et al.* (2003), com pequenas modificações.

4.5.2.3.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A reação de amplificação do gene *URA5* foi realizada com volume final de 25µL, sendo 24µL de mix e 1µL de DNA total (Figura 5).

Como controle positivo utilizou-se uma cepa padrão molecular de *Cryptococcus neoformans* WM 148 (sorotipo A, VNI). Como controle negativo pipetou-se 1µL de água milli-Q estéril no lugar do DNA.

Figura 5 - Reagentes que compõem o mix da reação de PCR com seus respectivos volumes e concentrações

Componente	Volume (µL)	Concentração
Água milli-Q estéril	19,15	-
Tampão PCR 10X	2,5	1X
dNTPs 10mM (Biotools, Espanha)	0,5	0,2mM
Cloreto de magnésio (MgCl ₂) 50mM	0,75	1,5mM
Primer URA5 10pmol* (IDT, EUA)	0,5	0,2pmol
Primer SJ01 10pmol* (IDT, EUA)	0,5	0,2pmol
Platinum Taq DNA polimerase 500U (Invitrogen, EUA)	0,1	0,5U
DNA total	1,0	-
Volume final	25	-

*Primers URA5 (5' ATGCCTCCCAAGCCCTCGACTCCG 3') e SJ01 (5' TTAAGACCTCTGAACACCGTACTC 3').

As reações de amplificação em termociclador (BIOER XP Cyclyer, China) ocorreram ajustadas às seguintes condições: um ciclo a 94°C durante 2 minutos para a desnaturação inicial, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 55,7°C durante 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos, seguido de um ciclo de extensão final a 72°C durante 10 minutos.

4.5.2.3.2 Eletroforese do produto da PCR

Aplicou-se o produto da PCR em gel de agarose (Promega, EUA) a 1,4%. A eletroforese foi realizada com tampão de corrida TBE 1X (Apêndice B) utilizando a fonte

(300STD, GSR) a 100V, 400mA e 90W durante 1 hora e 30 minutos. O gel foi corado com GelRed™ (Biotium, EUA) e as bandas do gene *URA5* ($\cong$ 750bp) amplificadas foram visualizadas em transiluminador sob a luz UV.

4.5.2.3.3 Reação de polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP)

Preparou-se um master mix sob refrigeração para a reação de RFLP, totalizando 2,5µL de reação por amostra (Figura 6).

Figura 6 - Reagentes da reação de RFLP com seus respectivos volumes

Componente	Volume (µL)
Tampão NeBH	1,5
Albumina BSA	0,15
Enzima <i>HhaI</i> 20.000U/mL (New England Biolabs, EUA)	0,2
Enzima <i>Sau96I</i> 5.000U/mL (New England Biolabs, EUA)	0,35
Água milli-Q estéril	0,3
Volume final	2,5

Nesta reação foram empregadas duas enzimas de restrição: *HhaI* e *Sau96I*, encarregadas de realizar a digestão do DNA amplificado, ou seja, cortar o DNA em sítios específicos, originando fragmentos. A reação de RFLP ocorreu sob incubação a 37°C em termociclador (BIOER XP Cycler, China) durante 3 horas, após a adição de 2,5µL do mix aos 17µL de produto da PCR.

4.5.2.3.4 Eletroforese do RFLP

Os fragmentos de DNA gerados pela reação de RFLP foram aplicados em gel de agarose (Promega, EUA) a 2,0%. A eletroforese para a separação das bandas foi realizada com tampão de corrida TBE 1X (Apêndice B) utilizando a fonte (300STD, GSR) a 100V, 400mA e 90W durante 3 horas.

O gel foi corado com GelRed™ (Biotium, EUA) e as bandas separadas foram visualizadas em transiluminador sob a luz UV.

A análise das bandas obtidas foi realizada mediante a comparação visual com as bandas dos oito padrões moleculares de referência, permitindo a identificação do genótipo de cada amostra de *Cryptococcus*.

4.5.3 Suscetibilidade antifúngica *in vitro*

As colônias de *Cryptococcus* foram isoladas em ágar níger, repicadas em ASD e incubadas a 35(±1)°C por 48h para a realização do antifungigrama.

Para a determinação da suscetibilidade antifúngica, realizou-se a técnica de microdiluição em caldo descrita no documento M27-A3, padronizada pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* - CLSI (2008).

4.5.3.1 Fármacos antifúngicos

Anfotericina B - AMB (Sigma, EUA), fluconazol - FLC (Sigma, EUA), itraconazol - ITC (Sigma, EUA) e voriconazol - VRC (Pfizer, EUA) foram pesados em balança analítica calibrada. A potência de cada substância foi empregada conforme descrito pelo fabricante: anfotericina B (800µg/mg), fluconazol (980µg/mg), itraconazol (980µg/mg) e voriconazol (970µg/mg). Para calcular o volume de solvente necessário a fim de se obter a concentração desejada das soluções dos antifúngicos, aplicou-se a fórmula recomendada pelo CLSI:

$$\text{Vol. (mL)} = \frac{\text{Peso (mg)} \times \text{Potência da substância (}\mu\text{g/mg)}}{\text{Concentração (}\mu\text{g/mL)}}$$

4.5.3.2 Preparo das soluções estoque (soluções padrão ou soluções-mãe)

Os fármacos anfotericina B, itraconazol e voriconazol foram dissolvidos em dimetilsulfóxido - DMSO (Sigma, EUA) na concentração de 1600µg/mL e fluconazol em água milli-Q estéril na concentração de 5120µg/mL.

Após a completa solubilização, as soluções-mãe foram aliquotadas em tubos criogênicos e armazenadas a -20°C por um período de até seis meses para posterior utilização, sem perda significativa da atividade antifúngica. Por ser fotossensível, a AMB foi protegida da luz durante todo o procedimento.

4.5.3.3 Diluições dos agentes antifúngicos e preparo das microplacas

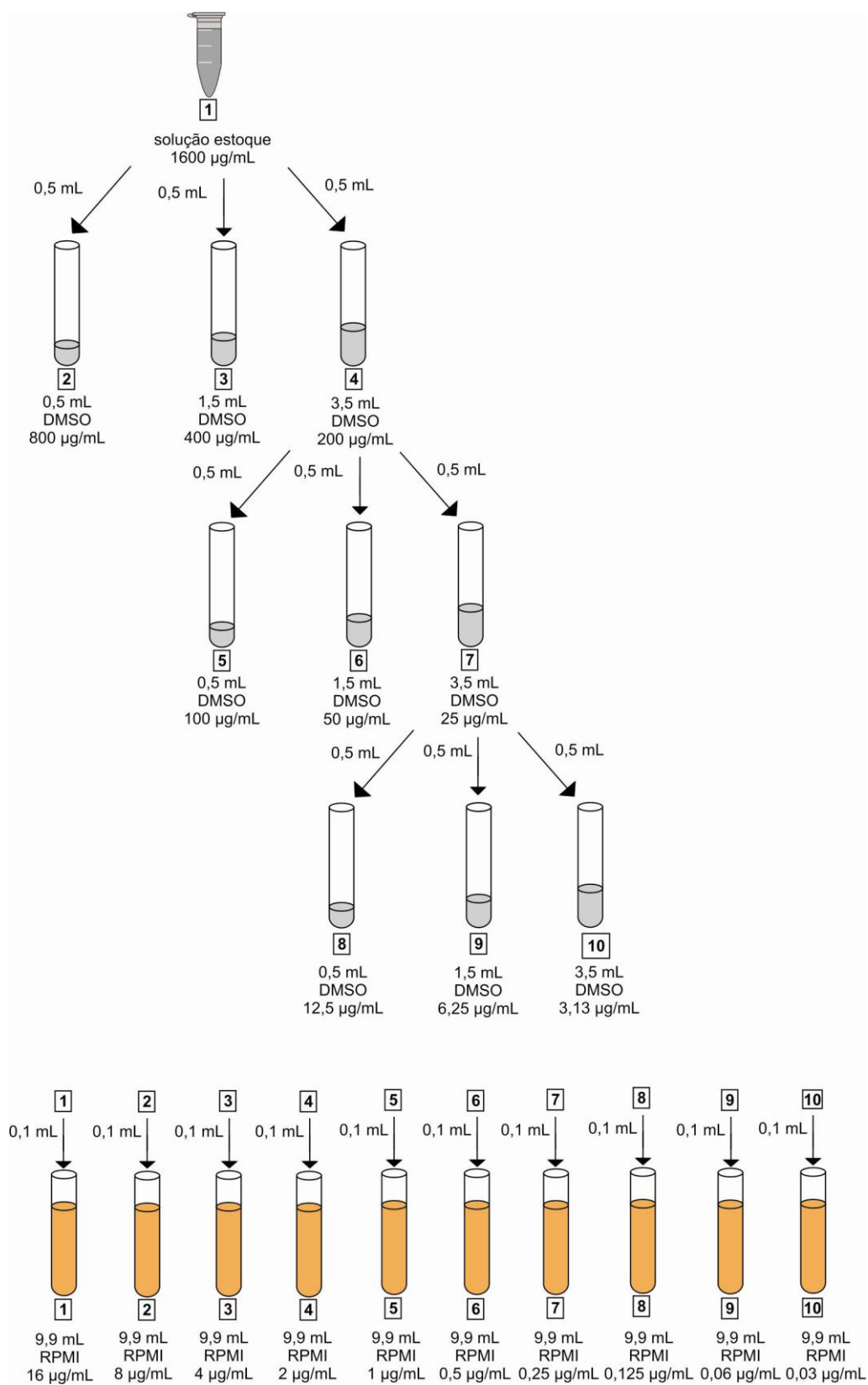
A partir da solução-mãe de cada antifúngico, realizou-se uma sequência de diluições em DMSO. Em seguida fez-se uma diluição de 1:100 dos fármacos anfotericina B, itraconazol e voriconazol utilizando meio RPMI 1640 (com glutamina, sem antimicótico, antibiótico e bicarbonato, pH estabilizado em 7,0 e MOPS a 0,165mM; Vitrocell, Brasil). As diluições do fluconazol foram realizadas em meio RPMI 1640, com diluição final de 1:10.

Para a diluição dos fármacos AMB, ITC e VRC foram numerados dez tubos de ensaio grandes (15x150mm) de 1 a 10 e nove tubos de ensaio pequenos (15x100mm) de 2 a 10. O meio RPMI 1640 foi pipetado nos tubos grandes e o DMSO nos tubos pequenos.

Partindo da solução estoque 1600µg/mL foram transferidos 0,5mL para os tubos 2, 3 e 4 contendo DMSO. Transferiu-se 0,5mL do tubo 4 para os tubos 5, 6 e 7 e 0,5mL do tubo 7 para os tubos 8, 9 e 10. Cada transferência de volume de um tubo para outro foi precedida de homogeneização em vórtex.

Após essas diluições, foram transferidos 0,1mL de cada tubo (2 a 10) para os tubos de ensaio com 9,9mL de RPMI 1640, sendo pipetado 0,1mL da solução estoque 1600µg/mL no tubo 1. Dessa forma obteve-se uma diluição final de 1:100. As concentrações finais dos antifúngicos anfotericina B, itraconazol e voriconazol nos tubos de 1 a 10 variaram de 16 a 0,03µg/mL, respectivamente. A figura 7 ilustra os procedimentos realizados.

Figura 7 - Desenho esquemático das diluições dos fármacos anfotericina B, itraconazol e voriconazol



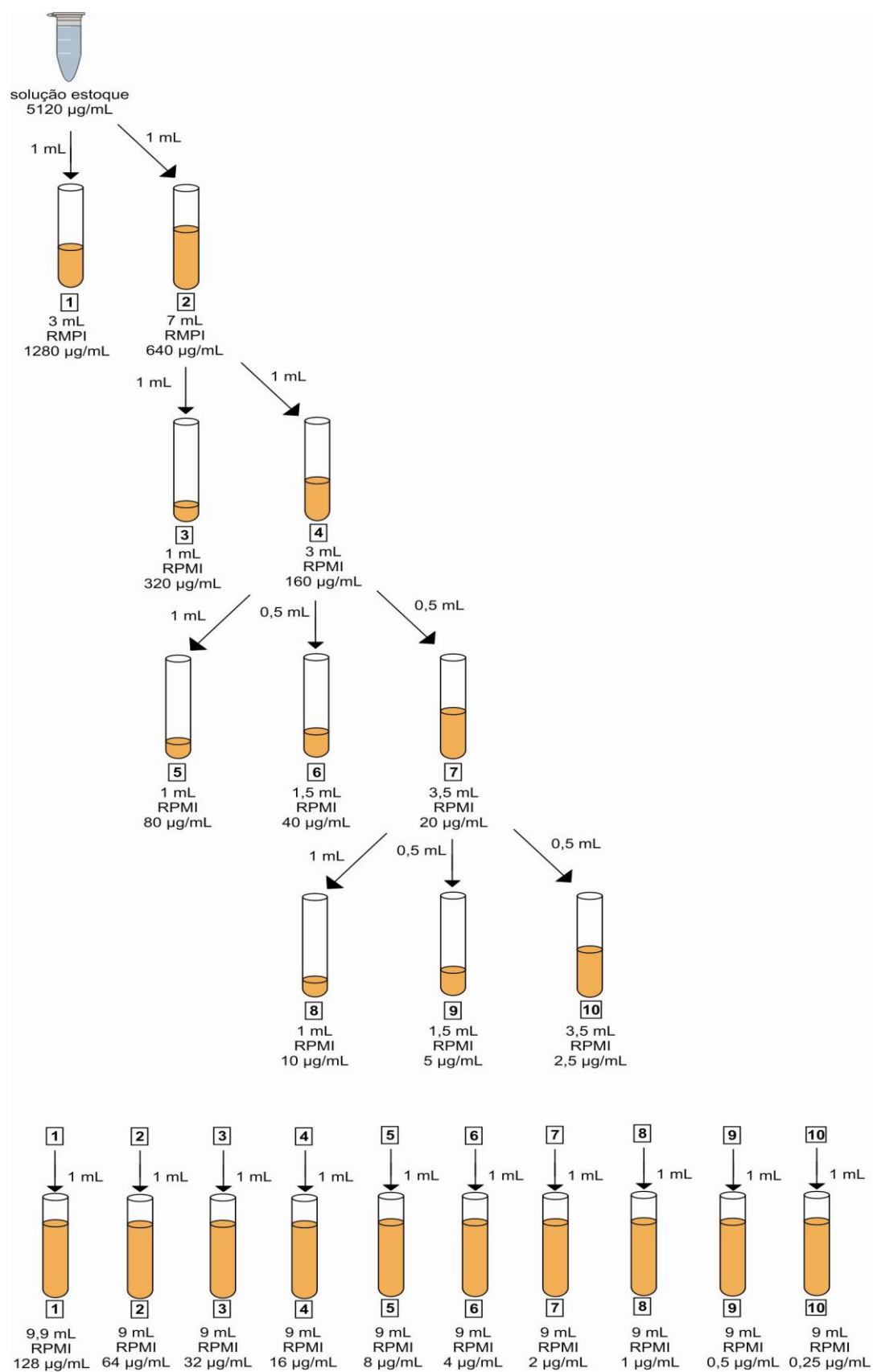
Fonte: Adaptado de Pasa (2011)

As diluições do fluconazol foram preparadas de forma semelhante às dos demais fármacos. Numeraram-se dez tubos de ensaio grandes (15x150mm) e dez pequenos (15x100mm) de 1 a 10. O meio RPMI 1640 foi pipetado nos tubos grandes e pequenos.

Partindo da solução estoque 5120µg/mL foram transferidos 1,0mL para os tubos pequenos 1 e 2 contendo RPMI 1640. Transferiu-se 1,0mL do tubo 2 para os tubos 3 e 4, 1,0mL do tubo 4 para o tubo 5 e 0,5mL para os tubos 6 e 7, 1,0mL do tubo 7 para o tubo 8 e 0,5mL para os tubos 9 e 10.

Após o término das diluições, foram transferidos 1,0mL de cada tubo pequeno (1 a 10) para os tubos de ensaio com 9,0mL de RPMI 1640, obtendo-se uma diluição final de 1:10. As concentrações finais do fluconazol nos tubos de 1 a 10 variaram de 128 a 0,25µg/mL, respectivamente (Figura 8).

Figura 8 - Desenho esquemático das diluições do fármaco fluconazol

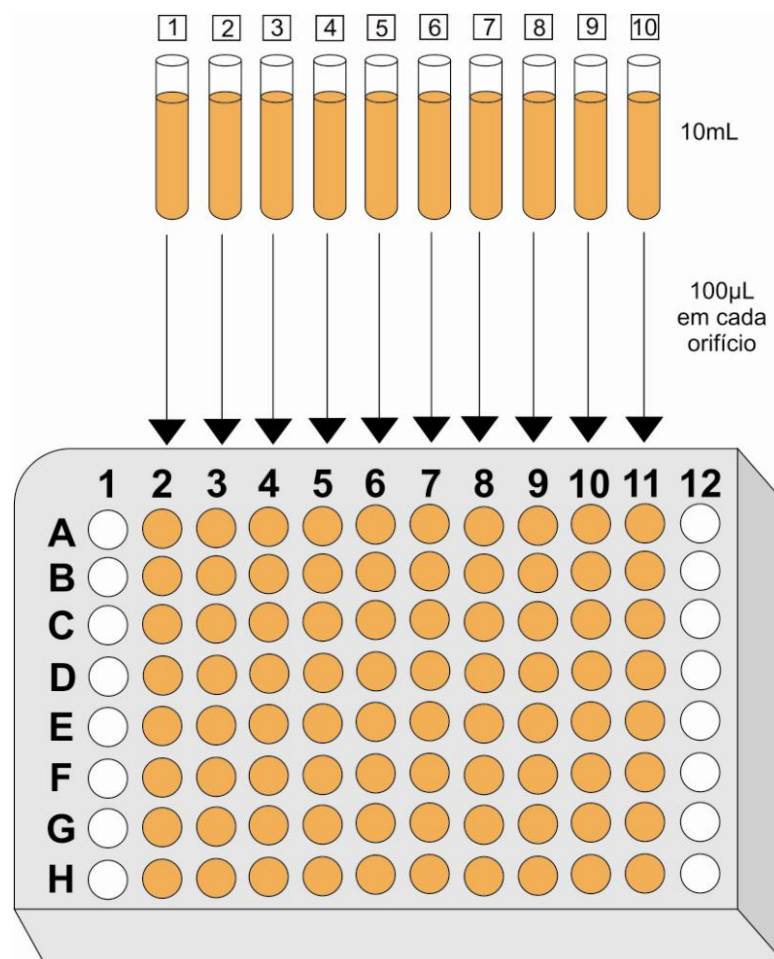


Fonte: Adaptado de Pasa (2011)

Com pipeta multicanal, 100µL de cada antifúngico diluído foi distribuído em microplacas com 96 orifícios de fundo chato nas colunas de 2 a 11. O antifúngico do tubo 10 foi adicionado na coluna 11, o do tubo 9 na coluna 10 e assim sucessivamente, da solução mais diluída para a mais concentrada. Os orifícios das colunas 1 e 12 permaneceram vazios, pois foram utilizados para os controles de esterilidade e de crescimento, respectivamente (Figura 9).

As placas foram cobertas com Parafilm® e estocadas a -20°C por um período de até seis meses. Utilizou-se papel alumínio para encobrir as placas de anfotericina B devido à fotossensibilidade.

Figura 9 - Desenho esquemático da distribuição dos fármacos diluídos nas microplacas



Fonte: Adaptado de Pasa (2011)

4.5.3.4 Preparo do inóculo e distribuição nas microplacas

A partir do crescimento de *Cryptococcus* em ASD a 35°C por 48 horas, com a alça descartável, preparou-se a suspensão do inóculo em tubos de ensaio com 5mL de salina estéril (NaCl a 0,85%).

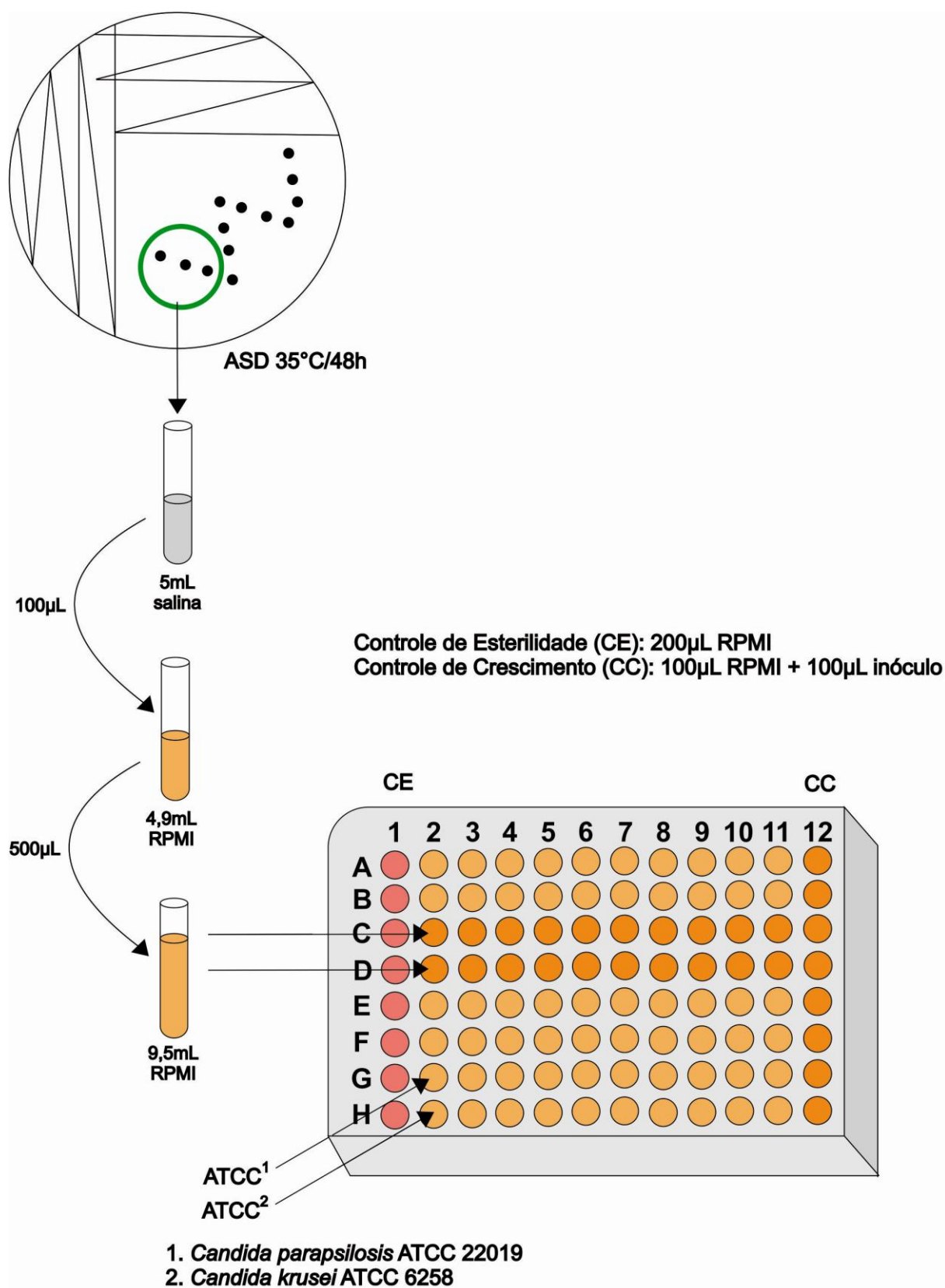
Após homogeneização em vórtex, ajustou-se a densidade celular (1×10^6 a 5×10^6 células/mL) com base na turbidez da escala 0,5 de Mc Farland e com o auxílio de um cartão de Wickerhan.

Em seguida, transferiu-se 100µL da suspensão do inóculo para um tubo de ensaio contendo 4,9mL do meio RPMI (diluição 1:50). Na sequência, transferiu-se 500µL dessa diluição para um novo tubo com 9,5mL de RPMI 1640 (diluição 1:20). A transferência de volumes de um tubo para outro foi precedida de homogeneização em vórtex.

Com pipeta multicanal, distribuíram-se os inóculos homogeneizados nas linhas das microplacas, colunas 2 a 12, na quantidade de 100µL por orifício (diluição 1:2), obtendo-se uma concentração final do inóculo de $5,0 \times 10^2$ a $2,5 \times 10^3$ células/mL.

Sendo assim, as concentrações finais dos antifúngicos nas colunas 2 a 12 das microplacas variaram de 64 a 0,125µg/mL para o fluconazol e 8 a 0,015µg/mL para os demais fármacos. Cada amostra foi adicionada em duas linhas sucessivas (testes em duplicata), totalizando três amostras por placa de antifúngico (Figura 10).

Figura 10 - Desenho esquemático das distribuições do inóculo, dos controles de crescimento e de esterilidade e das cepas ATCC do controle de qualidade, nas microplacas



Fonte: Adaptado de Pasa (2011)

4.5.3.5 Controle de qualidade

A fim de assegurar a reprodutibilidade dos testes, *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) e *Candida krusei* (ATCC 6258) foram utilizadas como controle de qualidade. Essas cepas foram distribuídas nas duas últimas linhas de cada microplaca contendo os antifúngicos (Figura 10).

Na coluna 1 (controle negativo - CN ou controle de esterilidade - CE) pipetou-se apenas 200µL do meio RPMI 1640, enquanto na coluna 12 (controle positivo - CP ou controle de crescimento - CC) distribuiu-se 100µL de RPMI 1640 e 100µL do inóculo, possibilitando assim o crescimento total da levedura devido a ausência de fármaco antifúngico (Figura 10).

4.5.3.6 Incubação das microplacas, leitura e interpretação dos testes

As microplacas foram incubadas a 35°C por 48 a 72 horas. A leitura da concentração inibitória mínima (CIM) em µg/mL preconizada pelo CLSI é visual, realizada mediante comparação do crescimento fúngico em cada orifício com o da coluna 12 (CC) para os azóis, pontuando-se conforme a escala: 4 = nenhuma redução do crescimento, 3 = ligeira redução do crescimento, 2 = redução proeminente do crescimento, 1 = crescimento indefinido, 0 = opticamente claro e límpido.

Em relação à anfotericina B (fungicida), a CIM foi considerada como a menor concentração do fármaco que inibiu 100% do crescimento da levedura, enquanto para os azóis (agentes fungistáticos) foi considerada a menor concentração do antifúngico que reduziu em 50% o crescimento do fungo.

Calculou-se a menor concentração do antifúngico capaz de inibir o crescimento de 50% (MIC₅₀) e 90% (MIC₉₀) dos isolados.

O documento M27-S3 (*Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2008) estabeleceu intervalos de CIM para as cepas ATCC utilizadas como controle de qualidade (Figura 11).

Figura 11 - Valores de concentração inibitória mínima para as cepas ATCC utilizadas como controle de qualidade

CIM (µg/mL)			
Droga antifúngica	Tempo de incubação (horas)	<i>C.parapsilosis</i> (ATC 22019)	<i>C.krusei</i> (ATCC 6258)
Fluconazol	24	0,5-4,0	8,0-64
Itraconazol		0,12-0,5	0,12-1,0
Voriconazol		0,016-0,12	0,06-0,5
Anfotericina B		0,25-2,0	0,5-2,0
Fluconazol	48	1,0-4,0	16-128
Itraconazol		0,12-0,5	0,25-1,0
Voriconazol		0,03-0,25	0,12-1,0
Anfotericina B		0,5-4,0	1,0-4,0

Fonte: *Clinical and Laboratory Standards Institute* (2008) - M27-S3

A classificação das leveduras como “sensível” ou “resistente” frente às concentrações dos antifúngicos testadas baseia-se na comparação com os *breakpoints* sugeridos na literatura e utilizados por outros pesquisadores, uma vez que o CLSI não definiu valores de referência para as leveduras do gênero *Cryptococcus*.

Na interpretação da suscetibilidade antifúngica foram consideradas resistentes as leveduras que apresentaram para fluconazol $CIM \geq 16\mu\text{g/mL}$ (ALLER *et al.*, 2000), para itraconazol e voriconazol $CIM \geq 1\mu\text{g/mL}$ (SOUZA *et al.*, 2005) e para anfotericina B $CIM \geq 2\mu\text{g/mL}$ (LOZANO-CHIU *et al.*, 1998; SOUZA *et al.*, 2005).

4.6 Organização e análise dos dados

Após a devida organização, os dados coletados foram submetidos à análise estatística por meio dos programas Epi Info™ versão 3.5.1 (*Centers for Disease Control and Prevention*, 2008) e BioEstat® versão 5.3 (Ayres *et al.*, 2007).

4.7 Aspectos éticos

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UFMS sob o protocolo n.º 2163 no ano de 2011 (Anexo A).

5 RESULTADOS

No período de quatorze anos (julho de 1998 a julho de 2012), criptococemia foi diagnosticada por critérios laboratoriais em 48 pacientes, 35 (72,9%) do sexo masculino e 13 (27,1%) do sexo feminino. A idade dos pacientes variou de 10 a 90 anos, com mediana de 40 anos. Somente uma criança teve diagnóstico de criptococemia. Os mais atingidos foram os da faixa etária de 35 a 49 anos (31,3%).

Os dados demográficos dos pacientes incluídos no estudo estão ilustrados na tabela 1.

Tabela 1 - Distribuição dos pacientes com criptococemia segundo dados demográficos, HU/UFMS - julho 1998-2012 (n = 48)

Dados demográficos	N.º	%
Sexo		
Masculino	35	72,9
Feminino	13	27,1
Faixa etária (anos)		
10 a 12	1	2,1
13 a 24	4	8,3
25 a 34	13	27,1
35 a 49	15	31,3
50 a 64	8	16,7
≥ 65	7	14,6
Naturalidade		
Mato Grosso do Sul	33	68,7
Outros estados	13	27,1
Sem informação	2	4,2
Procedência		
Campo Grande	30	62,5
Interior de Mato Grosso do Sul	18	37,5
Zona		
Urbana	42	87,5
Rural	6	12,5

Trinta e três (68,7%) eram naturais de Mato Grosso do Sul e 13 (27,1%) de outros estados brasileiros: São Paulo (n = 3), Minas Gerais, Pernambuco (n = 2), Alagoas, Ceará, Mato Grosso, Paraná, Rio Grande do Sul e Sergipe (n = 1). Quanto à procedência, 30 (62,5%) residiam na capital e 18 (37,5%) em cidades do interior do estado: Bandeirantes, Sidrolândia

(n = 2), Aquidauana, Bataguassu, Chapadão do Sul, Corguinho, Inocência, Maracaju, Miranda, Naviraí, Nova Alvorada do Sul, Ponta Porã, Porto Murtinho, Ribas do Rio Pardo, Rio Verde, São Gabriel do Oeste (n = 1). Seis (12,5%) viviam em área rural, dos quais uma paciente era aborígine e residia em aldeia no interior do estado.

A profissão ou ocupação habitual relatada nos prontuários foram: trabalhador rural (n = 5), aposentado, estudante, serviços gerais (n = 3), comerciante, cozinheiro, empregada doméstica, operador de caixa de supermercado, pedreiro, vendedor (n = 2), ambulante, auxiliar de serviços, cabeleireiro, carvoeiro, do lar, mecânico, motorista, padeiro, técnico de aparelho de som, telefonista, torneiro mecânico (n = 1) e sem informação (n = 11).

Trinta e nove (81,3%) pacientes tinham HIV/Aids, 29 (74,4%) do sexo masculino e 10 (25,6%) do sexo feminino. Quatro (8,3%) eram HIV negativos, três do sexo masculino e um do sexo feminino e em cinco (10,4%) a sorologia para HIV era desconhecida.

A contagem de células CD4 em 25/39 (64,1%) pacientes variou de 5 a 155 células/mm³, com mediana de 32 células/mm³. Vinte e quatro (96,0%) deles tinham resultado de CD4 inferior a 100 células/mm³. A carga viral de 23 pacientes variou de 110 a 1.500.000 com mediana de 71.258 cópias/mL. Em um paciente não foi possível mensurar a carga viral.

Quanto ao agente etiológico foram isolados *Cryptococcus neoformans* (47; 97,9%) e *C. gattii* (1; 2,1%). Dos pacientes com *C. neoformans*, 39 (83,0%) tinham HIV/Aids, quatro (8,5%) eram HIV negativos e quatro (8,5%) tinham sorologia desconhecida para o HIV. A espécie *C. gattii* foi isolada em paciente com sorologia desconhecida para o HIV.

Quanto às doenças de base, HIV/Aids foi a mais comum (39/48; 81,3%), seguida de diabetes mellitus (6/48; 12,5%) e cirrose hepática (2/48; 4,2%). Não foram identificadas doenças de base em cinco (10,4%) pacientes, dos quais três eram HIV negativos. O quarto paciente sem HIV apresentava cirrose hepática.

As condições clínicas descritas entre os pacientes HIV negativos estão apresentadas na tabela 2.

Tabela 2 - Condições clínicas dos pacientes HIV negativos com criptococcemia, HU/UFMS - julho 1998-2012 (n = 4)

Condições clínicas	Nº.	%
Hipertensão arterial	2	50,0
Insuficiência renal aguda	2	50,0
Doença cardíaca	1	25,0
Doença pulmonar obstrutiva crônica	1	25,0
Câncer	1	25,0
Uso de corticóide por tempo prolongado	1	25,0
Reumatismo	1	25,0

Nota: Cada paciente apresentava uma ou mais condições clínicas.

Cryptococcus também foi isolado de outras amostras clínicas incluindo líquido céfalo-espinhal (24/48; 50,0%), urina (8/48; 16,7%), lavado brônquico (2/48; 4,2%), escarro (1/48; 2,1%), secreção orofaríngea (1/48; 2,1%), aspirado traqueal (1/48; 2,1%) e aspirado de medula óssea (1/48; 2,1%).

As manifestações clínicas mais frequentes foram febre (83,3%), emagrecimento (58,3%), vômito (58,3%), tosse (58,3%) e cefaléia (56,3%).

As coinfeções mais relatadas ou evidenciadas foram HIV/Aids (39/48; 81,3%), candidíase oral e/ou esofágica (25/48; 52,1%), pneumocistose (8/48; 16,7%) e tuberculose (8/48; 16,7%).

Três pacientes apresentavam infecções fúngicas mistas: criptococose, histoplasmose e paracoccidioidomicose (n = 1) e criptococose e histoplasmose (n = 2), sendo o primeiro caso em HIV negativo e os outros dois em pacientes com HIV/Aids.

Os dados clínicos dos pacientes com diagnóstico de criptococcemia estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3 - Aspectos clínicos de 48 pacientes com criptococcemia, HU/UFMS - julho 1998-2012

Dados clínicos	N°.	%
Sítios de isolamento de <i>Cryptococcus</i> além da corrente sanguínea		
SNC	24	50,0
Trato urinário	8	16,7
Outros ¹	6	12,5
Manifestações clínicas		
Gerais		
Febre	40	83,3
Emagrecimento	28	58,3
Diarréia	20	41,7
Dor abdominal	19	39,6
Sepse/Choque séptico	15	31,3
Neurológicas		
Vômito	28	58,3
Cefaléia	27	56,3
Alteração da consciência ²	21	43,8
Náusea	20	41,7
Alteração visual ³	15	31,3
Rigidez de nuca	12	25,0
Respiratórias		
Tosse	28	58,3
Dispnéia	23	47,9
Coinfecção		
HIV/Aids	39	81,3
Candidíase oral e/ou esofágica	25	52,1
Pneumocistose	8	16,7
Tuberculose	8	16,7

Nota: ¹Outros incluem lavado brônquico (n = 2), escarro, secreção orofaríngea, aspirado traqueal e aspirado de medula óssea (n = 1). ²Foram considerados como alteração da consciência: desorientação, confusão mental, rebaixamento do nível de consciência e coma. ³Foram considerados como alteração visual: turvação visual, diminuição da acuidade visual, fotofobia, diplopia e/ou amaurose.

Quanto à interpretação do hemograma, 44/48 (91,7%) dos pacientes estavam com anemia, 13/46 (28,3%) com leucopenia e 14/46 (30,4%) com plaquetopenia. Pancitopenia foi observada em 5/46 (10,9%) pacientes.

Foram analisados os parâmetros quimiocitológicos de 23 amostras de líquido céfalo-espinhal positivas para *Cryptococcus*. A citologia líquórica variou de 1 a 138 leucócitos/mm³. Em 14/23 (60,9%) amostras a contagem global de leucócitos foi menor ou igual a 5 leucócitos/mm³. Destes pacientes, 13/14 (92,8%) tinham HIV/Aids. Quanto à citologia diferencial, houve predomínio de células mononucleares (5/6; 83,3%). A glicorraquia e a

proteínoorraquia variaram de 6 a 77mg/dL e de 14,7 a 255,9mg/dL, respectivamente (Tabela 4).

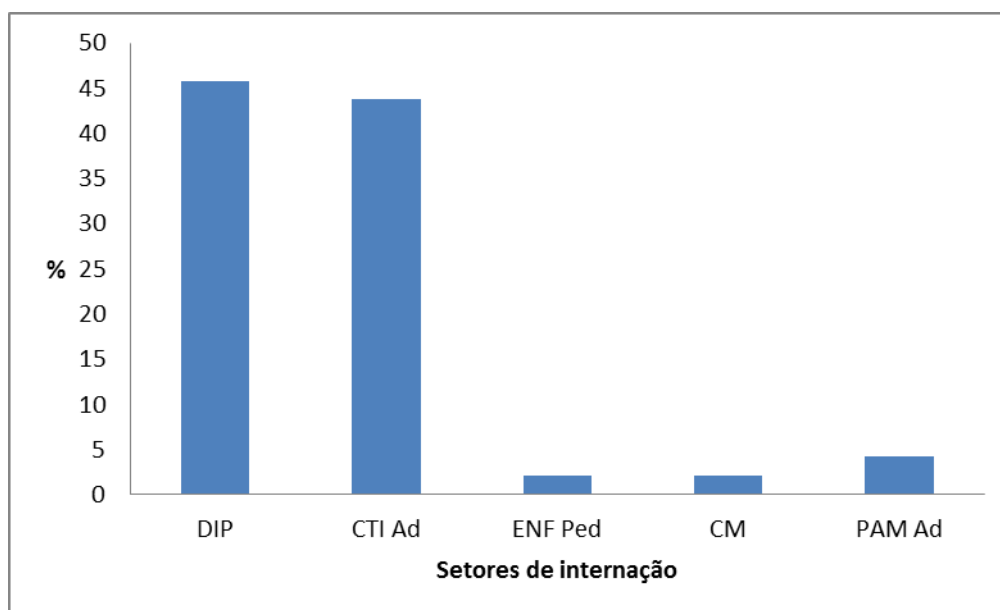
Tabela 4 - Citologia global e análise bioquímica do líquido céfalo-espinhal de pacientes com criptococemia, HU/UFMS - julho 1998-2012 (n = 23)

Parâmetros	Nº.	%
Leucócitos		
≤ 5/mm ³	14	60,9
> 5/mm ³	9	39,1
Glicose		
< 50mg/dL	15	65,2
≥ 50mg/dL	8	34,8
Proteínas totais		
≤ 50mg/dL	7	30,4
> 50mg/dL	16	69,6

Os pacientes com criptococemia estiveram internados em diversos setores do Hospital Universitário: 22 (45,8%) na enfermaria de doenças infecciosas e parasitárias (DIP), 21 (43,8%) no centro de tratamento intensivo (CTI) adulto, um (2,1%) na clínica médica (CM) e um (2,1%) na enfermaria pediátrica (ENF Ped). Três (6,3%) estiveram somente no pronto atendimento médico (PAM) adulto (Figura 12).

O tempo de internação variou de 1 a 82 dias, com mediana de 16 dias.

Figura 12 - Setores de internação dos pacientes com criptococemia, HU/UFMS - julho 1998-2012 (n = 48)



Legenda: DIP: Doenças Infecciosas e Parasitárias. CTI Ad: Centro de Tratamento Intensivo Adulto. ENF Ped: Enfermaria Pediátrica. CM: Clínica Médica. PAM Ad: Pronto Atendimento Médico Adulto.

Trinta e oito (79,2%) pacientes receberam tratamento antifúngico. Destes, 68,4% foram a óbito (Tabela 5). Doze (31,6%) pacientes foram tratados com anfotericina B isolada, três (7,9%) somente com fluconazol e 22 (57,9%) com anfotericina B e fluconazol. Um (2,6%) paciente foi tratado com anfotericina B, fluconazol e itraconazol.

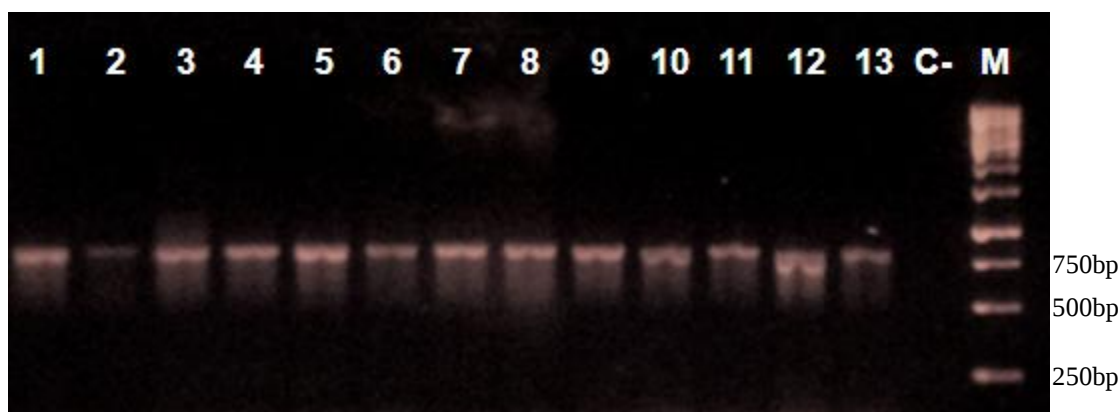
Quanto à evolução clínica dos 48 pacientes estudados, 35 (72,9%) foram a óbito. Destes, 26 (66,7%) tinham HIV/Aids. Os quatro pacientes HIV negativos e os cinco pacientes com sorologia desconhecida para o HIV foram a óbito (100%). Os treze (33,3%) pacientes que receberam alta hospitalar tinham HIV/Aids (Tabela 5).

Tabela 5 - Número e porcentagem dos pacientes com criptococemia segundo a infecção pelo HIV, tratamento antifúngico e evolução clínica, HU/UFMS - julho 1998-2012 (n = 48)

Variáveis	Evolução clínica			
	Óbito (n = 35)		Alta (n = 13)	
	Nº.	%	Nº.	%
HIV/Aids				
Positivo	26	66,7	13	33,3
Negativo	4	100,0	-	-
Desconhecido	5	100,0	-	-
Tratamento com antifúngico				
Sim	26	68,4	12	31,6
Não	9	100,0	-	-
Desconhecido	-	-	1	100,0

A reação de PCR amplificou o gene *URA5* (≈ 750 bp) de *Cryptococcus* isolados de hemocultura, como ilustra a figura 13.

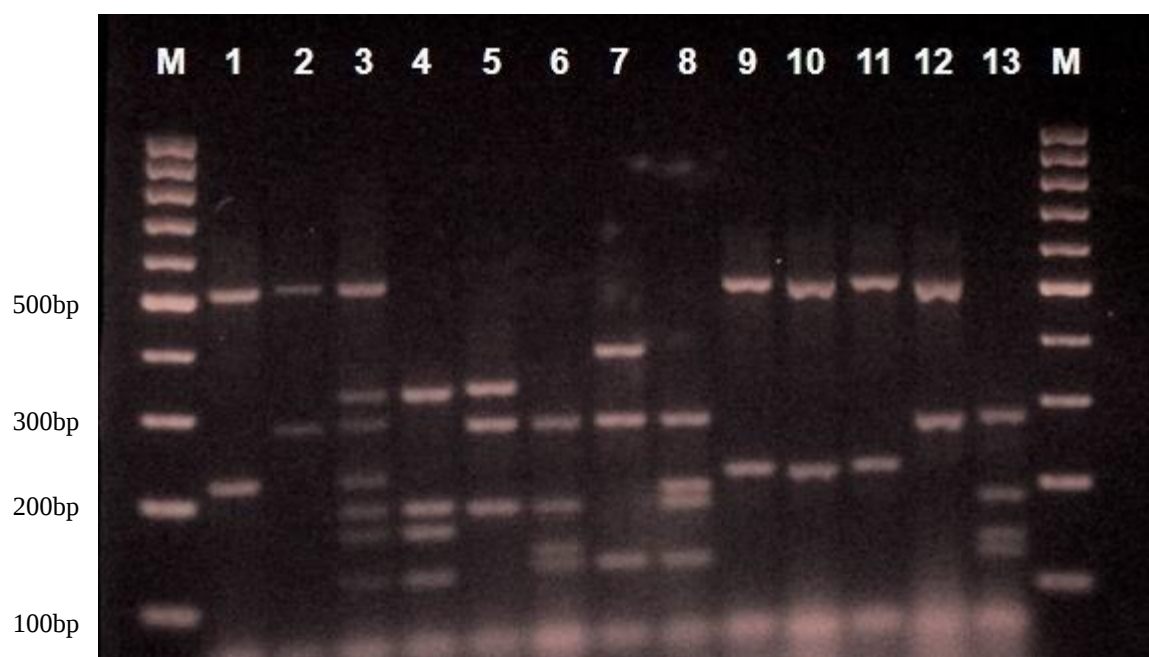
Figura 13 - Perfil representativo de amplificação do gene *URA5* de *Cryptococcus* isolados de hemocultivos



Legenda: M: marcador de peso molecular (1kb), 1 a 8: padrões moleculares (VNI, VNII, VNIII, VNIV, VGI, VGII, VGIII, VGIV), 9 a 13: DNA de *Cryptococcus* isolados de hemocultivos (amostras 1 a 5), C-: controle negativo.

A análise dos fragmentos de DNA gerados pela técnica de RFLP-*URA5* revelou os tipos moleculares *C. neoformans* VNI (45/48; 93,7%) e VNII (2/48; 4,2%) e *C. gattii* VGII (1/48; 2,1%), cujos perfis moleculares estão ilustrados na figura 14.

Figura 14 - Perfil representativo de RFLP-*URA5* de *Cryptococcus* após digestão com enzimas de restrição *HhaI* e *Sau96I*



Legenda: M: marcador de peso molecular (100bp), 1 a 8: padrões moleculares (VNI, VNII, VNIII, VNIV, VGI, VGII, VGIII, VGIV), 9 a 13: *Cryptococcus* dos tipos moleculares VNI (9-11), VNII (12) e VGII (13) isolados de hemocultivos.

Na tabela 6 estão apresentadas as variações das CIMs, CIM50%, CIM90% e a média geométrica para fluconazol, itraconazol, voriconazol e anfotericina B contra *Cryptococcus*.

Tabela 6 - Variação da concentração inibitória mínima (CIM) dos antifúngicos testados, HU/UFMS - julho 1998-2012 (n = 48)

Antifúngicos	CIM (µg/mL)			
	Variação	50%	90%	Média geométrica
Fluconazol	0,25-4,0	2,0	2,0	1,4768
Itraconazol	0,015-0,5	0,06	0,125	0,0653
Voriconazol	0,015-0,06	0,03	0,06	0,0279
Anfotericina B	0,125-1,0	0,25	0,5	0,3536

Todos os isolados de *Cryptococcus* provenientes de hemocultivos mostraram-se sensíveis aos antifúngicos testados.

A figura 15 resume as principais características dos pacientes com criptococcemia e apresenta as espécies e os tipos moleculares dos *Cryptococcus* spp. isolados de hemocultivos no HU/UFMS no período de julho 1998 a julho 2012.

Figura 15 - Características de 48 pacientes com criptococemia e tipagem molecular dos *Cryptococcus* spp. isolados de hemocultivos, HU/UFMS - julho 1998-2012

N.º AMOSTRA	IDADE (ANOS)	SEXO	SETOR DE INTERNAÇÃO	ESPÉCIMES CLÍNICAS DE ISOLAMENTO	HIV/Aids	EVOLUÇÃO	ESPÉCIE	TIPO MOLECULAR
319H ₇₋₉₈	26	M	DIP	SG/LCE	Sim	Óbito	<i>C. neoformans</i>	VNI
221H ₁₂₋₉₈	40	M	CTI	SG	Sim	Óbito	<i>C. neoformans</i>	VNI
128H ₅₋₉₉	69	M	CTI	SG/LCE	Não	Óbito	<i>C. neoformans</i>	VNI
532H ₃₋₀₁	21	F	DIP	LCE/SG/UR	Sim	Óbito	<i>C. neoformans</i>	VNI
704H ₄₋₀₁	53	M	DIP	UR/LCE/SG	Não	Óbito	<i>C. neoformans</i>	VNI
449H ₁₀₋₀₁	30	F	PAM	SG	Sim	Óbito	<i>C. neoformans</i>	VNII
473H ₁₀₋₀₁	35	M	CTI	LCE/SG	Sim	Óbito	<i>C. neoformans</i>	VNII
0005H ₃₋₀₂	36	F	DIP	SG	Sim	Óbito	<i>C. neoformans</i>	VNI
287H ₄₋₀₂	40	M	CTI	SG/LCE	Sim	Óbito	<i>C. neoformans</i>	VNI
371H ₅₋₀₂	46	M	CTI	SG/LCE/LB	Sim	Óbito	<i>C. neoformans</i>	VNI
724H ₈₋₀₂	35	M	DIP	LCE/SG	Sim	Alta	<i>C. neoformans</i>	VNI
932H ₉₋₀₂	48	F	DIP	SG	Sim	Alta	<i>C. neoformans</i>	VNI
94H ₁₀₋₀₂	34	M	DIP	ESC/SG	Sim	Alta	<i>C. neoformans</i>	VNI
716H ₃₋₀₃	61	F	CTI	SG	Sim	Óbito	<i>C. neoformans</i>	VNI
851H ₄₋₀₃	25	F	CTI	SG	Sim	Óbito	<i>C. neoformans</i>	VNI
174H ₇₋₀₃	27	M	DIP	LB/SG	Sim	Alta	<i>C. neoformans</i>	VNI
178H ₆₋₀₃	23	F	CM	SG	Sim	Óbito	<i>C. neoformans</i>	VNI
751H ₁₀₋₀₃	37	M	CTI	SG	Sim	Óbito	<i>C. neoformans</i>	VNI
771H ₁₀₋₀₃	68	M	DIP	SG/LCE	Sim	Óbito	<i>C. neoformans</i>	VNI
206H ₁₀₋₀₄	61	M	CTI	SG/LCE	Não	Óbito	<i>C. neoformans</i>	VNI
721H ₈₋₀₆	30	M	CTI	AMO/SG	Sim	Óbito	<i>C. neoformans</i>	VNI
905H ₉₋₀₆	66	M	CTI	SG	Desconhecido	Óbito	<i>C. neoformans</i>	VNI
936H ₉₋₀₆	30	M	DIP	LCE/SG	Sim	Alta	<i>C. neoformans</i>	VNI
710H ₃₋₀₇	42	M	DIP	LCE/SG	Sim	Óbito	<i>C. neoformans</i>	VNI

Continuação

N.º AMOSTRA	IDADE (ANOS)	SEXO	SETOR DE INTERNAÇÃO	ESPÉCIMES CLÍNICAS DE ISOLAMENTO	HIV/Aids	EVOLUÇÃO	ESPÉCIE	TIPO MOLECULAR
735H ₃₋₀₇	48	M	DIP	SG	Sim	Alta	<i>C. neoformans</i>	VNI
781H ₃₋₀₇	10	M	ENFPED	LCE/SG	Sim	Óbito	<i>C. neoformans</i>	VNI
545H ₈₋₀₇	49	M	DIP	UR/LCE/SG	Sim	Alta	<i>C. neoformans</i>	VNI
947H ₁₁₋₀₇	37	M	CTI	LCE/UR/SG	Sim	Óbito	<i>C. neoformans</i>	VNI
948H ₁₁₋₀₇	22	M	DIP	SG/LCE	Sim	Alta	<i>C. neoformans</i>	VNI
175H ₁₋₀₈	28	M	DIP	LCE/SG	Sim	Óbito	<i>C. neoformans</i>	VNI
879H ₆₋₀₈	51	M	DIP	UR/LCE/SG	Sim	Óbito	<i>C. neoformans</i>	VNI
990H ₆₋₀₈	51	M	CTI	LCE/SG	Sim	Óbito	<i>C. neoformans</i>	VNI
265H ₈₋₀₈	28	M	DIP	LCE/SG	Sim	Alta	<i>C. neoformans</i>	VNI
961H ₂₋₀₉	33	M	CTI	LCE/SOR/AT/SG/UR	Sim	Óbito	<i>C. neoformans</i>	VNI
398H ₆₋₀₉	72	M	CTI	SG	Desconhecido	Óbito	<i>C. neoformans</i>	VNI
593H ₇₋₀₉	90	F	CTI	UR/SG	Desconhecido	Óbito	<i>C. gattii</i>	VGII
960H ₇₋₁₀	31	M	DIP	LCE/SG	Sim	Alta	<i>C. neoformans</i>	VNI
151H ₉₋₁₀	24	F	DIP	SG/LCE	Sim	Óbito	<i>C. neoformans</i>	VNI
120H ₁₁₋₁₀	41	M	CTI	SG	Sim	Óbito	<i>C. neoformans</i>	VNI
76H ₃₋₁₁	50	M	PAM	SG	Sim	Óbito	<i>C. neoformans</i>	VNI
113H ₃₋₁₁	57	F	CTI	SG	Desconhecido	Óbito	<i>C. neoformans</i>	VNI
104H ₃₋₁₁	33	F	DIP	SG/LCE	Sim	Alta	<i>C. neoformans</i>	VNI
04H ₈₋₁₁	47	M	CTI	SG	Sim	Óbito	<i>C. neoformans</i>	VNI
68H ₈₋₁₁	47	M	PAM	SG/UR	Sim	Óbito	<i>C. neoformans</i>	VNI
111H ₉₋₁₁	66	M	CTI	SG	Desconhecido	Óbito	<i>C. neoformans</i>	VNI
24H ₁₁₋₁₁	69	F	DIP	SG	Não	Óbito	<i>C. neoformans</i>	VNI
114H ₃₋₁₂	34	M	CTI	SG	Sim	Alta	<i>C. neoformans</i>	VNI
123H ₄₋₁₂	51	F	DIP	SG	Sim	Alta	<i>C. neoformans</i>	VNI

Legenda: SG: sangue; LCE: líquido céfalo-espinhal; UR: urina; LB: lavado brônquico; ESC: escarro; AMO: aspirado de medula óssea; SOR: secreção orofaríngea; AT: aspirado traqueal.

6 DISCUSSÃO

Após o advento da Aids, a criptococose tem se revelado uma micose sistêmica com crescente número de casos (JEAN *et al.*, 2002; ROZENBAUM; GONÇALVES, 1994). A infecção de corrente sanguínea por *Cryptococcus* merece destaque uma vez que geralmente evolui de maneira fatal, especialmente em pacientes com HIV/Aids (JEAN *et al.*, 2002; PASQUALOTTO *et al.*, 2004). As manifestações clínicas e os exames laboratoriais de rotina são inespecíficos e em muitos casos o diagnóstico é tardio.

Existem poucos trabalhos na literatura que descrevem somente casos de ICS por *Cryptococcus* (JEAN *et al.*, 2002; PASQUALOTTO *et al.*, 2004). Os estudos estão focados em candidemia ou em fungemia de modo geral (CÓRDOBA *et al.*, 2011; CORTÉS *et al.*, 2011; COUTO; MACEDO; NEVES, 2011; LAI; GAU; HSUEH, 2012; MORAL *et al.*, 2012). A escassez de dados sobre o tema em questão nos motivou a estudar os casos de ICS por leveduras do complexo *C. neoformans* buscando melhor compreensão sobre o quadro clínico-laboratorial dos pacientes com criptococemia, bem como de aspectos epidemiológicos da criptococose.

Criptococemia foi diagnosticada principalmente em pacientes adultos do sexo masculino (72,9%), corroborando com estudo prévio no mesmo hospital (LINDENBERG *et al.*, 2008) e estudo realizado por Jean *et al.*, (2002) em um Hospital Universitário de Taipei, Taiwan, no qual 78,8% dos casos foram diagnosticados em homens. A prevalência de criptococemia no sexo masculino também foi elevada (81,8%) no estudo de Monteiro *et al.*, (2011).

Somente uma criança de dez anos de idade, portadora do HIV, teve diagnóstico laboratorial de criptococemia. Estudo da Pasqualotto *et al.*, (2004), realizado no Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre, Brasil, entre abril de 1995 e novembro de 2002, também descreveu a infecção em apenas uma criança de sete anos de idade cuja doença de base era a Aids, num total de 28 casos de criptococemia estudados.

Dados da literatura revelam que a criptococose é menos prevalente em crianças com Aids do que na população adulta (ABADI *et al.*, 1999). Nas regiões norte e nordeste do Brasil têm sido descrito maior número de casos de criptococose em crianças (CORRÊA *et al.*, 1999; DARZÉ *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2008). Corrêa *et al.*, (1999) sugere em seu estudo que esse fato pode estar relacionado com a endemicidade da criptococose por *C. gattii* no estado do Pará.

Quando observada a faixa etária dos pacientes, criptococemia foi mais frequente no grupo de 35 a 49 anos de idade (31,3%), coincidindo com a faixa etária de maior incidência da Aids na região Centro-Oeste, que é de 35 a 39 anos (BRASIL, 2012a).

Nos Estados Unidos, a incidência anual da infecção criptocócica entre pessoas com HIV/Aids é estimada entre 2 e 7 casos/1.000 pessoas (*Centers for Disease Control and Prevention*, 2012). No Brasil, a criptococose ocorre como primeira manifestação oportunista em cerca de 4,4% dos pacientes com Aids, com prevalência estimada entre 8 e 12% na região Sudeste (BRASIL, 2012b).

Os pacientes com *Cryptococcus* no sangue eram procedentes das cidades de Campo Grande (62,5%) e de outras do interior do estado (37,5%), o que caracteriza a criptococose como uma micose autóctone no estado de Mato Grosso do Sul. Esses pacientes residiam em sua maioria em zona urbana, o que demonstra a perfeita adaptação do *Cryptococcus* nesse meio. Diante do exposto, acredita-se que a região Centro-Oeste do Brasil possui clima favorável para a multiplicação desse fungo.

Trabalhador rural foi a profissão ou ocupação habitual mais relatada nos prontuários dos pacientes. Como as espécies de *Cryptococcus* estão presentes na natureza, a atividade laboral no campo pode representar condição de risco para a infecção criptocócica.

A maioria dos pacientes (81,3%) que desenvolveu criptococemia tinha HIV/Aids, confirmando ser esta uma importante condição de risco para a infecção criptocócica, semelhante ao relatado por outros pesquisadores (PASQUALOTTO *et al.*, 2004; MONTEIRO *et al.*, 2011; MOREIRA *et al.*, 2006; ROZENBAUM; GONÇALVES, 1994).

Em seu estudo, Pasqualotto *et al.*, (2004) relataram que nos pacientes que desenvolveram criptococemia 89,3% tinha Aids. Em estudo multicêntrico na Argentina entre junho de 2007 e junho de 2008, Córdoba *et al.*, (2011) relataram que 81,2% dos pacientes com HIV/Aids desenvolveram infecção de corrente sanguínea por *C. neoformans*.

O isolamento de *Cryptococcus* a partir da corrente sanguínea não é um evento raro e tem sido descrito principalmente em pacientes com HIV/Aids.

Pinto Júnior *et al.*, (2006) estudaram retrospectivamente 70 pacientes HIV positivos com criptococose e identificaram *C. neoformans* em hemocultura em 58,8% dos casos de criptococose disseminada com meningite e em 46,2% sem invasão do SNC. Os autores observaram ainda que este agente pode estar presente na urina sem que o paciente apresente lesão evidente no trato urinário.

Trabalho realizado por Cortés *et al.*, (2011) em hospitais terciários na Colômbia entre 2001 e 2007 demonstrou que *C. neoformans* esteve em quarto lugar entre os fungos mais isolados do sangue.

Estudo retrospectivo realizado por Monteiro *et al.*, (2011) com 4336 hemoculturas de pacientes internados no hospital universitário de Santa Maria, Rio Grande do Sul, identificou *Cryptococcus* spp. em 11/37 (29,8%) das hemoculturas. Os autores concluíram que o hemocultivo é o melhor exame para diagnosticar laboratorialmente as fungemias.

Na Tailândia, entre janeiro de 2004 e junho de 2008, *Cryptococcus neoformans* foi o agente mais isolado da corrente sanguínea (30/140) de pacientes HIV positivos (KIERTIBURANAKUL *et al.*, 2012).

Outras condições predisponentes para a fungemia por *Cryptococcus* também tem sido relatadas. No estudo de Jean *et al.* (2002), além da síndrome da imunodeficiência adquirida (46%), os autores citam terapia imunossupressora (23%) e cirrose hepática descompensada (21%), como também observadas nos pacientes atendidos no HU/UFMS.

Elevado número de pacientes (96,0%) com linfócitos T CD4⁺ inferior a 100 células/mm³ encontrado na presente casuística demonstra um alto grau de imunocomprometimento, e consequentemente o sistema de defesa do organismo em restritas condições para combater a infecção. Estudo desenvolvido por Pasqualotto *et al.*, (2004) mostrou contagem de células CD4⁺ < 100 em 12/15 pacientes com Aids.

O número de células CD4⁺ é um importante marcador que permite o monitoramento da evolução da infecção pelo HIV. Quando presente em níveis reduzidos em pacientes com Aids, torna-se um fator predisponente para a criptococose e outras infecções oportunistas.

Entre os pacientes HIV negativos foram observadas condições clínicas incluindo hipertensão arterial, câncer, uso de corticóide por tempo prolongado, entre outras. Esse fato indica que pacientes sem HIV, mas com outras condições de imunocomprometimento também estão em risco de desenvolver a criptococose.

Entre as condições de risco para a criptococose em pacientes HIV negativos descritas citam-se: tratamento com droga imunossupressora (41%), lúpus eritematoso sistêmico (16%), malignidades (16%) e 14% de diabetes mellitus (KIERTIBURANAKUL *et al.*, 2006).

Moral *et al.*, (2012) ao estudar episódios de fungemia em 16 hospitais de Buenos Aires, Argentina descreveu que os pacientes HIV negativos com isolamento de *C. neoformans* em hemocultivos apresentavam doenças de base incluindo transplante renal (3 casos), lúpus

eritematoso sistêmico (2 casos), doenças onco-hematológicas (2 casos) e câncer de esôfago (1 caso).

Como já está bem estabelecido na literatura, *Cryptococcus* pode se disseminar via hematogênica para outros sítios, com especial tropismo pelo sistema nervoso central (CASADEVALL; PERFECT, 1998). Segundo estudo prévio, criptococemia normalmente precede a invasão do SNC e pode persistir por até 16 semanas apesar do tratamento (ROZENBAUM; GONÇALVES, 1994).

Na maioria dos pacientes com criptococemia foi observado o envolvimento do sistema nervoso central pelo aparecimento das manifestações neurológicas, sendo confirmado pelo isolamento de *Cryptococcus* também no líquido céfalo-espinhal em 50,0% dos pacientes. Esse dado está de acordo com outros autores que descrevem meningoencefalite como a principal apresentação clínica da criptococose (BICANIC; HARRISON, 2004; CASADEVALL; PERFECT, 1998; LINBENBERG *et al.*, 2008; ROZENBAUM; GONÇALVES, 1994).

O estudo de Jean *et al.*, (2002) relatou sintomas/sinais de meningite (cefaléia, alteração da consciência, rigidez de nuca, náusea ou vômito ou convulsões) em 50,0% dos pacientes com criptococemia. O envolvimento meníngeo foi confirmado pela cultura do líquido em 84,2% dos pacientes em que foi realizada a punção lombar.

Semelhante ao encontrado na presente investigação, o isolamento de *Cryptococcus* em outros sítios além do sangue também foi relatado no estudo da Pasqualotto *et al.*, (2004), sendo o líquido céfalo-espinhal o mais citado. No trabalho de Colom *et al.*, (2001) realizado em hospitais na Espanha em 1998 e 1999 foi relatado o isolamento simultâneo de *C. neoformans* no sangue e líquido céfalo-espinhal em muitos pacientes com fungemia.

As manifestações clínicas da infecção criptocócica além de inespecíficas (PINTO JÚNIOR *et al.*, 2006) estão relacionadas aos órgãos envolvidos, bem como ao estado imunológico do indivíduo (MORETTI *et al.*, 2008; TSUJI; BARBABOSA; RIVERA, 2005). O diagnóstico clínico de criptococemia é difícil, sendo necessário o diagnóstico laboratorial. Estudos prévios relatam que a hemocultura é um importante método de diagnóstico da criptococose em pacientes com Aids (ROZENBAUM; GONÇALVES, 1994).

Entre os pacientes com criptococemia, febre foi o sinal mais frequente. Apesar de inespecífico, tem sido descrito na literatura em vários relatos de casos (CHOI; CHOE; LEE, 1970; FUJITA *et al.*, 2005; ROCHA *et al.*, 2009; YEHIA *et al.*, 2009; ZAHARATOS; BEHR; LIBMAN, 2001). Sendo assim, a febre quando associada a outros sintomas

característicos de infecção de corrente sanguínea pode ser um alerta para a suspeição clínica da criptococemia.

Infecções fúngicas oportunistas são comuns em indivíduos imunocomprometidos. Entretanto, a presença simultânea de *Cryptococcus neoformans* e *Histoplasma capsulatum* no sangue, como observado em três pacientes na presente investigação, tem sido pouco descrita (ARONIS; SANTOS; GOLDANI, 2011).

Na presente pesquisa, os parâmetros quimiocitológicos do líquido mostraram em sua maioria hipoglicorraquia, hiperproteinorraquia e normalidade do número de leucócitos, com predomínio de linfócitos naqueles em que a contagem diferencial foi realizada. Os dados encontrados estão de acordo com a literatura e demonstram que nem sempre os parâmetros líquidos encontram-se alterados nos casos de infecção criptocócica no SNC (LINDENBERG *et al.*, 2008).

A gravidade do quadro clínico do paciente com criptococemia e a necessidade de cuidados intensivos foi evidenciada pela observação de que 43,8% dos pacientes estiveram internados no CTI adulto do Hospital Universitário.

Embora não se possa correlacionar a elevada letalidade observada (72,9%) diretamente com a infecção criptocócica, acredita-se que as infecções de corrente sanguínea por esse e outros micro-organismos oportunistas são graves e tendem a ser fatais, especialmente nos pacientes com HIV/Aids, com células $CD4^+ < 100$ e naqueles em que o tratamento antifúngico não é iniciado de imediato.

Corroborando com Pasqualotto *et al.*, (2004), acredita-se que a elevada letalidade encontrada se deve ao elevado número de pacientes com HIV/Aids (81,3%) bem como à gravidade dos mesmos, tendo em vista que a maioria apresentavam $CD4^+$ inferior a 100 células/mm³ (96,0%).

Um estudo realizado por Lindenberg *et al.*, (2008) com diversas amostras clínicas de pacientes com criptococose atendidos na mesma instituição hospitalar no período de janeiro de 1995 a dezembro de 2005 encontrou uma taxa de letalidade de 49,6%, dos quais 51% eram pacientes com HIV.

Nesta investigação, a letalidade observada foi maior do que a encontrada por Lindenberg *et al.*, (2008), provavelmente por ser infecção de corrente sanguínea uma apresentação clínica mais grave. Digno de nota foi a observação de maior letalidade entre os pacientes HIV negativos e os com sorologia desconhecida para o HIV (100,0%). Além da falta de suspeição clínica aliada ao diagnóstico tardio, esse fato pode ser decorrente da

presença de comorbidade associada à idade avançada que podem ter potencializado a gravidade do caso com desfecho fatal.

Sob esse aspecto, Jean *et al.*, (2002) refere que pacientes com criptococemia necessitam de diagnóstico precoce e de pronta terapia antifúngica, uma vez que correm alto risco de morte, dentro de 30 dias. Por isso, a suspeição clínica e a solicitação da hemocultura pelo clínico nas primeiras horas de admissão do paciente são de extrema importância no prognóstico do mesmo.

O diagnóstico tardio da criptococose, em especial da criptococemia implica em desfecho fatal. Diante disso, a pesquisa do antígeno criptocócico (CRAG) deveria fazer parte da triagem de rotina laboratorial, pois é facilmente realizada por meio de um teste diagnóstico rápido (*Cryptococcal Antigen Lateral Flow Assay*) em amostras de soro, líquido céfalo-espinhal ou urina. A utilização desse teste imunocromatográfico parece ser uma alternativa promissora, pois permite identificar precocemente pacientes em risco de desenvolver meningite criptocócica, especialmente em HIV positivos com contagem de células $CD4^+ \leq 100$ células/ μ L, possibilitando a realização de tratamento preventivo (JARVIS *et al.*, 2011; MCMULLAN *et al.*, 2012).

Segundo Pasqualotto *et al.*, (2004), a elevada mortalidade encontrada em seu estudo (41%) com pacientes com criptococemia pode ser justificada pelo elevado número de pacientes com Aids (89,3%).

Lai, Gau, Hsueh (2012) estudaram o significado clínico da infecção de corrente sanguínea em um hospital no norte de Taiwan. Os autores atribuíram duas razões para a alta taxa de mortalidade (75%) entre 12 pacientes com criptococemia: diagnóstico tardio em quatro pacientes e a maioria dos pacientes deste estudo tinha outras comorbidades, principalmente câncer.

Quanto às espécies isoladas, *C. neoformans* foi a mais prevalente (97,9%), corroborando com outros estudos nacionais (LINBENBERG *et al.*, 2008; OLIVEIRA, 2007; PASQUALOTTO *et al.*, 2004) e internacionais (CORTÉS *et al.*, 2011; LAI; GAU; HSUEH, 2012; MORAL *et al.*, 2012).

Oliveira (2007) realizou um estudo com 525 casos de fungemia, dos quais 14,6% corresponderam à criptococemia, sendo 93,5% por *C. neoformans*, 3,9% por *C. gattii* e 1,3% por outras espécies de *Cryptococcus*.

No estudo da Pasqualotto *et al.*, (2004), apenas dois isolados de *Cryptococcus* foram identificados como *C. gattii* entre 28 isolados de sangue estudados.

Já está bem estabelecido que o diagnóstico laboratorial padrão ouro para identificar o agente causal de infecções de corrente sanguínea é o hemocultivo. Entretanto, a utilização de técnicas moleculares abre novas perspectivas quanto ao conhecimento da epidemiologia, patogênese e tratamento das infecções fúngicas. Tais métodos podem permitir o diagnóstico rápido do agente, de modo sensível e específico, reduzindo a morbidade e mortalidade (CASALI *et al.*, 2001).

Na presente investigação, o tipo molecular VNI de *C. neoformans* foi o mais encontrado. Este é o mais descrito em todo o mundo, sendo o maior responsável pela infecção criptocócica nos pacientes com o HIV (FREIRE *et al.*, 2012; MEYER *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2008; TRILLES *et al.*, 2008).

De acordo com Meyer e Trilles (2010), *C. gattii* VGI e VGII foram responsáveis pela maioria das infecções em pacientes imunocompetentes no mundo. Chen *et al.*, (2008) ao estudarem isolados de *Cryptococcus* na China, observaram um padrão distinto de outros países no qual a maioria das infecções ocorridas em imunocompetentes teve como agente o VNI de *C. neoformans*.

Ao estudar a epidemiologia molecular de isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* das regiões brasileiras, Trilles *et al.*, (2008) relataram o tipo molecular VNI como o mais comumente encontrado no Brasil e o VGII como o agente mais prevalente em imunocompetentes nas regiões norte e nordeste do Brasil.

Na presente casuística, o único isolado da espécie *Cryptococcus gattii*, tipo molecular VGII, foi encontrado em paciente aborígene de 90 anos de idade, portador de diabetes mellitus. Considerando a prevalência de *C. gattii* em madeira em decomposição, acredita-se que esse paciente tenha adquirido a infecção na área rural onde residia.

Santos *et al.*, (2008) analisou 56 isolados de *Cryptococcus* de pacientes atendidos em hospital de Belém, Pará. De dois isolados de hemocultura foram identificados os tipos moleculares VGII e VNI.

No estado do Amazonas, *Cryptococcus* isolados de hemocultura foram identificados como *C. neoformans*, três (5,3%) do tipo molecular VNI e um (1,8%) do tipo VNII. O único isolado VNII do referido estudo foi obtido de um paciente HIV positivo, do sexo masculino de 36 anos de idade (FREIRE *et al.*, 2012).

Semelhante ao relatado por Freire *et al.*, (2012), na presente investigação, os dois isolados de *Cryptococcus* do tipo molecular VNII foram obtidos de um paciente do sexo masculino de 35 anos de idade e outro do sexo feminino de 30 anos, ambos HIV positivos.

Após levantamento feito em base de dados (PubMed) verificou-se que na literatura é incomum encontrar *C. neoformans* VNII como agente de infecção de corrente sanguínea, como observado neste estudo.

Similar ao observado em estudos anteriores na mesma região (GOMES, 2011; PASA, 2011), assim como a nível nacional (SOUZA *et al.*, 2005) e internacional (MLINARIC-MISSONI *et al.*, 2011), *C. neoformans* e *C. gattii* isolados no HU/UFMS mostram sensibilidade *in vitro* aos antifúngicos fluconazol, itraconazol, voriconazol e anfotericina B.

No estudo realizado por Silva *et al.*, (2008) com *Cryptococcus* isolados de amostras biológicas de 35 pacientes atendidos no Hospital Escola da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, os dois isolados de hemocultivo mostraram-se sensíveis aos antifúngicos testados (anfotericina B, fluconazol, itraconazol e cetoconazol).

Favalessa *et al.*, (2009) estudaram o perfil de suscetibilidade antifúngica de 37 isolados de *Cryptococcus* de amostras clínicas no estado de Mato Grosso. Os seis *C. neoformans* isolados de hemocultivo de pacientes HIV positivos também mostraram sensibilidade aos antifúngicos cetoconazol, fluconazol, itraconazol, voriconazol e anfotericina B. Os autores referem melhor atividade *in vitro* do voriconazol.

No presente estudo, não foram encontrados *Cryptococcus* resistentes aos antifúngicos testados. Embora pouco frequente, outros hospitais já descreveram resistência aos azóis (FAVALESSA *et al.*, 2009; FERNANDES *et al.*, 2003; MATOS *et al.*, 2012; MONDON *et al.*, 1999; PERKINS *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2008) e à anfotericina B em isolados provenientes de outros espécimes clínicos (DE BEDOUT *et al.*, 1999; FAVALESSA *et al.*, 2009; LOZANO-CHIU *et al.*, 1998; MATOS *et al.*, 2012; PERKINS *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2008). A emergência de *Cryptococcus* resistentes aos antifúngicos de uso corrente tem preocupado a classe médica devido à falência terapêutica.

Esse estudo se faz importante por realizar a descrição do perfil de suscetibilidade antifúngica e da epidemiologia molecular de *Cryptococcus* isolados de pacientes com infecção de corrente sanguínea na região Centro-Oeste do Brasil.

O estado de Mato Grosso do Sul pode ser considerado autóctone para a criptococose. Sendo assim, é de extrema importância dar continuidade às pesquisas com *Cryptococcus* spp. através do acompanhamento dos casos com a caracterização epidemiológica e a divulgação do perfil de suscetibilidade antifúngica.

7 CONCLUSÕES

De modo geral, criptococemia diagnosticada em pacientes atendidos em hospital público terciário de Mato Grosso do Sul, referência no tratamento de doenças infecto-parasitárias, ocorre com maior frequência em indivíduos adultos do sexo masculino e residentes em zona urbana. Todos os pacientes são procedentes do estado de Mato Grosso do Sul, principalmente da capital.

Criptococemia é incomum em pacientes pediátricos. Predomina na faixa etária de 35 a 49 anos de idade, dentro da qual se encontra a faixa etária (35 a 39 anos) com maior incidência de Aids na região Centro-Oeste.

Indivíduos imucomprometidos, principalmente com HIV/Aids e linfócitos T CD4⁺ inferior a 100 células/mm³ são mais suscetíveis à infecção de corrente sanguínea por *Cryptococcus*.

As doenças de base encontradas são HIV/Aids, diabetes mellitus e cirrose hepática.

Observa-se a disseminação de *Cryptococcus* para outros sítios via corrente sanguínea, em especial para o sistema nervoso central.

As manifestações clínicas mais descritas como febre, emagrecimento, vômito, tosse e cefaléia são inespecíficas ou devido a outras apresentações clínicas da criptococose.

A maioria dos pacientes tem outras coinfeções, principalmente HIV/Aids, candidíase oral e/ou esofágica, pneumocistose e tuberculose.

Infecção de corrente sanguínea por *Cryptococcus* é uma condição clínica grave. Grande parte dos pacientes necessita de internação em centro de tratamento intensivo.

A alta letalidade observada indica que as infecções de corrente sanguínea por *Cryptococcus* podem ser fatais, não só em HIV positivos, mas também em HIV negativos.

O agente mais isolado da hemocultura é *Cryptococcus neoformans*. Observa-se os tipos moleculares VGII de *C. gattii*, VNII de *C. neoformans* e predomínio de VNI de *C. neoformans* em hemocultivos no Hospital Universitário da UFMS, similar ao descrito na literatura mundial.

Os isolados de *Cryptococcus* mostram sensibilidade *in vitro* aos antifúngicos fluconazol, itraconazol, voriconazol e anfotericina B.

REFERÊNCIAS⁴

- ABADI, J.; NACHMAN, S.; KRESSEL, A. B.; PIROFSKI, L. Cryptococcosis in children with AIDS. **Clinical Infections Diseases**, v. 28, n. 2, p. 309-313, Feb. 1999.
- ALLER, A. I.; MARTIN-MAZUELOS, E.; LOZANO, F.; GOMEZ-MATEOS, J.; STEELE-MOORE, L.; HOLLYWAY, 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**, v. 44, n. 6, p. 1544-1548, June 2000.
- ARONIS, M. L.; SANTOS, R. P.; GOLDANI, L. Z. Disseminated *Histoplasma capsulatum* and *Cryptococcus neoformans* co-infection in pacientes with AIDS. **Mycopathologia**, v. 172, n. 3, p. 233-236, Sept. 2011.
- AYRES, M.; AYRES JÚNIOR, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. A. S. BioEstat[®] versão 5.3: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas. Belém: ONG Mamirauá, 2007.
- BENNETT, J. E.; KWON-CHUNG, K. J.; HOWARD, D. H. Epidemiologic differences among serotypes of *Cryptococcus neoformans*. **American Journal of Epidemiology**, v. 105, n. 6, p. 582-586, June 1977.
- BENNETT, J. E.; KWON-CHUNG, K. J.; THEODORE, T. S. Biochemical differences between serotypes of *Cryptococcus neoformans*. **Sabouraudia**, v. 16, n. 3, p. 167-174, Sept. 1978.
- BICANIC, T.; HARRISON, T. S. Cryptococcal meningitis. **British Medical Bulletin**, v. 72, n. 1, p. 99-118, Apr. 2004.
- BIVANCO, F. C.; MACHADO, C. D. S.; MARTINS, E. L. Criptococose cutânea. **Serviço de Dermatologia da Faculdade de Medicina do ABC**, v. 31, n. 2, p. 102-109, ago. 2006.
- BOEKHOUT, T.; THEELEN, B.; DIAZ, M.; FELL, J. W.; HOP, W. C.; ABELN, E. C.; DROMER, F.; MEYER, W. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology**, v. 147, n. 4, p. 891-907, Apr. 2001.
- BOEKHOUT, T.; VAN BELKUM, A.; LEENDERS, A. C. A. P.; VERBRUGH, H. A.; MUKAMURANGWA, P.; SWINNE, D.; SCHEFFERS, W. A. Molecular typing of *Cryptococcus neoformans*: taxonomic and epidemiological aspects. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, n. 2, p. 432-442, Apr. 1997.
- BOVERS, M.; HAGEN, F.; KURAMAE, E. E.; HOOGVELD, H. L.; DROMER, F.; ST-GERMAIN, G.; BOEKHOUT, T. AIDS patient death caused by novel *Cryptococcus neoformans* x *C. gattii* hybrid. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 7, p. 1105-1108, July 2008.

⁴Nota: Normas segundo ABNT (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS). NBR 6023: Informação e documentação: Referências: Elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim epidemiológico – Aids e DST**, ano VIII, n. 01. Brasília: Ministério da Saúde, 2012a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vigilância epidemiológica da criptococose**. Brasília: Ministério da Saúde, 2012b. (Documento preliminar)

CALLEJAS, A.; ORDOÑEZ, N.; RODRIGUEZ, M. C.; CASTAÑEDA, E. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, serotype C, from the environment in Colombia. **Medical Mycology**, v. 36, n. 5, p. 341-4, Oct. 1998.

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

CASALI, A. K.; GOULART, L.; ROSA E SILVA, L. K.; 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**, v. 3, n. 4, p. 405-415, June 2003.

CASALI, A. K.; STAATS, C. C.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. *Cryptococcus neoformans*. Aspectos moleculares e epidemiológicos. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, n. 20, p. 34-37, maio/jun. 2001.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC): Epi Info™ versão 3.5.1. Atlanta: CDC, 2008. Disponível em: <<http://wwwn.cdc.gov/epiinfo/>>. Acesso em: 23 jul. 2012.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Cryptococcosis**. Atlanta: CDC, 2012.

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

CHEN, J.; VARMA, A.; DIAZ, M. R.; LITVINTSEVA, A. P.; WOLLENBERG, K. K.; KWON-CHUNG, K. J. *Cryptococcus neoformans* strains and infection in apparently immunocompetent patients, China. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 5, p. 755-762, May 2008.

CHOI, H. Y.; CHOE, J. K.; LEE, Y. B. Hodgkin's disease complicated by cryptococcemia - one case report. **Yonsei Medical Journal**, v. 11, n. 2, p. 173-181, 1970.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: Approved Standard**. 3. ed. Wayne: Clinical Laboratory Standards Institute, 2008 (CLSI document M27-A3 and M27-S3).

COLOM, M. F.; FRASÉS, S.; FERRER, C.; MARTÍN-MAZUELOS, E.; MENDOZA, M. H.; RODRÍGUEZ, J. M. T.; QUINDÓS, G. Estudio epidemiológico de la criptococosis em España: primeros resultados. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 18, n. 3, p. 99-104, sept. 2001.

COLOMBO, A. L. Criptococose. In: CIMERMAN, S.; CIMERMAN, D. **Medicina Tropical**. Atheneu: São Paulo, 2003. cap. 46, p. 555-562.

CÓRDOBA, S.; VIVOT, W.; BOSCO-BORGEAT, M.; TAVERNA, C.; SZUSZ, W.; MURISENGO, O.; ISLA, G.; DAVEL, G.; AND THE RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE MICOLOGIA, ARGENTINA. Species distribution and susceptibility profile of yeasts isolated from blood cultures: results of a multicenter active laboratory-based surveillance study in Argentina. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 43, n. 3, p. 176-185, July/Sept. 2011.

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**, v. 32, n. 5, p. 505-508, set./out. 1999.

CORTÉS, J. A.; REYES, P.; GÓMEZ, C.; BUITRAGO, G.; LEAL, A. L.; GREBO Group. Fungal bloodstream infections in tertiary care hospitals in Colombia. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 28, n. 2, p. 74-78, Apr./June 2011.

COSTA, S. PSE.; LAZÉRA, M. S.; SANTOS, W. RA.; MORALES, B. P.; BEZERRA, C. CF.; NISHIKAWA, M. M.; BARBOSA, G. G.; TRILLES, L.; NASCIMENTO, J. LM.; WANKE, B. First isolation of *Cryptococcus gattii* molecular type VGII and *Cryptococcus neoformans* molecular type VNI from environmental sources in the city of Belém, Pará, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 4, p. 662-4, July 2009.

COUTO, F. M. M.; MACEDO, D. P. C.; NEVES, R. P. Fungemia in a university hospital: na epidemiological approach. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 6, p. 754-748, Nov./Dec. 2011.

DARZÉ, C.; LUCENA, R.; GOMES, I.; MELO, A. Características clínicas laboratoriais de 104 casos de meningoencefalite criptocócica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 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**, v. 16, n. 1, p. 36-39, 1999.

ELLIS, D. H.; PFEIFFER, T. J. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 7, p. 1642-1644, July 1990.

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**, v. 42, n. 6, p. 661-665, nov./dez. 2009.

FERNANDES, O. FL.; PASSOS, X. S.; SOUZA, L. KH.; MIRANDA, A. TB.; CERQUEIRA, C. H. PV.; SILVA, M. R. R. In vitro antifungal susceptibility characteristics of *Cryptococcus neoformans* varieties from AIDS patients in Goiânia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 6, p. 839-841, Sept. 2003.

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

FILIÚ, W. F. O.; WANKE, B.; AGÜENA, S. M.; VILELA, V. O.; MACEDO, R. C. L.; LAZÉRA, M. Cativeiro de aves como fonte de *Cryptococcus neoformans* na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 6, p. 591-595, nov./dez. 2002.

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**, v. 35, n. 9, p. 2243-2251, Sept. 1997.

FRANZOT, S. P.; SALKIN, I. F.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 838-840, Mar. 1999.

FREIRE, A. K. L.; BENTES, A. S.; SAMPAIO, I. L.; MATSUURA, A. B. J.; OGUSKU, M. M.; SALEM, J. I.; WANKE, B.; SOUZA, J. V. B. Molecular characterisation of the causative agents of cryptococcosis in patients of a tertiary healthcare facility in the state of Amazonas-Brazil. **Mycoses**, v. 55, n. 3, p. e-145-e-150, May 2012.

FUJITA, Y.; KASAHARA, K.; UNO, K.; KONISHI, M.; MAEDA, K.; YOSHIMOTO, E.; MURAKAWA, K.; MIKASA, K.; AMANO, I.; MORII, T.; KIMURA, H. Amphotericin B-induced nephrogenic diabetes insipidus in a case of cryptococemia. **Internal Medicine**, v. 44, n. 5, p. 458-461, May 2005.

GOMES, M. S. **Criptococose em hospital de referência em Mato Grosso do Sul: caracterização epidemiológica, fenotípica e genética**. 2011. 86 f. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas e Parasitárias) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul/UFMS, Campo Grande, 2011.

JARVIS, J. N.; HARRISON, T. S.; GOVENDER, N.; LAWN, S. D.; LONGLEY, N.; BICANIC, T.; MAARTENS, G.; VENTER, F.; BEKKER, LG.; WOOD, R.; MEINTJES, G. Routine cryptococcal antigen screening for HIV-infected patients with low CD4+ T-lymphocyte counts--time to implement in South Africa?. **South African Medical Journal**, v. 101, n. 4, p. 232-234, Apr. 2011.

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. **Quartely Journal of Medicine**, v. 95, n. 8, p. 511-518, Aug. 2002.

KIDD, S. E.; HAGEN, F.; TSCHARKE, R. L.; HUYNH, M.; BARTLETT, K. H.; FYFE, M. 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 of the United States of America**, v. 101, n. 49, p. 17258-17263, Dec. 2004.

KIERTIBURANAKUL, S.; WATCHARATIPAGORN, S.; CHONGTRAKOOL, P.; SANTANIRAND, P. Epidemiology of bloodstream infections and predictive factors of mortality among HIV-infected adult patients in Thailand in the era of highly active antiretroviral therapy. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 65, n. 1, p. 28-32, 2012.

KIERTIBURANAKUL, S.; WIROJTANANUGOON, S.; PRACHARKTAM, R.; SUNGKANUPARPH, S. Cryptococcosis in human immunodeficiency virus-negative patients. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 10, n. 1, p. 72-78, Jan. 2006.

KUROKAWA, C. S.; SUGIZAKI, M. F.; PERAÇOLI, M. T. Virulence factors in fungi of systemic mycoses. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 40, n. 3, p. 125-135, May/June 1998.

KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. Cryptococcosis. In: KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. **Medical Mycology**. Philadelphia: Lea &Febiger, 1992. cap. 16, p. 397-446.

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

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

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. Criptococose. In: LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. **Tratado de Micologia Médica**. 9. ed. Sarvier: São Paulo, 2002. cap. 17, p. 416-440.

LAI, C. C.; GAU, S. J.; HSUEH, P. R. Fungemia caused by non-*Candida* species. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 45, n. 3, p. 262-263, June 2012.

LAZÉRA, M. S.; CAVALCANTI, M. A. S.; TRILLES, L.; NISHIKAWA, M. M.; WANKE, B. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* – evidence for a natural habitat related to decaying wood in a pottery tree hollow. **Medical Micology**, v. 36, n. 2, p. 119-122, Apr. 1998.

LAZÉRA, M. S.; PIRES, F.D.; CAMILLO-COURA, L.; NISHIKAWA, M. M.; BEZERRA, C. C.; TRILLES, L.; WANKE, B. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in decaying wood forming hollows in living trees. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 34, n. 2, p. 127-131, Mar./Apr. 1996.

LAZÉRA, M. S.; WANKE, B.; NISHIKAWA, M. M. Isolation of both varieties of *Cryptococcus neoformans* from saprophytic sources in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Medical Mycology**, v. 31, n. 6, p. 449-454, 1993.

LEAL, A. L.; FAGANELLO, J.; FUENTEFRIA, A. M.; BOLDO, J. T.; BASSANESI, M. C.; VAINSTEIN, M. H. Epidemiological profile of cryptococcal meningitis patients in Rio Grande do Sul, Brazil. **Mycopathologia**, v. 166, n. 2, p. 71-75, Aug. 2008.

LEVINSON, W.; JAWETZ, E. Micoses oportunistas. In: LEVINSON, W.; JAWETZ, E. **Microbiologia Médica e Imunologia**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. cap. 50, p. 320-323.

LIAW, S. J.; WU, H. C.; HSUEH, P. R. Microbiological characteristics of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* in Taiwan: serotypes, mating types, molecular types, virulence factors, and antifungal susceptibility. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, n. 6, p. 696-703, Jun. 2010.

LIN, X.; HEITMAN, J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. **Annual Review of Microbiology**, v. 60, p. 69-105, May 2006.

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 cryptococcosis in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 50, n. 2, p. 75-78, Mar./Apr. 2008.

LÓPEZ-MARTÍNEZ, R.; CASTAÑÓN-OLIVARES, L. R. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* from bird droppings, fruits and vegetables in Mexico City. **Mycopathologia**, v. 129, n. 1, p. 25-28, 1995.

LOZANO-CHIU, M.; PAETZNICK, V. L.; GHANNOUM, M. A.; REX, J. H. Detection of resistance to amphotericin B among *Cryptococcus neoformans* clinical isolates: performances of three different media assessed by using E-Test and National Committee for Clinical Laboratory Standards M27-A Methodologies. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 10, p. 2817-2822, Oct. 1998.

MATOS, C. S.; ANDRADE, A. S.; OLIVEIRA, N. S.; BARROS, T. F. Microbiological characteristics of clinical isolates of *Cryptococcus* spp. in Bahia, Brazil: molecular types and antifungal susceptibilities. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 31, n. 7, p. 1647-1652, July 2012.

MARTINS, M. A.; PAPPALARDO, M. C.; MELHEM, M. S.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. Molecular diversity of serial *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients in the city of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 7, p. 777-784, Nov. 2007.

MARTINS, L. M. S.; WANKE, B.; LAZÉRA, M. S.; TRILLES, L.; BARBOSA, G. G.; MACEDO, R. C. L.; CAVALCANTI, M. A. S.; EULÁLIO, K. D.; CASTRO, J. A. F.; SILVA, A. S.; NASCIMENTO, F. F.; GOUVEIA, V. A.; MONTE, S. J. H. Genotypes of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* as agents of endemic cryptococcosis in Teresina, Piauí (northeastern Brazil). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 6, p. 725-730, Sept. 2011.

MCMULLAN, B. J.; HALLIDAY, C.; SORRELL, T. C.; JUDD, D.; SLEIMAN, S.; MARRIOTT, D.; OLMA, T.; CHEN, S. C. A. Clinical utility of the cryptococcal antigen lateral flow assay in a diagnostic mycology laboratory. **PLOS ONE**, v. 7, n. 11, p. e49541, Nov. 2012.

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

MEYER, W.; MARSZEWSKA, K.; AMIRMOSTOFIAN, 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, June 1999.

MEYER, W.; TRILLES, L. Genotyping of the *Cryptococcus neoformans*/*C. gattii* species complex. **Australian Biochemist**, v. 41, n. 1, p. 11-15, Apr. 2010.

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

MLINARIC-MISSONI, E.; HAGEN, F.; CHEW, W. H. M.; VAZIC-BABIC, V.; BOEKHOUT, T.; BEGOVAC, J. *In vitro* antifungal susceptibilities and molecular typing of sequentially isolated clinical *Cryptococcus neoformans* strains from Croatia. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, n. 10, p. 1487-1495, May 2011.

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**, v. 43, n. 8, p. 1856-1861, Aug. 1999.

MONTEIRO, D. U.; BRUM, T. F.; NOAL, C. B.; RIGHI, R. A.; SANTOS, E. R.; OLIVEIRA, L. T. O.; LA RUE, M. L. Prevalência de *Candida* e *Cryptococcus* em hemoculturas oriundas de pacientes do Hospital Universitário de Santa Maria, RS (HUSM) no ano de 2006. **Saúde (Santa Maria)**, v. 37, n. 2, p. 81-88, 2011.

MORAL, L. L.; TIRABOSCHI, I. N.; SCHIJMAN, M.; BIANCHI, M.; GUELFAND, L.; CATALDI, S.; E INTEGRANTES DE LA RED DE MICOLOGÍA DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES. Fungemias em hospitales de la ciudad de Buenos Aires, Argentina. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 29, n. 3, p. 144-149, 2012.

MOREIRA, T. A.; FERREIRA, M. S.; RIBAS, R. M.; BORGES, A. S. Criptococose: estudo clínico-epidemiológico, laboratorial e das variedades do fungo em 96 pacientes. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 255-258, maio/jun. 2006.

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

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. Micoses oportunistas. In: MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 5. ed. Elsevier: Rio de Janeiro, 2006a. cap. 75, p. 759-780.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. Agentes antifúngicos. In: MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 5. ed. Elsevier: Rio de Janeiro, 2006b. cap. 70, p. 703-714.

OLIVEIRA, F. M. **Avaliação clínica da fungemia detectada pelo sistema de hemocultivo por lise-centrifugação (Isolator®). Treze anos de experiência, 1994-2007**. 2007. 65 f. Tese (Doutorado em Ciências Pneumológicas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul/UFRS, Porto Alegre, 2007.

OLIVEIRA, J. F.; GRECO, D. B.; OLIVEIRA, G. C.; CHRISTO, P. P.; GUIMARÃES, M. D.; OLIVEIRA, R. C. Neurological disease in HIV-infected patients in the era of highly active antiretroviral treatment: a Brazilian experience. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 2, p. 146-51, Mar./Apr. 2006.

OSUNA, A.; CARRAGOSO, A.; LEMOS, A.; MOCHO, M. L.; GASPAR, O. Criptococose: caso clínico. **Acta Médica Portuguesa**, v. 21, n. 3, p. 307-313, 2008.

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

PASA, C. R.; CHANG, M. R.; HANS-FILHO, G. Post-trauma primary cutaneous cryptococcosis in an immunocompetent host by *Cryptococcus gattii* VGII. **Mycoses**, v. 55, n. 2, p. e1-e3, Mar. 2012.

PASQUALOTTO, A. C.; SEVERO, C. B.; OLIVEIRA, F. M.; SEVERO, L. C. Cryptococemia: an analysis of 28 cases with emphasis on the clinical outcome and its etiologic agent. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 21, n. 2, p. 143-146, Sept. 2004.

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 Diseases**, v. 50, n. 3, p. 291-322, Feb. 2010.

PERKINS, A.; GOMEZ-LOPEZ, A.; MELLADO, E.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; CUENCA-ESTRELLA, M. Rates of antifungal resistance among Spanish clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, n. 6, p. 1144-1147, Dec. 2005.

PINTO JÚNIOR, 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**, v. 39, n.2, p. 230-232, mar./abr. 2006.

REOLON, A.; PEREZ, L. R. R.; MEZZARI, A. Prevalência de *Cryptococcus neoformans* nos pombos urbanos da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, n. 5, p. 293-298, out. 2004.

ROCHA, A. M.; PIRES, C. E.; BROWN, E.; WERNECK, L. D.; GODINHO, M. V.; ZANIER, J. F. Criptococose disseminada. **Aspectos práticos em Pneumologia**, v. 18, n. 3, p. 161-163, set. 2009.

ROZENBAUM, R.; GONÇALVES, A. J. R. Clinical epidemiological study of 171 cases of cryptococcosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 18, n. 3, p. 369-380, Mar. 1994.

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**, v. 103, n. 8, p. 813-818, Dec. 2008.

SILVA, R. M. G. Meningite por *Cryptococcus neoformans* como causa de febre prolongada em pacientes com Aids. Discussão de Caso. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 50, n. 2, p. 109-126, abr. 2004.

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**, v. 41, n. 2, p. 158-162, 2008.

SORRELL, T. C.; ELLIS, D.H. Ecology of *Cryptococcus neoformans*. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 14, n. 2, p. 42-43, June 1997.

SOUZA, L. K. H.; FERNANDES, O. F. L.; KOBAYASHI, C. C. B. A.; PASSOS, X. S.; COSTA, C. R.; LEMOS, J. A.; SOUZA-JÚNIOR, 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**, v. 47, n. 5, p. 253-256, Sept./Oct. 2005.

TRILLES, L.; FERNÁNDEZ-TORRES, B.; LAZÉRA, M. S.; WANKE, B.; GUARRO, J. In vitro antifungal susceptibility of *Cryptococcus gattii*, 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 the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 5, p. 455-462, Aug. 2008.

TSUJI, O. V.; BARBABOSA, I. M.; RIVERA, T. C. Criptococosis: historia natural y estado actual del tratamiento. **Acta Pediátrica de México**, v. 26, n. 1, p. 18-28, enero/fev. 2005.

XIA, R.; HU, Z.; SUN, Y.; CHEN, S.; GU, M.; ZHOU, Y.; HAN, Z.; ZHONG, R.; DENG, A.; WEN, H. Overexpression of β -arrestin 2 in peripheral blood mononuclear cells of patients with cryptococcal meningitis. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 30, n. 3, p. 155-161, Mar. 2010.

YEHIA, B. R.; EBERLEIN, M.; SISSON, S. D.; HAGER, D. N. Disseminated cryptococcosis with meningitis, peritonitis, and cryptococcemia in a HIV-negative patient with cirrhosis: a case report. **Cases Journal**, v. 2, n. 170, p. 1-4, Oct. 2009.

YUCHONG, C.; FUBIN, C.; JIANGHAN, C.; FENGLIAN, W.; NAN, X.; MINGHUI, Y.; YALIN, S.; ZHIZHONG, Z. Cryptococcosis in China (1985-2010): review of cases from Chinese database. **Mycopathologia**, v. 173, n. 5-6, p. 329-35, June 2012.

ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Hematologia: fundamentos e prática**. 1. ed. Atheneu: São Paulo, 2004. cap.11, p. 103-113.

ZAHARATOS, G. J.; BEHR, M. A.; LIBMAN, M. D. Profound T-lymphocytopenia and cryptococcemia in a human immunodeficiency virus-seronegative patient with disseminated tuberculosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, n. 11, p. E125-8, Dec. 2001.

APÊNDICE A - FORMULÁRIO PARA COLETA DE DADOS EM PRONTUÁRIOS

Hospital Universitário/UFMS – Projeto Criptococcemia

N.º da amostra: _____

Data da coleta (microbiologia): ____/____/____

Registro HU:

Data da internação: ____/____/____

--	--	--	--	--	--	--	--

Setor: _____

Sexo: () M () F Data de nascimento: ____/____/____ Idade: _____ (na época da coleta)

Procedência (cidade/UF): _____ Área: () rural () urbana

Naturalidade (cidade/UF): _____ Profissão: _____

Infecção atual: _____

Antecedentes:

() Transplantes () Uso de drogas imunossupressoras () QT () Outros:

Manifestações clínicas:

() alteração da consciência () alteração visual () calafrios () cefaléia () convulsão
 () diarreia () dispnéia () dor abdominal () emagrecimento () febre () gânglios
 () náusea () rigidez de nuca () sepse () tosse () vômito () outras: _____

Doenças de base:

() Aids () diabetes () neoplasia () outras: _____

Coinfecção:

() HIV () histoplasmose () toxoplasmose () candidíase oral () hepatite
 () citomegalovirose () tuberculose () pneumocistose () outras: _____

HIV positivo: () Não () Sim

Contagem CD4: _____ Carga viral: _____

Hemocultivo:

Espécie isolada: _____ CGB: () Pos. () Neg.

Isolamento de *Cryptococcus* sp. em outras amostras clínicas:

() urocultura () líquido () aspirado traqueal () escarro () lavado brônquico
 () líquido pleural () aspirado de medula óssea () líquido ascítico () coprocultura
 outras: _____

Tratamento com antifúngicos:

() anfotericina B () fluconazol () anfotericina B e fluconazol () outros: _____

Hemograma:

Hemácias: _____ Hb: _____ Ht: _____ Plaquetas: _____

Leucócitos: _____ meta _____ bast _____ seg _____ eos _____ bas _____ linf _____ mon _____

() anemia () leucopenia () leucocitose () plaquetopenia

Parâmetros líquidos:

Citologia global: leucócitos _____ hemácias _____

Citologia diferencial: PMN _____% MN _____%

Bioquímica: Glicose _____ Proteínas _____ Cloretos _____ LDH _____

Exames de imagem:

Data: ____/____/____, RX: () tórax () crânio () abdômen,

() normal () alterado: _____

Data: ____/____/____, TC: () tórax () crânio () abdômen,

() normal () alterado: _____

Data: ____/____/____, US: () tórax () crânio () abdômen,

() normal () alterado: _____

Data: ____/____/____, Outros: _____

() normal () alterado: _____

Evolução: n.º dias de internação: _____ () alta () óbito, causas:

APÊNDICE B - PREPARO DAS SOLUÇÕES PARA GENOTIPAGEM

Tris-HCl 1M

Trizma [®] hydrochloride (Sigma, EUA).....	157,6g
Água milli-Q estéril.....	1000mL

Pesou-se o Trizma[®] hydrochloride em um béquer de 1000mL. Acrescentou-se 1000mL de água milli-Q estéril e homogeneizou-se com um bastão de vidro até dissolver completamente. Armazenou-se a solução em frasco de vidro âmbar à temperatura ambiente.

Tampão de lise

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

Os componentes SDS, EDTA e NaCl foram pesados em um béquer de 150mL. Adicionou-se 60mL de água milli-Q estéril e homogeneizou-se em banho-maria com um bastão de vidro. Em uma proveta de 100mL mediu-se 20 mL de Tris-HCl 1M e adicionou-se 60mL da solução de SDS, EDTA e NaCl. Em seguida, completou-se o volume para 100mL com água milli-Q estéril. Após despejar no béquer, homogeneizou-se essa solução em banho-maria até dissolver por completo. Utilizando uma seringa estéril, o tampão de lise foi filtrado em filtro Millex[®] estéril (0,22µm de poro). A solução foi armazenada em frasco de vidro âmbar à temperatura ambiente.

Tampão TBE 10X

Ácido bórico (USB, EUA).....	55 g
Tris base (Promega, EUA).....	108 g
EDTA (Sigma, EUA).....	7,44 g
Água milli-Q estéril q.s.p.....	1000 mL

Os componentes ácido bórico, tris base e EDTA foram pesados individualmente. Em um béquer de 1000mL colocou-se 400mL de água milli-Q estéril e acrescentou-se o ácido bórico aos poucos, dissolvendo com bastão de vidro e em banho-maria. Após a completa dissolução do ácido bórico, acrescentou-se o tris base aos poucos, dissolvendo com o bastão de vidro. Em seguida, o EDTA também foi adicionado aos poucos, dissolvendo com bastão de vidro e em banho-maria. Após total dissolução, o volume foi completado para 1000mL com água milli-Q estéril e depois de homogeneizado, acondicionou-se o tampão em um frasco de vidro âmbar na geladeira.

Tampão TBE 1X

Tampão TBE 10X.....	100 mL
Água milli-Q estéril q.s.p.....	1000 mL

Em uma proveta de 1000mL, colocou-se 100mL do tampão TBE 10X e completou-se o volume para 1000mL com água milli-Q estéril. O tampão foi armazenado em frasco de vidro âmbar e conservado em geladeira.

APÊNDICE C - TIPO MOLECULAR E CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DE *CRYPTOCOCCUS* SPP. ISOLADOS DE HEMOCULTIVOS, HU/UFMS - julho 1998-2012 (n = 48)

Ano	N.º da amostra	RG	Espécie	Tipo molecular	CIM (µg/mL)			
					FLC	ITC	VRC	AMB
1998	319H ₇	280642	<i>C. neoformans</i>	VNI	2,0	0,06	0,03	0,25
1998	221H ₁₂	440739	<i>C. neoformans</i>	VNI	1,0	0,06	0,03	0,25
1999	128H ₅	447222	<i>C. neoformans</i>	VNI	2,0	0,06	0,03	0,25
2001	532H ₃	438059	<i>C. neoformans</i>	VNI	2,0	0,06	0,03	0,25
2001	704H ₄	480022	<i>C. neoformans</i>	VNI	0,5	0,06	0,03	0,5
2001	449H ₁₀	273052	<i>C. neoformans</i>	VNII	0,5	0,015	0,015	0,5
2001	473H ₁₀	484974	<i>C. neoformans</i>	VNII	0,25	0,015	0,015	0,5
2002	0005H ₃	489984	<i>C. neoformans</i>	VNI	4,0	0,125	0,06	0,25
2002	287H ₄	159814	<i>C. neoformans</i>	VNI	4,0	0,06	0,06	0,25
2002	371H ₅	495769	<i>C. neoformans</i>	VNI	1,0	0,06	0,03	0,5
2002	724H ₈	225800	<i>C. neoformans</i>	VNI	2,0	0,06	0,03	0,25
2002	932H ₉	61573	<i>C. neoformans</i>	VNI	1,0	0,06	0,015	0,5
2002	94H ₁₀	504795	<i>C. neoformans</i>	VNI	2,0	0,06	0,06	0,25
2003	716H ₃	511353	<i>C. neoformans</i>	VNI	2,0	0,03	0,03	0,5
2003	851H ₄	512411	<i>C. neoformans</i>	VNI	2,0	0,06	0,06	0,5
2003	174H ₇	422082	<i>C. neoformans</i>	VNI	2,0	0,125	0,06	0,25
2003	178H ₆	514990	<i>C. neoformans</i>	VNI	1,0	0,06	0,03	0,125
2003	751H ₁₀	516988	<i>C. neoformans</i>	VNI	2,0	0,06	0,015	0,25
2003	771H ₁₀	515967	<i>C. neoformans</i>	VNI	1,0	0,06	0,03	0,25
2004	206H ₁₀	528632	<i>C. neoformans</i>	VNI	2,0	0,06	0,03	0,25
2006	721H ₈	552314	<i>C. neoformans</i>	VNI	2,0	0,06	0,03	0,25
2006	905H ₉	553935	<i>C. neoformans</i>	VNI	1,0	0,06	0,015	0,25
2006	936H ₉	132566	<i>C. neoformans</i>	VNI	1,0	0,03	0,015	0,5
2007	710H ₃	551500	<i>C. neoformans</i>	VNI	2,0	0,125	0,03	0,5
2007	735H ₃	558821	<i>C. neoformans</i>	VNI	2,0	0,06	0,03	0,5
2007	781H ₃	561139	<i>C. neoformans</i>	VNI	1,0	0,03	0,06	0,25
2007	545H ₈	388811	<i>C. neoformans</i>	VNI	2,0	0,125	0,03	1,0
2007	947H ₁₁	568309	<i>C. neoformans</i>	VNI	1,0	0,06	0,015	0,25
2007	948H ₁₁	570525	<i>C. neoformans</i>	VNI	1,0	0,125	0,03	1,0
2008	175H ₁	237465	<i>C. neoformans</i>	VNI	2,0	0,06	0,03	0,25
2008	879H ₆	577726	<i>C. neoformans</i>	VNI	2,0	0,015	0,03	0,25
2008	990H ₆	692395	<i>C. neoformans</i>	VNI	2,0	0,06	0,03	0,5
2008	265H ₈	372341	<i>C. neoformans</i>	VNI	1,0	0,03	0,015	0,25
2009	961H ₂	586599	<i>C. neoformans</i>	VNI	1,0	0,125	0,03	0,5
2009	398H ₆	414332	<i>C. neoformans</i>	VNI	2,0	0,125	0,03	1,0
2009	593H ₇	595476	<i>C. gattii</i>	VGII	4,0	0,5	0,06	0,5
2010	960H ₇	560949	<i>C. neoformans</i>	VNI	2,0	0,06	0,03	0,5
2010	151H ₉	259468	<i>C. neoformans</i>	VNI	1,0	0,06	0,015	0,25
2010	120H ₁₁	516488	<i>C. neoformans</i>	VNI	2,0	0,06	0,03	0,25
2011	76H ₃	652151	<i>C. neoformans</i>	VNI	1,0	0,125	0,03	0,5
2011	113H ₃	582448	<i>C. neoformans</i>	VNI	1,0	0,125	0,03	0,25
2011	104H ₃	654659	<i>C. neoformans</i>	VNI	1,0	0,125	0,015	0,25

Continuação

Ano	N.º da amostra	RG	Espécie	Tipo molecular	CIM (µg/mL)			
					FLC	ITC	VRC	AMB
2011	04H ₈	659989	<i>C. neoformans</i>	VNI	2,0	0,06	0,03	0,25
2011	68H ₈	660291	<i>C. neoformans</i>	VNI	4,0	0,06	0,03	0,5
2011	111H ₉	528484	<i>C. neoformans</i>	VNI	2,0	0,125	0,015	0,5
2011	24H ₁₁	663011	<i>C. neoformans</i>	VNI	2,0	0,125	0,03	0,25
2012	114H ₃	666018	<i>C. neoformans</i>	VNI	2,0	0,125	0,03	0,5
2012	123H ₄	668110	<i>C. neoformans</i>	VNI	0,5	0,03	0,015	0,5

Legenda: FLC: fluconazol; ITC: itraconazol; VRC: voriconazol; AMB: anfotericina B.

**ANEXO A - CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA
UFMS**



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



Carta de Aprovação

O protocolo nº 2163 CAAE 0256.0.049.000-11 da Pesquisadora Rosianne Assis de Sousa Tsujisaki, intitulado “*Caracterização clínica, tipagem molecular e determinação da suscetibilidade antifúngica de casos de criptococcemia*”, e o seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foram revisados por este comitê e aprovados em reunião ordinária no dia 27 de outubro de 2011, encontrando-se de acordo com as resoluções normativas do Ministério da Saúde.

Edílson dos Reis

Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS

Campo Grande, 27 de outubro de 2011.

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

