

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Medicina Tropical

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS
AGENTES DA CRIPTOCOCOSE EM POEIRA DOMICILIAR EM
BAIRROS DE SANTA ISABEL DO RIO NEGRO NO ESTADO
DO AMAZONAS**

FABIO BRITO DOS SANTOS

**Rio de Janeiro
2013**

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Medicina Tropical

FABIO BRITO DOS SANTOS

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS AGENTES DA
CRIPTOCOCOSE EM POEIRA DOMICILIAR EM BAIROS DE SANTA ISABEL DO RIO
NEGRO NO ESTADO DO AMAZONAS**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como
parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Orientadores: Prof. Dr^a. Márcia dos Santos Lazéra
Prof. Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa

RIO DE JANEIRO

2013

Brito dos Santos, Fabio .

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS AGENTES DA CRIPTOCOCOSE EM POEIRA DOMICILIAR EM BAIROS DE SANTA ISABEL DO RIO NEGRO NO ESTADO DO AMAZONAS. / Fabio Brito dos Santos. - Rio de Janeiro, 2013.

83 f.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2013.

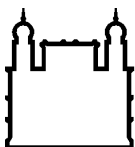
Orientadora: Márcia dos Santos Lazéra .

Co-orientador: Filipe Anibal Carvalho Costa.

Bibliografia: f. 52-63

1. Agentes da criptococose. 2. Poeira domiciliar . 3. Santa Isabel do Rio Negro/AM. 4. MLST. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manginhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Medicina Tropical

FABIO BRITO DOS SANTOS

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS AGENTES DA
CRIPTOCOCOSE EM POEIRA DOMICILIAR EM BAIROS DE SANTA ISABEL DO
RIO NEGRO NO ESTADO DO AMAZONAS**

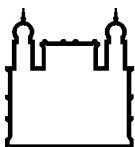
ORIENTADORES: **Prof. Dr^a.** Márcia dos Santos Lazéra
Prof. Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Fabio Faria da Mota (Presidente)
Prof. Dr. Marcio Lourenço Rodrigues
Prof. Dr^a. Marcia Chame dos Santos
Prof. Dr. Rodrigo de Almeida Paes- 1^osuplente
Prof. Dr^a. Luciana Trilles-2^osuplente

Rio de Janeiro, 29 de maio de 2013



Ministério da Saúde

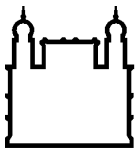
FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

RESUMO

A criptococose coloca-se entre as infecções fúngicas humanas de significativa letalidade e morbidade, principalmente sob forma de meningoencefalite. Esta micose, de natureza sistêmica, com porta de entrada inalatória, é causada por leveduras patogênicas do chamado complexo *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii*. A micose é de distribuição mundial e seus agentes *C. neoformans* e *C. gattii* juntos apresentam oito principais tipos moleculares presente em todo mundo. *C. gattii* e seus tipos moleculares (VGI, VGII, VGIII e VGIV) são menos comuns, representando 20% das infecções, enquanto *C. neoformans* (VNI, VNII, VNIII e VNIV) e seus tipos moleculares 80%. O tipo molecular mais comum encontrado no Brasil é VNI, seguido por VGII, VNII, VGIII, VNIV, VGI e VNIII. A criptococose primária causada pelo tipo molecular VGII (sorotipo B, *MATalfa*), prevalece em pacientes imunocompetentes nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, revelando um padrão regional endêmico para este tipo molecular. O perfil emergente dessa micose tem motivado inúmeros estudos de fontes ambientais de risco para humanos e animais. A exposição a propágulos dispersos no meio ambiente inicia o processo infeccioso, relacionado a diversos substratos orgânicos e, pode ocorrer também a partir de fontes domiciliares ou peri-domiciliares. O presente estudo teve como objetivo investigar a presença dos agentes da criptococose em poeira domiciliar na região do alto do Rio Negro, no município de Santa Isabel do Rio Negro no estado do Amazonas. As metodologias utilizadas foram: coleta e isolamento dos fungos a partir de poeira domiciliar; identificação fenotípica e genotípica das colônias pelas técnicas de “Restriction Fragment Length Polymorphism” (RFLP) do gene *URA5* e “Multilocus Sequence Typing” (MLST); e determinação do tipo sexuado (mating type) por técnica de PCR. Cinquenta e uma casas foram visitadas, sendo que destas, três casas foram exclusivamente positivas para *C. gattii* tipo molecular VGII tipo sexuado *MATalfa*, apresentando significativa densidade deste agente (50, 2.500 e 50.000 UFC/g de poeira cada). Os estudos por MLST identificaram 8 subtipos de *C. gattii* VGII distribuídos nos 3 domicílios. Quatro subtipos foram identificados no domicílio DW-650 com o predomínio do VGIIb (ST7), genótipo predominante na Austrália e também relatado no Canadá. No segundo domicílio, 4 subtipos foram identificados, com predomínio do subtipo VGIIa (ST20), mais virulento e predominante na epidemia do Canadá. O último domicílio (SI444) apresentou um único subtipo VGIIb (ST7). Além de VGIIa e VGIIb, um total de 5 subtipos novos e exclusivos da região estudada foram identificados (STs 264, 265, 266, 267, 268), bem como um subtipo (ST5) já descrito previamente na Austrália. Pela primeira vez no estado do Amazonas, *C. gattii* VGII *MAT alfa* foi isolado do meio ambiente e se correlaciona com a criptococose endêmica por este agente neste estado. Esse foi o primeiro estudo de MLST descrevendo isolados ambientais na Amazônia brasileira, apontando poeira domiciliar como fonte potencial para a infecção humana por diferentes subtipos de *C. gattii* VGII *MATalfa*.

Palavras-chave: 1. Agentes da criptococose. 2. Poeira domiciliar. 3. Santa Isabel do Rio Negro/AM. 4. MLST



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

ABSTRACT

Cryptococcosis is a human fungal infection of significant mortality and morbidity, especially in the meningoencephalitis form. This systemic mycosis is acquired by inhalation and caused by the pathogenic yeast complex known as *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii*. Cryptococcosis is distributed worldwide and their agents, *C. neoformans* and *C. gattii*, together present eight major molecular types. *C. gattii* and its molecular types (VGI, VGII, VGIII, and VGIV) are less common, accounting for 20% of infections, while *C. neoformans* molecular types (VNI, VNII, VNIII, and VNIV) accounts for 80%. The most common molecular type found in Brazil is VNI, followed by VGII, VNII, VGIII, VNIV, VGI and VNIII. The primary cryptococcosis caused by molecular type VGII (serotype B, MAT alpha) prevails in immunocompetent patients in the North and Northeast of Brazil, revealing an endemic regional pattern to this molecular type. The emerging profile of this mycosis has motivated numerous studies of potential environmental sources to humans and animals. Exposure to propagules dispersed in the environment initiates the infection process, related to various organic substrates and can also occur from sources around dwellings. The present study aimed to investigate the presence of the agents of cryptococcosis in dust from dwellings in the upper Rio Negro, municipality of Santa Isabel do Rio Negro in Amazonas state. The methodologies used were: collection of dust and isolation of the fungi; phenotypic and genotypic identification of colonies by the techniques of restriction fragment length polymorphism (RFLP) and Multilocus Sequence Typing (MLST), and identification of the mating type by PCR. Fifty-one houses were visited, and only three of them were positive for *C. gattii* molecular type VGII, MAT alpha, showing significant density of this agent (50, 2,500 and 50,000 UFC / g of dust in each one). MLST studies identified eight subtypes of *C. gattii* VGII distributed in 3 households. Four subtypes have been identified in the household DW-650 with dominance of VGIIb (ST7), predominant genotype in Australia, and also reported in Canada. In the second house, four subtypes were identified, with a predominance of subtype VGIIa (ST20), more virulent and prevalent in the Canada epidemic. The last house (SI444) showed a single subtype VGIIb (ST7). Besides VGIIa and VGIIb, a total of 5 new subtypes and exclusive of the region studied have been identified (STs 264, 265, 266, 267, 268) as well as a subtype (ST5) previously described in Australia. For the first time in the state of Amazonas, *C.gattii* VGII MAT alpha was isolated from the environment and correlates with endemic cryptococcosis by this agent in this state. This was the first study describing MLST subtypes on environmental isolates in the Brazilian Amazon, appointed domiciliary dust as a potential source for human infection with different subtypes *C.gattii* VGII MAT alpha.

Keywords: 1. Cryptococcosis agentes. 2. Dust indoor. 3. Santa Isabel do Rio Negro/ AM. 4. MLST

A persistência é o caminho do êxito.

(Charles Darwin)

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos a todos que de forma direta ou indireta fizeram possível a realização deste projeto.

Aos meus pais pela herança genética da sabedoria, persistência e determinação.

À minha orientadora Dr^a. Márcia Lazéra pela paciência, dedicação e amizade antes e durante a execução deste projeto, sendo sempre uma grande incentivadora para realização do mesmo.

Aos meus colaboradores nesse projeto, Dr. Bodo Wanke, Dr^a. Marília Nishikawa, Dr. Filipe Anibal.

À Glauca Barbosa por todo apoio para realização da etapa técnica, com sua paciência e dedicação.

À Dr^a. Luciana Trilles, uma grande colaboradora, preceptora e incentivadora desse projeto.

Aos meus amigos e colegas de trabalho Dr. Rodrigo de Almeida e Maria Helena Galdino por administrar toda a nossa rotina laboratorial nos meus períodos de ausência para realização dos experimentos.

À equipe do diagnóstico micológico (Mônica, Marcela, Gabriela, Camila, Rowena, Rosani) pelos momentos agradáveis no dia a dia da nossa rotina.

Aos meus colegas de turma da Medicina Tropical pelo apoio na realização do trabalho de campo.

In memoriam, à minha avó, matriarca da família Brito, ao meu pai Adilson José e ao Dr. Paulo Fialho, responsável e incentivador da minha permanência na micologia médica.

Dedico essa dissertação
aos verdadeiros civilizadores do nosso país

LISTA DE FIGURAS

Figura 5.1	Localização da área de trabalho	23
Figura 6.1	Localização de 41 dos 51 domicílios visitados, obtida através de aparelho de GPS	32
Figura 6.2	Plaqueamento da amostra DW650 em ágar semente de Níger	32
Figura 6.3	Eletroforese em gel de agarose 3% revelando o produto do PCR-RFLP do gene <i>URA5</i>	34
Figura 6.4	Caracterização do tipo sexuado <i>MAT alfa</i> e <i>MATa</i> . Eletroforese em gel de agarose 2% revelando o produto do PCR do tipo sexuado	35
Figura 6.5	Árvore filogenética neighbor-joining a partir das sequências combinadas dos genes <i>CAP59</i> , <i>GPD1</i> , <i>LAC1</i> , <i>SOD1</i> , <i>URA5</i> , <i>PLB1</i> e IGS dos 45 isolados ambientais testados neste estudo.	39

LISTA DE QUADROS

Quadro 5.1	Lista de cepas de referência utilizadas neste estudo, incluindo informações gerais, sorotipos, mating type (MAT) e tipo molecular (TM).	23
Quadro 6.1	Relatório bioquímico do cartão de identificação de leveduras (yst/ yeast identification card)	33
Quadro 6.2	Sítios polimórficos na análise conjunta dos 7 loci (<i>CAP59</i> , <i>GPD1</i> , IGS1, <i>LAC1</i> , <i>PLB1</i> , <i>SOD1</i> , <i>URA5</i>).	36
Quadro 6.3	Perfil de alelos dos genes identificados para cada um dos 45 isolados de poeira domiciliar e subtipos (ST) correspondentes.	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1	Iniciadores e respectivos ciclos utilizados no MLST	23
Tabela 6.1	Amostras ambientais (poeira domiciliar) coletadas por bairro no município de Santa Isabel do Rio Negro-AM	31
Tabela 6.2	Resultados da identificação fenotípica de espécies de <i>Cryptococcus</i> fenol-oxidase positiva isoladas de poeira domiciliar.	33

LISTA DE SIGLAS, ABREVIACOES E SÍMBOLOS.

°C	Grau Celsius
>	Maior
<	Menor
µg/mL	Micrograma/Milésima parte de um litro
µm	Micrômetro
mm ³	Milímetro cúbico
mmH ₂ O	Sensor de pressão (Milímetro de coluna de água)
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polimorphism</i>
A	Adenina
AM	Amazonas
aids	Síndrome da imunodeficiência adquirida
ASN	Ágar Semente de Niger
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
C	Citosina
CFP	Coleção de Cultura de Fungos Patogênicos
CRAG	<i>Cryptococcus Antigen Lateral Flow Assay</i>
<i>CAP59</i>	Gene da cápsula polissacarídica
CBS	<i>Centraalbureau voor Schimmelcultures</i>
CGB	Canavanina-glicina-azul de bromotimol
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DNase	Desoxirribonuclease
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
G	Guanina
<i>GPD1</i>	Gene desidrogenase de gliceraldeído-3-fosfato

GPS	Sistema de posicionamento global
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
IGS	<i>Intergenic Spacer</i>
IV	Intravenosa
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IPEC	Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas
ITS	<i>Intragenic Spacer</i>
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
LCR	Líquido céfalo raquidiano
mM	Milimolar
M	Molar
<i>MAT alfa</i>	<i>Mating Type alfa</i>
<i>MATα</i>	<i>Mating Type α</i>
MEGA	<i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i>
mm	Milímetro
Min	Minutos
pmol	Picomol
PA	Pará
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PGE ₂	prostaglandina E ₂
pH	Potencial Hidrogeniônico
PI	Piauí
<i>PLB1</i>	<i>Gene fosfolipase B</i>
PAS	Ácido periódico de Schiff
PGMT	Pós- graduação de Medicina Tropical
P/V	Peso/Volume
N	Norte

NE	Nordeste
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RJ	Rio de Janeiro
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RR	Roraima
rRNA	<i>Ribosomal Ribonucleic Acid</i>
rpm	Rotações por minuto
SDA 2%	Ágar Sabouraud com glicose a 2%
ST	<i>Sequence typing/subtipo</i>
SNC	Sistema nervoso central
<i>SOD1</i>	superóxido dismutase de Cu ²⁺ e Zn ²⁺
SP-D	Proteína surfactante D
SRI	Síndrome da reconstituição imune
TOS	Transplante de órgão sólido
T	Timina
TM	Tipo molecular
YST	<i>Yeast identification card</i>
UF	Unidade Federativa
WM	Cepas da Coleção do Hospital Westmead, Austrália.
<i>URA5</i>	<i>Gene Orotidine-5'-phosphate decarboxylase</i>
UV	Luz ultravioleta
UFC/g	Unidades formadoras de colônia/por grama de poeira
VET	Amostras Veterinárias
VITEK® 2	Sistema automatizado para identificação de fungos e bactéria versão 2.0
USA	<i>United States of America</i>
5FC	5-Flucitosina

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	1
2 – REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 – HISTÓRICO DA CRIPTOCOCOSE	3
2.2 – AGENTES DA CRIPTOCOCOSE	4
2.2.1 - Taxonomia	4
2.2.2 – Identificação fenotípica	4
2.2.3 – Identificação genotípica.....	5
2.3 – PATOGENIA	6
2.3.1–Infecção pulmonar	6
2.3.2–Fatores anti-fagocitários	8
2.3.3–Fatores de sobrevivência intracelular	8
2.3.4–Rompimento da célula hospedeira e penetração da barreira	9
2.3.5– Disseminação para o sistema nervoso central	10
2.3.6– Imunologia da criptococose	10
2.4 FORMAS CLÍNICAS DA CRIPTOCOCOSE	11
2.4.1–Comprometimento pulmonar	11
2.4.2–Comprometimento do sistema nervoso central	11
2.4.3– Imunodeprimidos: AIDS e outras condições imunossupressoras	12
2.4.4– Particularidades no hospedeiro imunocompetente	12
2.5 – DIANÓSTICO LABORATORIAL	15
2.6 – DIAGNÓSTICO IMUNOLÓGICO	16
2.7 – ECO-EPIDEMIOLOGIA GLOBAL	17
2.8 – ECO-EPIDEMIOLOGIA NO BRASIL.	18
3 – RACIONAL E JUSTIFICATIVA	20
4 – OBJETIVOS	21
4.1 – OBJETIVO GERAL	21
4.2 – OBJETIVO ESPECÍFICO	22
5 – MATERIAIS E MÉTODOS	23
5.1 – TRABALHO DE CAMPO	23
5.1.1– Área de estudo	23
5.1.2– Visitas aos domicílios e coletas de amostras	24
5.2– TRABALHO LABORATORIAL	24
5.2.1– Processamento das amostras	24
5.3 – IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA	25
5.3.1–Síntese de melanina (atividade da fenoloxidase)	25
5.3.2–Sensibilidade à ciclohexamida	25
5.3.3–Teste da urease	25
5.3.4- Teste de CGB	25
5.3.5 –Assimilação de compostos de Carbono e Nitrogênio	26
5.4 – IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR	26
5.4.1– Extração de DNA	26
5.4.2 – Identificação dos genótipos principais por <i>URA5</i> -RFLP	27
5.4.3 – Identificação do Tipo sexuado (mating type)	28
5.4.4 – Análise dos subtipos moleculares por seqüenciamento de Múltiplos Loci (MLST-Multilocus Sequence Typing)	28
6 – RESULTADOS	31

6.1 – DISTRIBUIÇÃO E POSITIVIDADE PARA <i>C. NEOFORMANS/C. GATTHI</i>	31
6.2 – ANÁLISE DOS ISOLADOS OBTIDOS DE CADA DOMICÍLIO POSITIVO	32
6.3 – IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA POR MÉTODO NÃO AUTOMATIZADA	33
6.4 – IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA POR MÉTODO AUTOMATIZADO	33
6.5 – IDENTIFICAÇÃO DE GENÓTIPOS POR <i>URA5-RFLP</i>	34
6.6 – IDENTIFICAÇÃO DO TIPO SEXUADO POR PCR	34
6.7 – ANÁLISES POR SEQUENCIAMENTO DE MÚLTIPLOS LOCI (MLST)	35
6.7.1 – Análise filogenética das 45 colônias ambientais	38
7 – DISCUSSÃO	46
8 – CONCLUSÕES	49
9 – PERSPECTIVAS	51
10 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
11 – APÊNDICE – Parecer	63
11.1 – ANEXOS -	63
11.1.1– Anexo 1 - Meios de Cultura	64
11.1.2 –Anexo 2 - testes, mnemônico e concentração do cartão yst	69

1- INTRODUÇÃO

Os fungos de interesse médico, agentes de micoses, possuem um aparelho de vida vegetativo denominado micélio e um aparelho de frutificação, cujos órgãos se diferenciam para servir à reprodução, que pode ocorrer por um processo sexuado (perfeito ou teleomorfo) ou assexuado (imperfeito ou anamorfo). A célula dos fungos é constituída pelos principais componentes encontrados nos demais organismos eucariotos, constituídos de parede celular, membrana plasmática ou plasmalema, vacúolos, retículos endoplasmáticos, aparelho de Golgi, lomassomos, mitocôndria, parede nuclear, núcleo e cromossomos, além de septos e poros septais. As leveduras são fungos unicelulares não-filamentosos, caracteristicamente esféricos ou ovais. Sua reprodução é por brotamento ou cissiparidade e formam colônias pastosas ou cremosas de coloração branca, creme e avermelhado além de tons escuros entre verde, marrom e preto. Os fungos filamentosos apresentam colônias algodonosas, aveludadas ou pulverulentas de organização multicelular. A estrutura fúngica filamentosa é composta de longos filamentos de células conectadas entre si formando hifas. Quando são divididas em unidades celulares uninucleadas, são chamadas hifas septadas. Os septos possuem poros que fazem com que o citoplasma das células se comunique. Em algumas classes de fungos as hifas não têm septos e são denominadas cenocíticas (Lacaz *et al.* 2002).

Os fungos estão amplamente distribuídos no ambiente, presentes nos diferentes ecossistemas terrestres e aquáticos, dispersando-se sob a forma de esporos e/ou fragmento de hifas por diversas vias entre as quais, o ar, água e numerosos vetores como insetos, pássaros e mamíferos. Seu diversificado aparato enzimático os capacita a colonizar diversos tipos de substratos de origem animal, vegetal e até compostos sintéticos como plástico (Alexopoulos *et al.* 1979).

Estima-se que existam em torno de 1,5 milhões de espécies de fungos, das quais aproximadamente 100.000 espécies estejam descritas (Hawksworth 1995). Segundo Perfect *et al.* (2006), das espécies descritas, cerca de 270 são reconhecidas como causadoras de doenças em vertebrados e humanos e, podem causar infecção de natureza sistêmica e potencialmente fatais, bem como infecções com localização superficial, cutânea e subcutânea.

Classicamente, os fungos causadores de micoses humanas são divididos em dois grupos: Patógenos primários e patógenos oportunistas. Entre os patógenos primários destacamos os agentes de micoses sistêmicas que se caracterizam por serem adquiridas por inalação de

propágulos fúngicos, causando lesão pulmonar primária, com tendência à regressão espontânea em hospedeiros imunocompetentes. A partir da localização pulmonar, o agente pode se disseminar por via hematogênica, originando lesão em diferentes órgãos. As principais micoses sistêmicas são a coccidioomicose, histoplasmose e paracoccidioomicose. A criptococose por *Cryptococcus gattii* (Kwon-Chung *et al.*2002) passou a ser incluída entre o grupo das micoses sistêmicas, pois seu agente tem comportamento predominante de patógeno primário e apresenta distribuição regional endêmica (Lazéra *et al.*2005).

Entre os patógenos oportunistas incluem-se os fungos que causam lesões em pacientes imunossuprimidos, ou em circunstâncias especiais como implantação traumática do fungo por acidente diversos. Tais fungos são ubíquos ou endógenos, termotolerantes, em geral monomórficos, cuja via de infecção é variada, produzindo manifestações cutâneas, subcutâneas ou sistêmicas, conforme a porta de entrada e sua disseminação no hospedeiro. Podem ser citados *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Zygomycetes* e *Cryptococcus neoformans*.

Duas espécies do gênero *Cryptococcus* causam a criptococose: *C. neoformans* e *C. gattii*. Esta micose é de distribuição universal, atinge humanos e uma grande variedade de animais, tem evolução subaguda ou crônica, sendo frequentemente fatal quando não diagnosticada e tratada corretamente. Até a década de 80, sua incidência era considerada baixa, ocorrendo principalmente em pacientes com neoplasia hematológicas (linfomas, leucemias), colagenosas (principalmente lúpus eritematoso sistêmico - LES), transplantados e indivíduos em uso de corticosteróides. Com o advento da AIDS, o número de casos aumentou significativamente, principalmente devido à imunodepressão do hospedeiro (Kwon-chung & Bennett, 1992; Casadeval & Perfect, 1998).

A criptococose por *C. neoformans* destaca-se pela sua relação oportunista com indivíduos imunocomprometidos, sendo importante causa de infecção e risco de vida em pacientes com AIDS (Kwon-chung & Bennett 1992). Por outro lado a ocorrência de meningoencefalite criptocócica por *C. gattii* em indivíduos sem comprometimento imunológico, ou seja, pacientes imunocompetentes é relevante em áreas tropicais e subtropicais (Cavalcanti *et al.*1997; Corrêa *et al.*1999; Santos *et al.*2000; Martins *et al.* 2003; Costa *et al.*2009 e Trilles *et al.*2008). Além disso, observações mais recentes mostraram que a criptococose por *C. gattii* pode ocorrer em regiões de clima temperado, inclusive com surtos epidêmicos (Kidd *et al.*2004). A criptococose por *C. gattii* na Ilha de Vancouver no Canadá mantém evidências de endemização e expansão de casos, pois tem sido descritos na costa pacífica do EUA (MacDougall *et al.*2007 e Bartlett *et al.*2011).

Portanto, com relação à criptococose, observamos um perfil predominantemente oportunista onde o principal agente é *C. neoformans*, destacando-se mundialmente a associação com AIDS. O outro perfil de progressiva importância ao nível mundial relaciona-se à criptococose primária sistêmica por *C. gattii* em hospedeiros sem evidências de imunodepressão.

2- REVISÃO DA LITERATURA

2.1-HISTÓRICO DA CRIPTOCOCOSE

A doença foi descrita em humanos há pouco mais de 128 anos, em 1884-85, quando dois médicos alemães descrevem em períodos diferentes o caso de uma paciente com lesão na tíbia, isolando o agente em cultivo. Esse primeiro isolado foi denominado como *Saccharomyces hominis*. No mesmo período na Itália, Sanfelice isolou uma levedura capsulada de suco de pêssago, denominada por este como *Saccharomyces neoformans*. Desde a descoberta desta micose, vários nomes para o fungo e para infecção haviam sido propostos, quando Vuillemin (apud Kwon-chung & Bennett, 1992) em 1901 reclassificou a levedura isolada por Busse como *Cryptococcus hominis* e a de Sanfelice como *C. neoformans* devido à ausência de formação de ascósporos e à ausência de fermentação de açúcares, como aqueles pertencentes ao gênero *Saccharomyces*. Em 1950 Benham propôs a denominação criptococose e *Cryptococcus neoformans* como *momen conservandum*. Logo esse termo foi absorvido na literatura médica e micológica (Casadevall & Perfect, 1998). Quanto à caracterização morfológica e antigênica, Evans e colaboradores (1949) descrevem sorotipos A, B e C, sendo mais tarde descrito o sorotipo D (Wilson *et al* 1968 apud Casadeval e Perfect 1998).

Emmons em 1951 descreve o primeiro isolado de *C. neoformans* a partir de fontes ambientais, onde isolou o fungo de solo contaminado com excreta de aves, em particular de pombos, sedimentando o conceito de infecção adquirida a partir de ambiente contaminado. Em 1962, Staib corrobora com a descrição de um meio de cultura seletivo onde somente a levedura de *C. neoformans* produzia pigmento marrom. Tal meio era produzido com sementes de *Guizotia abyssinica* mais conhecido como semente de Níger, um grão rico em extratos etéreos (óleos). Esse óleo vegetal bruto extraído dessa semente é geralmente mais estável do que o óleo refinado correspondente e é rico em tocoferóis (vitamina lipossolúvel), fosfolipídios, fitoesteróis, e fenóis são os mais importantes antioxidantes naturais em óleos brutos (Ramadam *et al.* 2003).

Em 1970, cepas atípicas de *C. neoformans* foram identificadas como uma nova variedade por Vanbreuseghem & Takashio, *C. neoformans* var. *gattii*. Em 1975 Kwon-Chung descreve os dois tipos sexuais (mating type), denominado *MAT_{alfa}* e *MAT_a*. A aplicação de métodos moleculares no estudo de *C. neoformans* inicia-se no final da década de 1980 e início da década de 1990, sendo tais métodos intensamente utilizados nas investigações subsequentes (Kwon-chung & Bennett 1992).

A Doença criptocócica é uma das mais importantes doenças oportunistas em pacientes HIV e uma das maiores contribuidoras para mortalidade precoce nesses indivíduos, representando entre 13% e 44% das mortes de infectados pelo HIV. Na África subsaariana sozinha há mais de 500.000 mortes a cada ano devido à meningite criptocócica, números que podem exceder àqueles atribuídos à tuberculose (Park *et al.* 2009).

2.2-AGENTES DA CRIPTOCOCOSE

2.2.1-Taxonomia

O gênero *Cryptococcus* inclui cerca de 70 espécies de leveduras na forma anamórfica. Algumas delas têm a forma teleomórfica conhecida, como por exemplo os gêneros *Filobasidium*, *Filobasidiella*, *Cystofilobasidium* e *Kwoniella*, na classe dos *Tremellomycetes* do Filo Basidiomycota. A maioria das espécies de *Cryptococcus* é saprofítica, mas destacam-se dois agentes patogênicos para homem e mamíferos como agentes da criptococose: *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* (Heitman *et al.* 2010).

A identificação das espécies *C. neoformans* e *C. gattii* se baseia nas diferenças morfológicas da fase teleomórfica, *Filobasidiella neoformans* e *Filobasidiella bacillispora* e, pelas diferenças bioquímicas da fase anamórfica. Apesar da forma dos basidiósporos das duas espécies serem diferentes, a morfologia da fase de levedura não possui diferenças marcantes (Kwon-Chung & Varma 2006). A identificação de basidiósporos alongados, característicos da espécie *C. gattii* só pode ser obtida *in vitro* em meios especiais, através da conjugação com cepas padrão de tipo sexual *MAT_{alfa}* e *MAT_a*, sendo que nem todas são férteis (Kwon-Chung & Varma 2006). Portanto, esta metodologia utilizada em pesquisa não se aplica à rotina de identificação fenotípica de isolados clínicos ou ambientais.

2.2.2-Identificação fenotípica

Os agentes da criptococose apresentam-se *in vivo* e em cultivo como levedura haplóide, globosa e ou ovóide capsulada, medindo de 3 a 8 µm de diâmetro, com brotamento único ou múltiplo a partir de qualquer ponto da parede celular. Não fermentam açúcares, assimilam vários açúcares por metabolismo oxidativo como única fonte de carbono, não assimilam o nitrato como fonte de nitrogênio, hidrolisa uréia, é sensível à cicloheximida, sintetiza melanina e é termotolerante, podendo crescer à temperatura de até 40°C (Kwon-Chung & Bennett 1992; Kwon-Chung 1998; Kwon-Chung *et al.*2002).

Do ponto de vista fenotípico, essas duas espécies só podem ser diferenciadas através do teste canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB) que distingue *C. gattii* por sua capacidade de assimilar glicina como única fonte de carbono e nitrogênio e não ser inibido pela canavanina resultando em crescimento no meio de cultura, mudança do pH para cor azul cobalto, resultando em CGB positivo. Por outro lado *C. neoformans* não cresce no meio, mantém a cor original, resultando em CGB negativo (Kwon-Chung & Bennett 1992; Kwon-Chung *et al.*2002). O teste CGB é utilizado como critério taxonômico fenotípico para distinção entre as duas espécies, no entanto outros testes como assimilação de ácido málico ou D-prolina têm sido utilizados como ferramenta para distinção destas espécies (Nishikawa *et al.*1996; Kurtzman 2011). Por muito tempo a identificação fenotípica foi baseada também em estudos de caracterização antigênica da cápsula, uma vez que *C. neoformans* corresponde aos sorotipos A e D, sendo o sorotipo AD híbrido dos haplotipos A e D, enquanto que *C. gattii* inclui os sorotipos B e C (Kwon-Chung *et al.*2002). No entanto a produção de KITS comerciais para a sorotipagem foi interrompida, o que levou à utilização de marcadores moleculares para identificação e distinção das espécies de *Cryptococcus* patogênicas para o homem.

2.2.3-Identificação Genotípica

Extensa variabilidade genética é observada nas espécies *C. neoformans* e *C. gattii*. Análise das sequências de nucleotídeos dos espaços intergênicos (Intergenic Spacer, IGS) e intragênicos (Intragenic Spacer, ITS) dos genes ribossomais de isolados clínicos e ambientais de diferentes regiões geográficas mostraram divergências entre isolados da mesma variedade e espécie (Diaz *et al.*2004). Análise dos perfis obtidos por reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction (PCR) -fingerprinting) utilizando como iniciadores oligonucleotídeos obtidos da sequência central do fago M13 e análise de fragmentos de ácidos nucléicos gerados por enzimas de restrição (Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment

Length Polymorphism, PCR-RFLP) PCR-*URA5* RFLP, discriminam tipos moleculares específicos para *C. neoformans* denominados VNI e VNII (sorotipo A), VNIII (sorotipo AD), VNIV (sorotipo D) e, para *C. gattii* os tipos moleculares denominados VGI, VGII, VGIII e VGIV, sorotipos B e C, não sendo observada correlação entre os sorotipos e os tipos moleculares em *C. gattii*. (Meyer *et al.* 2003).

Boekhout *et al.* (2001) utilizaram Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) para genotipagem e análise da variabilidade genética entre os agentes da criptococose oriundos de diferentes regiões geográficas (Europa, Americas, Oceania, Africa e Asia), sorotipos e micro habitat. Foram identificados vários genótipos de AFLP: genótipo AFLP 1 e 1A (sorotipo A), AFLP 2 (sorotipo D) e AFLP 3 genótipo híbrido que agrupou cepas de sorotipos A, D e AD. As cepas de sorotipo B apresentaram uma considerável heterogeneidade genética e agruparam-se em três padrões, AFLP4, AFLP5 e o genótipo AFLP6. As poucas cepas de sorotipo C se agruparam no genótipo AFLP5 (Boekhout *et al.* 2001).

Diversos métodos têm sido utilizados para a genotipagem de *C. gattii* e *C. neoformans* e, tais métodos sugerem estrutura populacional predominantemente clonal, mas existem também evidências de recombinação ou hibridação entre as variedades de *C. neoformans* e também entre as espécies *C. neoformans* e *C. gattii*. A ocorrência de hibridação tem consequência na reprodução biológica das espécies, como um genótipo “novo” com a virulência alterada, sobrevivência devido à mudança ambiental, ou à sensibilidade a drogas antifúngicas e a substâncias xenobióticas (Boekhout *et al.* 2001, Bovers *et al.* 2008, Aminnejad *et al.* 2012).

Reconhecendo a necessidade urgente de um método de tipagem padronizado e aceitável globalmente, um grupo de trabalho em “Genotipagem de *C. neoformans* e *C. gattii*”, foi formado na Sociedade Internacional de Micoses Humanas e Animais (Isham) no início de 2007, no qual participaram todos os principais grupos de pesquisa que estavam envolvidos na tipagem molecular de complexo *C. neoformans*. O grupo selecionou a Tipagem por Sequência de Múltiplos Loci (multilocus sequence typing - MLST) como o método de escolha para a tipagem de cepas em função de seu elevado poder de discriminação, bem como da reprodutibilidade entre diferentes laboratórios. O grupo de trabalho também escolheu cepas de referência padrão que representassem os oito principais tipos moleculares conhecidos como agente da criptococose, bem como a nomenclatura de cada genótipo e, como conclusão, esse grupo propõe o seguinte conjunto de loci genéticos associados com a virulência desses patógenos, como um padrão internacional para tipagem de *C. neoformans* e *C. gattii*: *CAP59*: Gene associado à proteína

capsular, *GPD1*: desidrogenase de gliceraldeído-3-fosfato, *LAC1*: lacase, *PLB1*: fosfolipase B, *SOD1*: superóxido dismutase de Cu^{2+} e Zn^{2+} , *URA5*: Orotidina monofosfato pirofosforilase. Além destes foi também incluído o IGS1: espaços intergênicos RNA Ribosomal (Meyer *et al.*2009).

2.3-PATOGENIA

Na criptococose, a via de infecção é através da inalação de propágulos fúngicos a partir de uma fonte ambiental para o trato respiratório, podendo atingir os pulmões. Este processo no hospedeiro pode resultar em infecção autolimitada, onde o fungo é eliminado pela própria resposta imune do hospedeiro e os sintomas podem estar ausentes ou serem inespecíficos. Na primoinfecção, usualmente o fungo entra em latência no foco pulmonar mantendo-se viável com baixo metabolismo, podendo ser reativado quando o hospedeiro se torna imunocomprometido. A doença pulmonar apresenta-se como processo inflamatório usualmente de apresentação aguda e padrão radiológico inespecífico bem como de nódulos pulmonares periféricos, resultado de uma apresentação tardia (Lazéra *et al.*2005; Lin X *et al.*2006 e Kashi K *et al.*2006). Dependendo da carga fúngica inalada e do estado imune do hospedeiro pode ocorrer disseminação linfohematogênica, com lesão secundária para diferentes órgãos, sendo o sistema nervoso central (SNC) a principal localização da criptococose no momento do diagnóstico, seja em imunocompetente ou imunocomprometidos (Lazéra *et al.* 2005; Lin X *et al.*2009). A infecção do SNC dependerá da capacidade de evasão do fungo nas barreiras envolvidas na fase inicial da infecção pulmonar. Curiosamente, Ngamskulrunroj *et al.* demonstram recentemente que diferente de *C. gattii*, *C. neoformans* apresenta lesões mais evidentes no SNC do que o pulmão (Ngamskulrunroj *et al.*2012).

2.3.1-Infecção pulmonar

Mais de 50 leveduras do gênero *Cryptococcus* vivem ubiquamente no ambiente, mas apenas *C. neoformans* e *C. gattii* são agentes patogênicos importantes para seres humanos. Os propágulos infecciosos fúngicos estão presentes no ambiente e, por meio de inalação, os esporos ou leveduras secas podem ter acesso ao trato respiratório. A colonização é estabelecida inicialmente nos pulmões, em um processo que envolve a deposição de um ou mais propágulos infecciosos com uma interação complexa de fatores de virulência do organismo patogênico e da resposta imune do hospedeiro (Ellis *et al.*1990).

Transmissão para o espaço alveolar

Os esporos e as células de leveduras secas do *Cryptococcus* são muito pequenos em tamanho e podem ser depositadas no fundo do trato respiratório por inalação. A ação cinética dos cílios e muco do hospedeiro representam um mecanismo de barreira e eliminação de partículas inaladas, que uma vez ultrapassadas permitem a implantação de partículas infecciosas no bronquíolos para dentro do espaço alveolar. Recentes avanços em isolar e caracterizar os esporos de *C. neoformans* abriram oportunidades para reprodução de modelo experimental murino usando esporos de modo a determinar a sua capacidade de infectar e de causar doença no hospedeiro. Esporos de *C. neoformans* sorotipo A causaram 100% de infecção letal no modelo murino por inalação e também em cultivo *in vitro* de hospedeiro invertebrado que tem como nome vulgar “traça da cera” e científico, *Galleria mellonella* classificado por Linnaeus, 1758 (Valagapudi *et al.* 2009, Botts *et al.* 2009).

O alvéolo pulmonar é revestido por um fluido de redução da tensão denominado SP-D (Proteína surfactante D) que promove a adesão de células criptocócicas às células epiteliais do pulmão, induzindo a fagocitose de leveduras capsuladas ou acapsular de *C. neoformans* através de macrófagos. Esse processo sugere que a opsonização criptocócica no hospedeiro é provavelmente um dos primeiros fatores inatos mediadores da transição de *Cryptococcus* do meio extracelular para o intracelular. Curiosamente, camundongos nocaute para SP-D foram parcialmente protegidos da infecção criptocócica (Ganendren *et al.* 2006; Geunes-Boyer *et al.* 2012).

2.3.2-Fatores anti-fagocitários

Expressão capsular é o maior fator de virulência dos agentes da criptococose, estando envolvida com resistência à fagocitose e modulação imunológica. A cápsula polissacarídica de *Cryptococcus* é antifagocítica e, por consequência, esses agentes são menos fagocitados pelos macrófagos (Zaragoza *et al.* 2009). No critério de seleção para disseminação, as cepas que apresentam o tipo sexuado *MAT α* são mais propensas a disseminar para o SNC do que as cepas *MAT α* . Interessantemente, a cápsula das leveduras *MAT α* durante uma co-infecção pulmonar pelos dois tipos sexuais são maiores que as leveduras *MAT α* . Assim o tipo sexuado *MAT α* apresenta uma maior resistência a fagocitose por macrófagos, como consequência, reduz a sua capacidade de disseminação. Portanto, o tipo sexuado demonstra um importante papel na disseminação do agente da criptococose para o SNC (Zaragoza *et al.* 2010).

2.3.3-Fatores de sobrevivência intracelular

Cápsula

C. neoformans produz um polissacarídeo complexo composto de glucuronoxilomanana e galactoxilomanana. A cápsula de revestimento forma uma estrutura em volta da superfície da célula de levedura. Além de reduzir a fagocitose, a expressão da cápsula protege o fungo de estresse oxidativo intracelular. O material capsular acumula no fagolisossoma e o torna permeável, um processo que pode permitir a liberação de fatores que inativam elementos intracelulares ou permitir a entrada de nutrientes (Zaragoza *et al.*2009).

Melanina

Além de importante fator de virulência, a produção de melanina fornece uma proteção adicional para o fungo. A melanina é um pigmento de carga negativa, hidrofóbico de elevado peso molecular produzido através da polimerização oxidativa de compostos fenólicos. A produção de melanina é catalisada pela lacase, que é produzida por *Cryptococcus* ao crescer em substratos contendo compostos polifenólicos. A melanina tem propriedades antioxidantes e protege *Cryptococcus* da oxidação pelas células fagocíticas e da ação de fármacos antifúngicos, tais como a anfotericina B e caspofungina (Casadevall *et al.* 2000).

Termotolerância

Um dos mais importantes fatores de virulência para os fungos patogênicos é a capacidade de crescer à temperatura corporal do hospedeiro. *C. neoformans* e *C. gattii* podem crescer e se multiplicar em temperaturas de 37°C a 39°C, sendo esta característica essencial para a virulência desses patógenos. Poucas espécies de *Cryptococcus* são capazes de crescer a 37°C. Mutantes de *C. neoformans* incapazes de crescer a 37°C são avirulentos, mesmo que produzam melanina e cápsula (Kwon-Chung & Bennett. 1992).

2.3.4- Rompimento da célula hospedeira e penetração da barreira

A produção de enzimas de degradação pelos agentes da criptococose é um importante fator de virulência e de sobrevivência. Dentre elas a fosfolipase, proteinase e urease são enzimas que atuam na degradação da membrana celular do hospedeiro, assim facilitando a disseminação desse microorganismo para outros órgãos inclusive para o SNC (Sabiiti & May 2012).

Fosfolipase

Fosfolipases são um grupo de enzimas heterogêneas capazes de hidrolisar uma ou mais cadeias de éster de glicerofosfolípidos. A ação das fosfolipases pode resultar na desestabilização das membranas, lise celular e liberação de mensageiros secundários lipídicos, promovendo a infecção pulmonar intersticial e a disseminação de *Cryptococcus* na via hematogênica (Ghannoum *et al.*2000).

Proteinase

As enzimas proteinases presentes em isolados ambientais e clínicos confere a capacidade de degradar proteínas dos hospedeiros, incluindo o colágeno, a elastina, o fibrinogênio, imunoglobulinas e fatores do complemento. Foi ainda proposto que estas proteinases, juntamente com as fosfolipases, permitem a replicação de *C. neoformans* no interior dos macrófagos e, assim, esses fungos poderiam escapar da morte por enzimas fagocíticas (Chen *et al.* 1996).

Urease

Na criptococose, a urease (gene *URE1*) é um importante fator de virulência. Camundongos infectados com mutantes *UreID* vivem mais do que camundongos infectados com a cepa do tipo selvagem H99. Embora urease não seja necessária para o crescimento do fungo no cérebro, os padrões de difusão para o cérebro, baço e outros órgãos após a inoculação intravenosa (iv) diferiu à cepa tipo selvagem, o que corrobora a proposta de que *Ure1* é importante para a invasão do SNC (Cox *et al.*2000).

2.3.5-Disseminação para o SNC

Infecção criptocócica no cérebro é o fim de uma viagem através de barreiras impostas pelo o hospedeiro. Lutando para chegar ao meio altamente protegido do cérebro requer ao *Cryptococcus* superar as barreiras do pulmão, sistemas circulatórios, e a mais significativa, a barreira hematocefálica. Uma vez no cérebro, o fungo prolifera, resultando em inflamação devastadora das meninges e parênquima cerebral (Sabiiti & May 2012).

2.3.6-Imunologia da Criptococose

A resposta imune do hospedeiro é um fator determinante da doença criptocócica. Uma exacerbada resposta Th1 ocorre durante a criptococose pulmonar a fim de solucionar a infecção, porém durante essa fase inicial, a presença do gen *URE1* tende a induzir uma resposta Th2 para promover a sua sobrevivência e disseminação (Zhang *et al.*2009). Através da expressão da

cápsula, *Cryptococcus* garante a sua sobrevivência intracelular inibindo danos oxidativos, induzindo produção de citocinas anti-inflamatórias e retardando a resposta imune adaptativa (Osterholzer *et al.*2009). Além disso, a cápsula inibe a produção de IL-6 por células mononucleares periféricas, um processo que subverte a proteção da resposta imune contra os agentes da criptococose (Siddiqui *et al.*2006). Por outro lado, um estudo recente demonstrou que a prostaglandina E₂ produzida pelo *C. neoformans* inibe a produção de IL-17 durante a diferenciação de células Th17. A enzima lacase de *C. neoformans* é responsável pela produção de PGE₂ e, conseqüentemente, isolados lacase mutantes ($\Delta lac1$) são menos virulentas em modelo murino de infecção (Valdez *et al.*2012).

2.4-FORMAS CLÍNICAS DA CRIPTOCOCOSE

2.4.1-Comprometimento pulmonar

O envolvimento pulmonar na criptococose é o segundo mais freqüente após o acometimento do sistema nervoso central. O complexo primário pulmonar-linfonodo, à semelhança da tuberculose e da histoplasmose, pode ser assintomático e com potencial risco de disseminação em presença de imunodepressão. Infecção subpleural assintomática ocorre freqüentemente, devido ao tamanho dos propágulos fúngicos, basidiósporos (1-2 μ m) que se depositam nos alvéolos periféricos. O espectro clínico e as apresentações radiológicas relacionam-se diretamente ao estado imunológico do hospedeiro. Nos pacientes com AIDS e doença criptocócica, os pulmões estão envolvidos em aproximadamente 30% dos casos; observa-se subdiagnóstico destas formas no paciente infectado pelo HIV. A maioria dos pacientes não infectados pelo HIV e imunodeprimidos que apresentam acometimento pulmonar pertence à categoria de pacientes transplantados. Em estudo de revisão, a criptococose pulmonar foi a segunda causa de nódulo pulmonar em pacientes transplantados de fígado, após a aspergilose. Uma série de casos publicados na China relata a presença da criptococose primária pulmonar em pacientes imunocompetentes demonstrando que além dos pacientes HIV existe uma casuística relevante nos imunocompetentes (Kerkering *et al.*1981; Campbell *et al.*1996; Casadevall *et al.*1998; Qiang Li *et al.*2010; Hayes *et al.* 2013).

2.4.2-Comprometimento do sistema nervoso central

A meningoencefalite é a forma clínica mais comumente diagnosticada, ocorrendo em mais de 80% dos casos, quer sob forma isolada ou associada ao acometimento pulmonar (Rozenbaum *et al.*1994).

Apresenta-se, mais frequentemente como meningite ou meningoencefalite aguda ou subaguda, entretanto lesões focais únicas ou múltiplas em SNC, simulando neoplasias, associadas ou não ao quadro meníngeo são observadas no hospedeiro imunocompetente. Esta última apresentação tem sido associada ao *Cryptococcus gattii* (Lazéra *et al.*2005).

2.4.3-Imunodeprimidos: AIDS e outras condições imunossupressoras

Em pacientes imunodeprimidos, com AIDS ou outras doenças imunossupressoras, a meningoencefalite ocorre de modo agudo, principalmente em pacientes do sexo masculino, apresentando carga fúngica elevada, sendo predominante o sorotipo A, com ampla variação de sinais clínicos, inclusive ausência de sinais meníngeos (Mitchell *et al.*1995).

A fungemia, com detecção do fungo em hemocultura, aparece com relativa freqüência em até um quarto dos casos; em formas com acometimento pulmonar isolado, lesões cutâneas e doença disseminada são menos freqüentes. A meningoencefalite ocorre de modo agudo, diferentemente dos pacientes imunocompetentes, e pode apresentar poucos sinais e sintomas. Cefaleia e febre estão presentes em 76% e 65% respectivamente. Meningite criptocócica deve ser sempre considerada em pacientes com AIDS que apresentam cefaléia e febre inexplicada, demência progressiva e confusão mental; ocorre nos pacientes com linfócitos T CD4+ < 50 células/mm³ sendo difícil a erradicação permanente do fungo no LCR e SNC. A hipertensão intracraniana (pressão líquórica inicial medida por raquimanometria >200mmH₂O, com o paciente em decúbito lateral) ocorre em aproximadamente 50% dos pacientes com neurocriptococose, contribuindo para significativo aumento da morbi-mortalidade da doença. O diagnóstico diferencial deve ser feito com outras afecções neurológicas comuns no paciente com AIDS, como tuberculose, toxoplasmose, linfoma, leucoencefalopatia multifocal progressiva, histoplasmoses e nocardiose. Um episódio de meningite criptocócica pode evoluir com um número significativo de seqüelas e déficits neurológicos. As mais freqüentes são diminuição da capacidade mental (30%), redução da acuidade visual (8%), paralisia permanente de nervos cranianos (5%) e hidrocefalia. A forma disseminada da doença pode apresentar-se como febre de origem indeterminada, como hepatosplenomegalia febril, bem como através do acometimento de

adrenais, rins, linfonodos de mediastino, pele, ossos, miocárdio, endocárdio, tireóide, testículo, hipófise, entre outros (Lazéra *et al.*2005).

2.4.4-Particularidades no hospedeiro imunocompetente

Em pacientes não imunodeprimidos o quadro clínico resultante da inflamação do sistema nervoso é exuberante: sinais meníngeos (náuseas, vômitos, rigidez de nuca); sinais de meningoencefalite em um terço dos pacientes na admissão (alterações de consciência, déficit de memória, linguagem e cognição); acometimento de pares cranianos (estrabismo, diplopia, ou paralisia facial (III, IV, VI e VII). Déficit visual ou amaurose, de caráter temporário ou definitivo ao longo da evolução e tratamento, refletem lesão do I par craniano (oftálmico). Há grande pleomorfismo clínico na meningoencefalite criptocócica podendo a demência ser a única manifestação da doença (Lazéra *et al.*2005)

Ao exame físico podem ser evidenciados sinais de irritação meníngea (Brudzinsky, Kernig e Laséque), sinais de hipertensão intracraniana, como o papiledema, que geralmente, corresponde a pressão intracraniana >350mmH₂O. Outros sinais neurológicos, tais como ataxia, alteração do sensório e afasia podem ser observados. Complicações como ventriculite fúngica, hidrocefalia obstrutiva por bloqueio sem meningite e, hidrocefalia por má absorção do LCR pela meningite são freqüentes. A tomografia cerebral pode ser normal em até 50% dos casos (Dismukes *et al.* 1987).

A criptococose infantil com elevada letalidade sob forma de meningoencefalite e formação de lesões pseudo-tumorais foi descrita no Pará, e representa parte expressiva da casuística no Norte e Nordeste brasileiro (Correa *et al.*2002). As apresentações clínicas são variadas, algumas de curso agudo ou subagudo, confundindo com etiologia viral; outras, que representam a maioria, com quadros de 2 a 4 semanas ou mais, com predomínio linfomonocitário, confundindo com tuberculose; outros com participação expressiva de polimorfonucleares no LCR confundindo com abscesso ou meningite bacteriana parcialmente tratada. Casuísticas brasileiras exibem média de surgimento de sinais e sintomas entre 3 semanas e 3 meses antes da admissão, mas individualmente pode variar de 2 dias a 18 meses, ou mais.

Existem outras situações não muito comuns como: Criptococoma e outras lesões do Sistema Nervoso Central, a síndrome de reconstituição imune (SRI), criptococose ocular, criptococose óssea, prostatite criptocócica, criptococose em paciente transplantado de órgão

sólido, criptococose cutânea e, entre elas cabe resaltar a criptococose na gestação e criptococose em crianças, formas clínicas relatadas na região amazônica.

Criptococose na gestação

A transmissão vertical da criptococose é rara. Formas clínicas não usuais (pseudocisto em sistema nervos central) de criptococose foram descritas em pacientes gestantes. Para o tratamento da criptococose na gestação tem sido utilizada a anfotericina B deoxicolato. Este antifúngico atravessa a barreira placentária e atinge baixas concentrações no líquido amniótico. Criptococose durante a gravidez é bem documentada, mas a transmissão da infecção para o feto é incomum (Castro *et al.*2006). Porém, recentemente nos EUA, um recém-nascido prematuro nascido de uma mãe com HIV e criptococose ativa apresentou exame histológico da placenta revelando *C. neoformans* dentro do espaço materno interviloso com invasão focal nas vilosidades coriônicas. A pesquisa de antígeno para *Cryptococcus* foi positiva no soro (1:2) e foi detectado nos dias 1 e 5 de vida. O recém-nascido, sem evidência de doença do sistema nervoso central, foi tratado com fluconazol com resolução de antigenemia. Este caso destaca tanto o potencial de transmissão transplacentária da infecção por *C. neoformans* e as complexidades de cuidar de mães grávidas que são infectadas com o HIV, porém existem poucos relatos na literatura sobre este assunto (Patel *et al.*2012).

Criptococose em crianças

Criptococose é uma infecção incomum na população pediátrica. A prevalência da infecção em crianças infectadas pelo HIV encontra-se em torno de um a 1,4%, diferente da população adulta onde a prevalência varia de 4 a 8%. A realização de inquéritos sorológicos em crianças tem como fator de interferência a reatividade aos testes sorológicos, em especial em crianças menores de dois anos. Já os estudos sorológicos em adultos imunocompetentes sugerem que a infecção criptocócica subclínica é comum. A característica ubíqua do *Cryptococcus* no ambiente leva a crer que as crianças devam se infectar de forma assintomática ou oligossintomática precocemente. Este fato ficou evidenciado em estudo epidemiológico sorológico (immunoblotting) realizado com crianças imunocompetentes maiores de dois anos residentes em Nova Iorque (EUA). A reatividade sorológica foi de 56% em crianças de 2 a 5 anos e 70% em crianças maiores de 5 anos. Esse estudo utilizou soro para detecção de anticorpos para *C. neoformans* observando que a maioria de crianças acima de 2 anos apresentam evidência de infecção prévia por esse agente na área de estudo (Goldman *et al.*2001).

No Brasil, a maior casuística de criptococose em crianças imunocompetentes foi relatada na região Norte, no estado do Pará (Correa *et al.* 1999). Foram estudadas 19 crianças, entre dois e 13 anos e todas com envolvimento de SNC. Lesões em SNC foram frequentemente detectadas por exames de imagem, tais como: nódulo, atrofia difusa e hidrocefalia. Os sintomas clínicos assemelham-se aos dos adultos, sendo a febre e cefaléia os mais frequentes; sinais de irritação meníngea ocorrem em aproximadamente 50% dos casos. Não existem citações na literatura em relação à melhor escolha terapêutica e os estudos relatam o uso de anfotericina B associada ou não a 5FC como tratamento inicial. Fluconazol também é utilizado no tratamento inicial e na consolidação. A duração da terapêutica é variável de 2 a 7 meses podendo ser mais prolongada dependendo da gravidade do caso e da resposta do paciente.

2.5-DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Microscopia direta

A microscopia direta baseia-se na visualização de levedura capsulada sem hifa ou pseudo-hifa no espécime clínico em preparações com tinta nanquim (tinta da China). Realizada especialmente de espécimes oriundos do trato respiratório, urinário e digestivo, onde outras leveduras capsuladas não patogênicas do gênero *Cryptococcus* podem ser encontradas. No LCR e em materiais obtidos de lesões fechadas o exame direto positivo é de valor diagnóstico.

Identificação em cultivo

O cultivo em meio de Sabouraud 2% sem actidiona (cicloheximida) deve ser usado de rotina. Atualmente recomenda-se de rotina também o uso do meio de semente de niger com antibiótico (NSA-cloranfenicol), que apresenta excelente rendimento em espécimes clínicos contaminados como escarro, urina e material de lesões cutâneas abertas. Todo material de biópsia deve ser cultivado de rotina e também submetido a estudo histopatológico (Kwon-Chung & Bennett 1992, Lacaz *et al.* 2002).

C. neoformans e *C. gattii* apresentam micro- morfologia e um conjunto de características fisiológicas e bioquímicas comuns. Levedura capsulada, sem hifa ou pseudo-hifa, termotolerante a 37°C, produtora de fenol-oxidase em meio NSA ou meio similar. Não fermentam açúcares; assimilação por metabolismo oxidativo como única fonte de carbono da galactose, sacarose, maltose, trealose, melizitose, D-xilose, L-ramnose, sorbitol, manitol, dulcitol, D-manitol, α -metil-d-glucosídeo, salicina, inositol, além da glicose e frutose. O nitrato não é assimilado como

única fonte de nitrogênio inorgânico, também não sofre redução a nitrito. Hidrolisa uréia devido à capacidade de produzir urease quando cultivado em meio de agar uréia de Christensen, sendo bastante raros os isolados urease-negativos. São sensíveis à cicloheximida, não crescendo nos meios seletivos que contém esta droga nas concentrações de 0,2 a 0,5%, embora alguns isolados possam crescer em concentrações mais baixas da droga (Kwon-Chung & Bennett 1992, Lacaz *et al.* 2002). Portanto os testes usuais de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio não distinguem as espécies de *Cryptococcus* fenol-oxidase positivo. O teste de CGB (canavanina-glicina-azul de bromotimol) é o teste fisiológico recomendado para diferenciar *C. gattii* de *C. neoformans*. Baseia-se em diferenças na resistência à L-canavanina e assimilação de glicina como única fonte de carbono e nitrogênio, sendo positivo para *C. gattii* e negativo para *C. neoformans*.

Identificação em tecido

Em cortes corados ao Mucicarmim de Meyer, *C. neoformans* ou *C. gattii* são identificados devido à cápsula que se apresenta na cor vermelha, facilitando o seu reconhecimento, sobretudo nas formas hipo-capsuladas. Coloração pelo ácido periódico de Schiff (PAS) pode ser uma alternativa para demonstração dos agentes. A impregnação argêntea pelo método de Gomori-Grocott evidencia a parede fúngica, mas não permite a identificação desta levedura, pois não discrimina a cápsula. A coloração de Fontana-Masson evidencia o depósito de melanina na parede, auxiliando na sua identificação em tecidos. A hematoxilina-eosina deve ser feita de rotina para localização e análise do padrão reacional das lesões (Kwon-Chung & Bennett 1992, Lacaz *et al.* 2002).

2.6-DIAGNÓSTICO IMUNOLÓGICO

A pesquisa de antígenos capsulares através de aglutinação de partículas de látex sensibilizadas (prova do látex) é de excelente rendimento no líquido (>95% nas formas de acometimento do sistema nervoso central) e de rendimento moderado no soro (até 50%) nas formas pulmonares. A especificidade desta prova para o diagnóstico da criptococose de SNC é alta no líquido, mas não distingue entre *C. gattii* ou *C. neoformans*, sendo positiva em ambas as etiologias. Deve ser levada em conta a possibilidade de falso-positivo por reação cruzada com fator reumatóide, que é resolvida pela adição de pronase, usualmente incluída nos *kits* comerciais disponíveis. Infecções disseminadas por espécies de *Trichosporon* e bacilos gram-negativos fastidiosos podem também ser causa de resultados falso-positivos e devem ser correlacionados com o quadro clínico e laboratorial do caso sob investigação (Kwon-Chung & Bennett 1992). A possibilidade de reação

cruzada com outros antígenos polissacárides também deve ser pensada em infecções por outras espécies de *Cryptococcus*, como *C. albidus* (Ikeda & Shinoda 1982). Reações falso-negativas podem ocorrer por excesso de antígeno capsular no LCR, que deve então ser diluído e re-testado. Técnicas moleculares para detecção de seqüências gênicas específicas de *C. neoformans/C.gattii* em espécimes clínicos não têm sido utilizadas de rotina, mas têm potencial em casos de exames micológicos e histopatológicos negativos ou inconcludentes.

O padrão-ouro para o diagnóstico da criptococose é a cultura a partir de fluidos corporais, o antígeno de *Cryptococcus* (CRAG) é usado para diagnosticar presuntivamente a doença criptocócica e apresenta uma sensibilidade e especificidade de quase 100% em estudos na África Sub-Saariana em população infectados pelo HIV (Kambugu *et al.* 2008). A prevalência de antigenemia criptocócica em pacientes HIV assintomáticos tem sido estudada em alguns lugares da Ásia e da África. O CRAG pode servir como uma ferramenta de rastreio para a doença criptocócica, e a utilização do CRAG com triagem em pacientes com $CD4 < 100$ células/mm³ seria de maior rendimento para o diagnóstico da criptococose em regiões com limitações laboratoriais, visto que esse exame é de fácil execução, podendo ser analisado os seguintes espécimes clínicos: soro, LCR e urina (Pongsai *et al.*2010).

2.7-ECO-EPIDEMIOLOGIA GLOBAL

A criptococose é uma micose de distribuição mundial e seus agentes *C. neoformans* e *C. gattii* juntos apresentam oito tipos moleculares presente em todo mundo responsáveis por essa infecção. Uma análise recente de 2755 isolados de *Cryptococcus*, distribuídos em 2.046 isolados clínicos, 68 veterinários e 604 ambientais, demonstrou o predomínio de *C. neoformans* VNI sorotipo A. Esse tipo molecular é responsável por 63% dos isolados clínicos e 41% dos isolados de origem ambiental. A infecção por *C. gattii* e seus tipo moleculares é menos comum, totalizando 20% quando comparado com 80% dos isolados de *C. neoformans* e seus tipos moleculares. Observando isolados de origem ambiental, essa distribuição dentre as espécies são equivalentes mundialmente, sendo que *C. gattii* representa 52% e *C. neoformans* 48% dos isolados analisados no estudo (Meyer *et al.*2011).Uma diferença notável é observada quanto à distribuição global de *C. neoformans* e *C. gattii*, a prevalência de *C. gattii* é maior nas Américas e no hemisfério sul. *C. gattii* é muito pouco isolado tanto em espécimes clínicos quanto em amostras ambientais na Europa, incluindo Rússia e parte da Ásia, especialmente na China,

Tailândia e Japão. A maioria das infecções em pacientes imunocompetentes e imunocomprometidos é causada pelo *C. neoformans* tipo molecular VNI, sorotipo A (Meyer *et al.*2011).

Todos os tipos moleculares de *C. neoformans* causam infecção em pacientes imunocomprometidos e os tipos moleculares de *C. gattii* são responsáveis pelas infecções em pacientes imunocompetentes. Essa observação global não inclui a China que apresenta uma casuística significativa de infecção *C. neoformans* VNI em pacientes imunocompetentes, sendo que existem achados similares na Coreia do Sul (Woo JH, 2008). Índia, Tailândia e Japão apresentam dados epidemiológicos semelhantes ao citado na literatura (Cogliati *et al.*2008; Supparatpinyo 2008; Miyazaki 2008). Uma mudança na distribuição geográfica é observada nos tipos moleculares VNIII (híbrido AD) e VNIV (sorotipo D), que tinham sido descritos anteriormente no sul da Europa principalmente na Itália e França e ocorrem também em número relativamente elevado na América Latina (México, Colômbia, Brasil e Chile) (Meyer *et al.*2011).

Os isolados ambientais na América do Sul têm como predomínio dois tipos moleculares em particular VNI (46%) e VGII (36%). VGII é o mais comum na América do Norte, onde representa 61% dos isolados ambientais, seguido de VNI (29%). Na Oceania, incluindo a Austrália, VGII (70%) é o tipo molecular mais comum em isolados ambientais e na Europa VNI (40%) é o mais comum (Meyer *et al.*2011).

MLST (multilocus sequence typing) é uma das mais novas ferramentas utilizadas na investigação epidemiológica de microorganismos. Na criptococose, pesquisadores padronizaram a utilização de 7 regiões específicas (*CAP59*, *GPD1*, *LAC1*, *PLB1*, *SOD1*, *URA5*, *IGS1*) para genotipagem e subgenotipagem. Além do mais, essa técnica gera dados que auxiliam na determinação se um fungo isolado é oriundo de uma expansão clonal ou recombinante. Na literatura existem poucos estudos epidemiológicos consistentes utilizando essa técnica, o MLST diferenciou genótipos específicos, um deles associado com grande virulência, entre os isolados de *C. gattii* relacionados à epidemia de Vancouver, denominado VGIIa e VGIIb. Tais subtipos foram isolados de amostras clínicas, veterinárias e ambientais na Ilha de Vancouver (MacDougall *et al.*2007).

Na criptococose por *C. neoformans* três genótipos moleculares são mais frequentemente citados: VNI, VNII, e VNB (Meyer *et al.*2003). Cepas VNI são globalmente dominantes, e

isoladas VNII são menos comuns. VNB é um novo subgrupo molecular descoberto e uma população em Botsuana e também presente na América do Sul e Japão. (Litvintseva *et al.*2006).

Com relação a *C. neoformans* a ocorrência e distribuição de STs encontra-se em fase inicial.

2.8-ECO-EPIDEMIOLOGIA NO BRASIL

Isolados clínicos e ambientais no Brasil mostram considerável diversidade genética de ambas as espécies, demonstrando ocorrência simultânea de diferentes tipos/genótipos (VNI, VNIV e VGII) em ocos de árvores. Estudo retrospectivo dos tipos moleculares de *C. neoformans* e *C. gattii* circulantes no Brasil sugere diferenças regionais na distribuição destes genótipos. Assim, as regiões Sul e Sudeste do Brasil apresentam como tipo molecular predominante VNI, atingindo, sobretudo pacientes imunocomprometidos, principalmente os com AIDS (Igreja *et al.*2004, Matsumoto *et al.*2007). Diferentemente, no Norte e Nordeste o agente mais comum é o tipo VGII sorotipo B, demonstrando ser endêmico na região, causando doença principalmente em pacientes imunocompetentes (Trilles *et al.* 2008).

No Brasil, estudos clínico-epidemiológicos mostram a importância da criptococose *gattii* de SNC em adultos jovens de ambos os sexos e crianças nas regiões norte e nordeste, com letalidade de 35% a 40% (Cavalcanti *et al.* 1995, Correa *et al.*1999, Santos *et al.* 2000, Darzé *et al.*2000, Nishikawa *et al.*. 2003, Martins 2004, Lazéra *et al.*2005).

Os primeiros casos de criptococose infantil descritos por Corrêa, em Belém, chamaram a atenção para a ocorrência e gravidade da meningoencefalite em crianças HIV negativo nesta região da Amazônia. Estudos mostram o predomínio da criptococose *gattii* sobre a criptococose *neoformans* em centro de referência em Belém do Pará (Santos *et al.* 2008), onde a maioria absoluta apresenta lesão de SNC. Estudos ambientais evidenciaram a presença dos dois agentes (*C. gattii* e *C. neoformans*) em árvores, na poeira coletada no interior de domicílios e em raspado de madeira em decomposição obtido de tábuas utilizadas na construção de casas da cidade de Belém (Costa *et al.* 2003;2004).

C. neoformans mostra-se amplamente adaptado a áreas urbanas, sendo capaz de reproduzir-se por expansão clonal e sobreviver em substratos secos, protegido da iluminação direta. Já foi encontrado na poeira domiciliar no Rio de Janeiro, em cerca de 13% dos domicílios investigados e, também em gaiolas de pássaros domésticos (Passoni *et al.*1998). Mostra-se ubíquo e de fácil inalação através de formas dessecadas das leveduras presentes no meio

ambiente e, possivelmente, também de basidiósporos. Este estudo no Rio de Janeiro mostrou risco aumentado de adquirir criptococose para moradores com AIDS em casas contaminadas, quando comparado ao de pacientes com AIDS moradores de casa onde a poeira não estava contaminada (Passoni *et al.* 1998). Este sorotipo A também é encontrado em ambientes rurais e já foi encontrado em cacauieiro e árvore nativa de mata amazônica, indicando habitats naturais em áreas preservadas ou com pouca intervenção humana, provavelmente seu micro habitat primário (Lazéra *et al.* 2000; Lazéra *et al.* 2005).

Trilles e colaboradores (2008) realizaram estudo molecular de 443 de isolados brasileiros de *C. neoformans* e *C. gattii* para determinar sua distribuição geográfica no Brasil. O tipo molecular mais comum encontrado no Brasil foi VNI (64%), seguido por VGII (21%), VNII (5%), VGIII (4%), e VNIV VGI (3% de cada), e VNIII (<1%). A criptococose primária causada pelo tipo molecular VGII (sorotipo B, *MATalfa*) prevalece em pacientes imunocompetentes na regiões Norte e Nordeste, revelando um padrão regional endêmico para este tipo molecular no norte do Brasil (Trilles *et al.*2008).

Foi realizado estudo na região Norte com 57 isolados de pacientes com criptococose em um hospital de atendimento terciário do estado do Amazonas, Brasil, entre 2006 e 2010. A maioria dos isolados de *C. neoformans* (n = 40) foi caracterizada como membros do grupo molecular VNI (n = 39), um único isolado foi caracterizado como VNII enquanto que todos os isolados de *C. gattii* (n = 17) eram *C. gattii* VGII. Este estudo revelou a prevalência do tipo molecular VNI, a presença do tipo molecular VGII, e foi relatada a primeira observação do tipo molecular VNII na região norte do Brasil (Freire *et al.*2012).

Considerando a expansão geográfica de *Cryptococcus gattii*, um estudo de isolados ambientais recente investigou ocos de árvores vivas como possível reservatório de *C. gattii* no Rio de Janeiro, sendo que 80 amostras de madeira em decomposição de área urbana e 85 de área silvestre foram coletadas. *C. gattii* VGI foi identificado em 98% das colônias isoladas, seguido de *C. neoformans* VNI (2%). Pela primeira vez no Rio de Janeiro *C. gattii* VGI foi isolado em um oco de árvore (Barbosa *et al.*2013).

É preciso ampliar os estudos sobre a criptococose e seus agentes na Amazônia e no Nordeste do Brasil, buscar o diagnóstico precoce, principalmente em crianças destas regiões, bem como identificar tipos moleculares predominantes em infecções humanas, em animais e no ambiente em nosso país.

3-RACIONAL E JUSTIFICATIVA

Recentemente, Kronstad *et al.* 2011 reafirmaram claramente que *C. neoformans* é um patógeno cosmopolita e oportunista, particularmente associado a HIV/AIDS. No entanto, esta visão se amplia pela descoberta recente de infecções humanas e de animais por *C. gattii*, um patógeno primário de hospedeiro imunocompetente. O surgimento de infecções letais por *C. gattii* é particularmente impressionante. Entre as mais de três dezenas de espécies de *Cryptococcus*, somente *C. neoformans* e *C. gattii* comumente causam a doença. Além do mais, *C. gattii* tem chamado a atenção do público por causa de surto em indivíduos imunocompetentes em região temperada, observado desde 1999 no Canadá, com predomínio do tipo molecular VGII nos casos e também nas fontes ambientais investigadas na British Columbia. Considerado o mais virulento dos tipos moleculares, o VGII tem caráter expansivo e potencial epidêmico.

A criptococose por *C. gattii* no Brasil apresenta um padrão endêmico com características regionais. Têm sido registrados diversos casos na Amazônia brasileira incluindo os estados do Pará e do Amazonas, onde é comum surgirem casos em crianças e adolescentes, sugerindo infecção natural nos primeiros anos de vida. A dinâmica da infecção natural por *C. gattii* nessas regiões é pouco conhecida e necessita de estudos específicos relacionados ao meio ambiente e possíveis focos relacionados à infecção. Assim, no estado do Amazonas, bem como em outros estados das regiões N e NE (Pará, Roraima, Maranhão e Piauí) a criptococose em crianças, não relacionada à AIDS, tem sido relatada em cerca de 1/5 dos casos (Corrêa *et al.*1999; Martins *et al.*2003;2011; Freire *et al.*2012). Fontes ambientais relacionadas a árvores colonizadas por agentes de criptococose já foram descritas em Roraima, Pará e Piauí (Fortes *et al.*2001; Lazéra *et al.*1998; Costa *et al.*2009).

A criptococose por *C. gattii* se apresenta como micose endêmica no estado do Amazonas, incluindo crianças com meningoencefalite em baixa faixa etária (Santos 2000), sugerindo que a infecção, isto é, a exposição a propágulos do agente dispersos no meio ambiente ocorre precocemente a partir de fontes domiciliares ou peridomiciliares. Por outro lado, a Amazônia e seus processos de antropização têm características fisiográficas próprias, sendo necessários estudos eco-epidemiológicos dirigidos à ocorrência de criptococose e fontes de infecção próprias desta região. Sob essa premissa, justifica-se o presente estudo, na busca de fontes ambientais com potencial de infecção para humanos em seu domicílio.

4-OBJETIVOS

4.1- OBJETIVO GERAL

Investigar a presença dos agentes da criptococose em poeira domiciliar em uma população estabelecida no estado do Amazonas.

4.2-OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Isolar os agentes da criptococose a partir de poeira domiciliar.
2. Estimar a quantidade de unidades formadoras de colônias fenol-oxidase positivas (UFCs) presentes nas amostras coletadas.
3. Identificar fenotipicamente os agentes da criptococose isolados.
4. Caracterizar tipos moleculares (VNI, II, III e IV) e (VGI, II, III e IV) dos isolados por técnica de PCR/RFLP.
5. Determinar o tipo sexuado (*mating type*) dos isolados de *Cryptococcus* spp. patogênicos obtidos.
6. Determinar subtipos moleculares dos isolados obtidos através da técnica de (MLST).

5-MATERIAIS E MÉTODOS

5.1-TRABALHO DE CAMPO

5.1.1-Área de estudo

A área selecionada do estado do Amazonas, na microregião Rio Negro, mostrou-se acessível para o estudo proposto e apresenta uma população estabelecida há mais de cem anos, num contexto de urbanização na Amazônia Ocidental. Faz fronteira com a Colômbia e Venezuela, compreendendo os municípios de São Gabriel da Cachoeira, Santa Isabel do Rio Negro e Barcelos, ambas localizadas às margens do rio Negro (**Figura 5.1**). O presente estudo foi realizado no município de Santa Isabel do Rio Negro que dista da capital do estado 620 km em linha reta e 772 km via fluvial, com as seguintes características: área territorial de 63.127 km², clima tropical, chuvoso e úmido; temperatura máxima de 32,6°C, mínima de 21,5°C; altitude: 21m acima do nível do mar; coordenadas cartesianas: 0° 28` de latitude sul e a 65° 32` de longitude a oeste de Greenwich; limites com os municípios de Maraã, Barcelos, Japurá, São Gabriel da Cachoeira e com a República da Venezuela e população de 18.133 habitantes (Fonte: IBGE 2010).

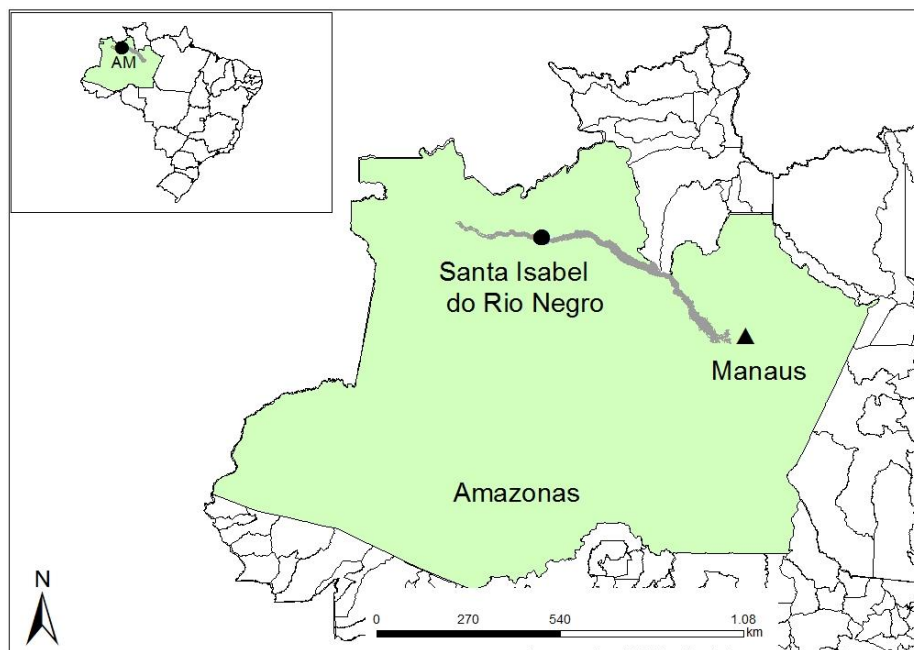


Figura 5.1: Localização da área de trabalho

5.1.2- Visitas aos domicílios e coleta das amostras

Foram realizadas visitas em diferentes bairros localizados na área de estudo, escolhidos de acordo com a facilidade de acesso aos domicílios e como parte de atividade conjunta com a Pós-graduação de Medicina Tropical (PGMT). A metodologia do presente projeto não incluiu o estudo em seres humanos, envolvendo tão somente o estudo de fontes ambientais que podem estar implicadas na infecção humana por *C. neoformans* e *C.gattii*. O projeto constituiu uma parte de uma proposta de projeto multidisciplinar com atividades de campo realizado pela disciplina de Epidemiologia Clínica da PGMT (Apendice 1). Para coletar amostra de poeira procedia-se a uma visita domiciliar, entrevista com o responsável, seguindo-se a realização da varredura do chão do intradomicílio pelo próprio morador. A coleta foi realizada utilizando a vassoura da própria casa e o material armazenado em sacos plásticos estéreis (Nasco/WHIRL-PARK®), próprios para transporte de amostras. Foi obtida uma amostra por domicílio, resultante da varredura de todos os cômodos. A marcação da localização dos domicílios visitados foi obtida através de aparelho de GPS (Garmin Etrex H ®). O material foi transportado da área de estudo pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) até o laboratório de Micologia do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC).

5.2-TRABALHO LABORATORIAL

5.2.1-Processamento das amostras

O processamento das amostras foi realizado de acordo com protocolo previamente descrito (Lazéra et al., 1996 e Passoni et al., 1998). Resumidamente, 1g da amostra foi suspensa em 49 mL de NaCl 0,9% com 0,2g de Cloranfenicol; seguiu-se agitação manual por 5 minutos e repouso por 30 minutos; semeadura de 0,1 mL do sobrenadante em placa como meio de extrato de semente de niger (Niger Seed Agar-NSA) (anexo1). Utilizaram-se 10 placas de petri descartáveis - dimensões 90 x15mm – por amostra, seguindo-se incubação à 25°C e leitura diária até o quinto dia de incubação. Colônias fenol-oxidase positivas, ou seja, de coloração marrom, foram transferidas para outra placa de NSA para identificação fenotípica e molecular. Os isolados foram preservados em skim milk à -20°C e em glicerol à -70°C e depositados na Coleção de Cultura de Fungos patogênicos (CFP) do Laboratório de Micologia do IPEC/FIOCRUZ.

A densidade de colônias fenoloxidase positivas foi estimada pela quantificação do número de unidades formadoras de colônias (UFC) em 1:50 (P/V) da suspensão inoculada em meio NSA

e expressa em Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por grama (g) de poeira analisada (UFC/g).

5.3-IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA

5.3.1-Síntese de melanina (atividade da fenoloxidase)

Colônias fenoloxidase positivas foram obtidas no primo isolamento em meio NSA (anexo1) e foram subcultivadas para obtenção de colônias puras. Para tanto, cada colônia de levedura com pigmento marrom foi re-isolada em meio NSA e considerado como um isolado distinto de *Cryptococcus* sp. (Staib & Seeliger 1966).

5.3.2-Sensibilidade à ciclohexamida

Para realização do teste de sensibilidade à ciclohexamida (anexo1) cada isolado fenoloxidase positivo foi semeado em meio Mycosel e incubado a temperatura ambiente (25°C) por 48 horas, recomendado por Kwon-Chung e col. 1998, uma vez que a maioria dos isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* são sensíveis a $\leq 12\mu\text{g/ml}$ de cicloheximida.

5.3.3-Teste da urease

Para verificar a produção de urease dos isolados agentes da criptococose, todas as amostras do estudo foram semeadas em Agar uréia de Christensen (anexo 1). Os isolados foram semeados na superfície do meio para verificar a capacidade de produzir amônia pela ação da urease, tornando o meio alcalino e mudando a cor do indicador de pH para rosa (Christensen *et al.*1946).

5.3.4- Teste de CGB (canavanina-glicina-azul de bromotimol)

Trata-se de teste fisiológico recomendado para diferenciar *C. gattii* e de *C. neoformans*. Baseia-se em diferenças na resistência à L-canavanina e assimilação de glicina como única fonte de carbono e nitrogênio, sendo positivo (azul-cobalto) para *C. gattii* e negativo (verde) para *C. neoformans* (Klein *et al.*2009).(anexo1)

5.3.5-Assimilação de compostos de Carbono e Nitrogênio

O estudo bioquímico dos isolados foi determinado pelo método automatizado VITEK® 2-BioMerieux System (VITEK® 2,ICB, bioMerieux, Durham, USA). Uma suspensão de leveduras (crescimento de 48h), na escala 2 de McFarland foi transferida para o cartão de identificação YST (Yeast Identification Card). Após a sucção na câmara de vácuo, o cartão foi incubado no sistema VITEK® 2 para realização da leitura periódica durando aproximadamente 19 horas. Após o período de incubação no sistema automatizado VITEK® 2, o sistema emite um bionúmero com o resultado correspondente. Os reagentes utilizados nessa análise e presentes no cartão YST são descritos no anexo 2.

5.4-IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

5.4.1-Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada de acordo com Ferrer e col. (2001) com algumas modificações. A massa do isolado foi transferida para um tubo de microcentrifuga estéril com auxílio de alça bacteriológica e estocada a -20°C overnight. Em seguida, foi adicionado 500µL de tampão de lise (SDS 0,5%, NaCl 1,4%, EDTA 0,73% e Tris-HCl 1M) e 5µL de β-mercaptoetanol e agitou-se vigorosamente no vórtex por cerca de um minuto. A amostra foi incubada à 65°C por 1 hora (foi agitada a cada meia hora). Logo em seguida foi adicionado 500µL de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (v: v: v 25:24:1). Agitou-se a fim de obter uma suspensão homogênea (no vórtex), e em seguida foi centrifugado a 14.000 rpm por 15 minutos. Removeu-se o sobrenadante (400µL) e o mesmo foi colocado em novo tubo de microcentrifuga. Foi adicionado um volume igual de isopropanol e homogenizou-se levemente. O DNA foi precipitado a -20°C overnight. Centrifugou-se o mesmo a 4°C 14000 rpm por 15 minutos. Foi retirada toda a fase líquida com a ajuda da micropipeta. O precipitado foi lavado com etanol 70% (500µL) e posteriormente centrifugado a 14000rpm por 15 minutos. Toda fase líquida foi retirada com a ajuda da micropipeta, o precipitado foi obtido e ressuspenso em 100 µL de água livre de DNase.

5.4.2-Identificação dos genótipos principais por *URA5*-RFLP

Os genótipos principais foram identificados segundo Meyer et al. (1999;2003). A confirmação dos tipos moleculares foi realizada pelo polimorfismo dos fragmentos de restrição do gene *URA5* (*URA5*-RFLP). Em um volume final de 50µL, a reação de amplificação continha 50 ng de DNA, 1X tampão de reação [160 mM (NH₄)₂SO₄, 670 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1% Tween-20], 0,2 mM de cada nucleotídeo, 2,5 U de TaqDNA polimerase (Bioline), 3 mM de MgCl₂ e 50 ng de cada primer (iniciador), senso *URA5* – (5'-ATGTCCTCCCAAGCCCTCGAC-3')e anti-senso SJ01-(5'-TTAAGACCTCTGAACACCGTACTC-3'). A reação ocorreu no termociclador Perkim Elmer modelo 680 com o seguinte ciclo de amplificação: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, hibridização a 63°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 2 minutos, e extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% por 2 h a 100 V, corados com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta. Oito microlitros dos produtos de PCR foram misturados a 1 µL de tampão da enzima *HhaI* e digeridos duplamente com *Sau96I* (10 U/µL) e *HhaI* (20 U/µL) em incubação por 3 horas ou “overnight” a 37 °C. Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose 3%, por 5 h a 100 V, corados com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta. Os padrões de RFLP (**quadro 5.1**) foram identificados visualmente utilizando-se comparação com as cepas de referência (VNI-VNIV e VGI-VGIV).

Quadro 5.1: Lista de cepas de referência utilizadas neste estudo, incluindo informações gerais, sorotipos , mating type (MAT), tipo molecular (TM).

N° do isolado	País	Fonte	Sorotipo	MAT	TM
WM 148	Austrália	CLIN	A	Alfa	VNI
WM 626	Austrália	CLIN	A	Alfa	VNII
WM 628	Austrália	CLIN	AD	Alfa	VNIII
WM 629	Austrália	CLIN	D	Alfa	VNIV
WM 179	Austrália	CLIN	B	Alfa	VGI
WM 178	Austrália	CLIN	B	Alfa	VGII
WM 161	Austrália	CLIN	B	Alfa	VGIII
WM 779	África do Sul	VET	C	Alfa	VGIV

5.4.3-Identificação do tipo sexuado (mating type)

O tipo sexuado foi identificado por PCR do gene de feromônio segundo Chatuverdi *et al* (2000). Foram utilizados os seguintes pares de primers: *MAT- α* : senso- (Mating- α -1) 5'-CTTCACTGCCATCTTCACCA-3') e anti-senso (Mating- α -2) 5'-GACACAAAGGGTCATGCCA-3') e *MAT-a*: senso- (Mating-a-1) 5'-CGCCTTCACTGCTACCTTCT-3' e anti-senso- (Mating-a-2) 5'-ACGCAAGAGTAAGTCGGGC-3') que deram origem a produtos de amplificação de 101pb ou/e 117pb, respectivamente. As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 50 μ L contendo 50 ng de DNA, 1X tampão de reação [160 mM (NH₄)₂SO₄, 670 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1% Tween-20], 0,2 mM de cada nucleotídeo, 2,5 U de TaqDNA polimerase (Bioline), 3 mM de MgCl₂ e 50 ng de cada par de primer (iniciador). A reação ocorreu em um termociclador Perkim Elmer modelo 680 com o seguinte ciclo de amplificação: desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, hibridização a 57,3°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 7 minutos. Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio, sob luz UV. Foram utilizadas cepas-padrão de *C. neoformans* ATCC 28957 *MAT α* e ATCC 28958 *MATa* como controle positivo.

5.4.4-Análise dos subtipos moleculares por seqüenciamento de Múltiplos Loci (MLST-Multilocus Sequence Typing)

Realização da PCR:A identificação dos subtipos moleculares foi realizada de acordo com metodologia padronizada (Meyer et al. 2009). Os seguintes marcadores foram amplificados: os genes *CAP59*, *GPD1*, *LAC1*, *PLB1*, *SOD1*, *URA5* e *IGS1*. Foi obtido um volume final para cada reação de 50 μ L contendo 50 ng de DNA, 1X tampão de reação [160 mM (NH₄)₂SO₄, 670 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1% Tween-20], 0,2 mM de cada nucleotídeo, 2,5 U de TaqDNA polimerase (Bioline), 3 mM de MgCl₂ e 50 ng de cada par de primer (iniciador). A reação ocorreu no termociclador Perkim Elmer modelo 680 com os seus respectivos ciclos (**Tabela 5.1**). O produto da amplificação de cada gene foi verificado através da visualização de fragmento específico na eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio, sob luz ultravioleta (UV).

Tabela 5.1: Iniciadores e respectivos ciclos utilizados no MLST

Lócus	Iniciadores senso/ antisenso	Ciclo de Amplificação	Tamanho do amplicon
<i>URA 5</i>	senso 5' ATG TCC TCC CAA GCC CTC GAC 3' e o antisenso 5' TTA AGA CCT CTG AAC ACC GTA CTC 3'	Desnaturação inicial a 94°C por 3min, seguido de 35 ciclos de: Desnaturação: 94°C por 45seg. Anelamento a 63°C por 1min. Extensão a 72°C por 2min. Extensão final a 72°C por 10min.	850 pb
<i>CAP 59</i>	senso 5' CTC TAC GTC GAG CAA GTC AAG 3' e antisenso 5' TCC GCT GCA CAA GTG ATA CCC 3'	Desnaturação inicial a 94°C por 3min, seguido de 35 ciclos de: Desnaturação: 94°C por 30seg. Anelamento a 56°C por 30seg. Extensão a 72°C por 1min. Extensão final a 72°C por 10min	630pb
<i>GPD 1</i>	senso 5' CCA CCG AAC CCT TCT AGG ATA 3' e antisenso 5' CTT CTT GGC ACC TCC CTT GAG 3'	Desnaturação inicial a 94°C por 5min, seguido de 35 ciclos de: Desnaturação: 94°C por 45seg. Anelamento a 63°C por 1min. Extensão a 72°C por 2min. Extensão final a 72°C por 10min	770pb
<i>LAC 1</i>	senso 5' AAC ATG TTC CCT GGG CCT GTG 3' e antisenso 5' ATG AGA ATT GAA TCG CCT TGT 3'	Desnaturação inicial a 94°C por 3min, seguido de 30 ciclos de: Desnaturação: 94°C por 30seg. Anelamento a 58°C por 30seg. Extensão a 72°C por 1min. Extensão final a 72°C por 10min	600pb
<i>PLB 1</i>	senso 5' CTT CAG GCG GAG AGA GGT TT 3' e antisenso 5' GAT TTG GCG TTG GTT TCA GT 3'	Desnaturação inicial a 94°C por 3min, seguido de 30 ciclos de: Desnaturação: 94°C por 45seg. Anelamento a 61°C por 45seg. Extensão a 72°C por 1min. Extensão final a 72°C por 10min	700pb
<i>SOD 1</i>	senso 5' GAT CCT CAC GCC ATT ACG 3' e antisenso 5' GAA TGA TGC GCT TAG TTG GA 3'	Desnaturação inicial a 94°C por 3min, seguido de 35 ciclos de: Desnaturação: 94°C por 30seg. Anelamento a 60°C por 30seg. Extensão a 72°C por 2min. Extensão final a 72°C por 10min	650pb
<i>IGS</i>	senso 5' ATC CTT TGC AGA CGA CTT GA 3' e antisenso 5' GTG ATC AGT GCAT TGC ATG A 3'	Desnaturação inicial a 94°C por 3min, seguido de 35 ciclos de: Desnaturação: 94°C por 30seg. Anelamento a 60°C por 30seg. Extensão a 72°C por 1min. Extensão final a 72°C por 10min	900pb

Purificação do produto de PCR: Os produtos de PCR são geralmente purificados para remover nucleótidos e iniciadores em excesso essa purificação foi realizada com o kit comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System. Foi adicionada uma solução de reagente 1 (“Membrana Binding”) na proporção de volume 1:1 ao produto de PCR de cada gene, seguindo-se repouso por 1 minuto (min). Todo o volume dessa primeira etapa foi transferido para uma mini coluna “SV Minicolumn”, que pode ligar-se até 40 µg do produto do PCR e foi incubada à 1min a temperatura ambiente. Cada amostra foi centrifugada a 13.000 RPM/1min e seu filtrado

desprezado. Em seguida iniciou-se a etapa de lavagem do produto de PCR usando reagente 2 (Membrana Wash Solution-Etanol 95%). Foram adicionados 700 µL do reagente 2 na SV Minicolumn e centrifugado 13.000rpm/1 min e seu filtrado desprezado. Essa etapa foi repetida, porém foi utilizado 500µL do reagente 2 e centrifugado a 13.000 RPM/5min. Para tirar o excesso de reagente 2 foi realizada mais uma etapa de centrifugação. A SV Minicolumn foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL onde foi eluída utilizando-se 50 µL água livre de nucleases e, sendo então submetida à centrifugação a 13.000RPM/1 min. O produto purificado foi estocado a 4°C ou -20°C. O produto da limpeza de cada gene foi verificado através da visualização do fragmento específico em eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta (UV).

Preparação da placa para análise do sequenciamento: Foram utilizadas placas. MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems®) para análise na plataforma de sequenciamento contendo 3,5µL de cada primer (senso e anti-senso) na concentração de (1 pmol) e adicionado a 4µL do produto de PCR purificado de cada gene. Cada amostra foi aplicada na placa em dois poços diferentes: um poço para o senso e outro para o anti-senso. Após a preparação da placa, a mesma foi fechada utilizando o MicroAmp® 8-Cap Strip (Applied Biosystems®) e enviada para a plataforma de sequenciamento da FIOCRUZ/Rio de Janeiro com o mapa de orientação de amostras.

Análise do resultado (MLST): As amostras foram editadas pelo programa Sequencher (v.4.10.1 Gene Codes) e alinhadas e analisadas pelo MEGA 4.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis). Após essa etapa de análise as sequências dos locis obtidas, foram comparadas com um banco de dados disponível na página www.mlst.mycologylab.org. Foi realizada análise filogenética a partir das sequências combinadas dos genes.

Etapas de desenvolvimento das metodologias. Na fase inicial de isolamento de colônias suspeitas, os métodos convencionais de identificação fenotípica (teste em NSA, Mycosel, CGB e Urease) bem como o de identificação de genótipos (URA5-RFLP) foram aplicados a todas as colônias obtidas e que puderam ser preservadas sem contaminação. Numa segunda fase de desenvolvimento do trabalho, amostras criopreservadas foram novamente reativadas em subcultivos. Devido ao maior custo e complexidade das metodologias utilizadas para realização de teste de assimilação (Vitek2), tipo sexuado e análise por MLST, foi realizado cálculo de número amostral (erro amostral de 10% e nível de confiança de 90%). Onde foi determinado o quantitativo à ser analisado na segunda etapa.

6-RESULTADOS

6.1-DISTRIBUIÇÃO E POSITIVIDADE PARA *C. NEOFORMANS*/*C. GATHII* DAS AMOSTRAS DE POEIRA.

Durante a primeira quinzena de novembro de 2011, foram coletadas um total 51 amostra de poeira domiciliar em 6 bairros no município de Santa Isabel do Rio Negro/AM discriminados na tabela 6.1.

Tabela 6.1: Amostras ambientais (poeira domiciliar) coletadas por bairro no município de Santa Isabel do Rio Negro-AM

Bairro	Código do bairro	Total de amostras por bairro
São Judas Tadeu	SJT	26
Santa Inês	SI	9
Dom Walter	DW	5
Aparecida	APA	2
São Jose Operário	SJO	3
Santana	SAN	6
Total de amostras coletadas		51

Dentre as 51 casas visitadas, foi possível obter a marcação por GPS em 41 casas cuja distribuição pode ser observada na figura abaixo (figura 6.1). Cabe ressaltar que a distribuição ocorreu em duas áreas separadas: uma correspondente à primeira área de povoamento da cidade, onde foram localizadas 28 casas, todas negativas e outra área de instalação de moradias mais recente onde foram localizadas 13 moradias, das quais 3 foram positivas.

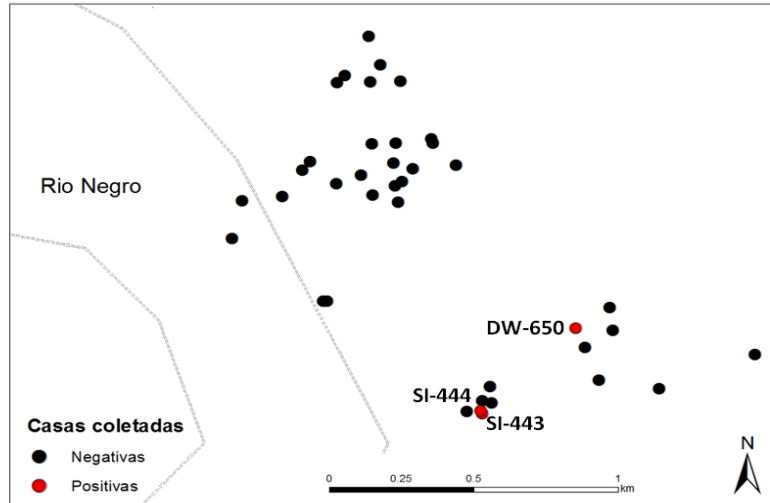


Figura 6.1: Localização de 41 dos 51 domicílios visitados, obtida através de aparelho de GPS e respectivos resultados. Devido à proximidade de algumas casas, alguns pontos de marcação correspondem a mais de uma unidade domiciliar.

6.2-ANÁLISE DOS ISOLADOS OBTIDOS DE CADA DOMICÍLIO POSITIVO

A casa identificada sob a sigla SI-444 apresentou 63 colônias fenoxidase positivas (concentração estimada de 2.500 UFC/g de poeira coletada). A segunda casa positiva, SI-443 apresentou uma única colônia fenoxidase positiva (concentração estimada de 50 UFC/g). A terceira casa positiva DW-650 apresentou incontáveis colônias fenoxidase positivas (concentração estimada >50.000 UFC/g) (Figura 6.2), das quais foram analisadas 80 colônias.

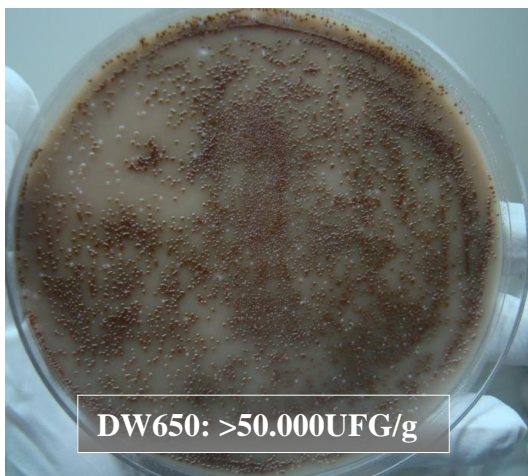


Figura 6.2: Plaqueamento da amostra DW650 em ágar semente de niger resultando em incontáveis colônias de coloração marrom, suspeitas de serem *C. neoformans* / *C. gattii*.

6.3-IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA POR MÉTODOS NÃO AUTOMATIZADOS.

A identificação fenotípica foi realizada num total de 144 colônias obtidas dos 3 domicílios, revelando *C. gattii* exclusivamente (**Tabela6.2**).

Tabela 6.2: Resultados da identificação fenotípica de espécies de *Cryptococcus* fenoloxidase positivas, isoladas de poeira domiciliar, em Santa Isabel do Rio Negro,AM.

PROVAS REALIZADAS					
Domicílio	UREASE	CGB	MICOSEL	NSA	N° colônias identificadas
SI 444	+	+	-	+	1
SI 443	+	+	-	+	63
DW 650	+	+	-	+	80
Total					144
Agente da Cryptococose identificado:				<i>C. gattii</i>	144 (100%)

Todas as 144 colônias apresentaram positividade para urease, CGB e NSA em até 72h de incubação. As colônias apresentaram ausência de crescimento em Agar Micosel. Esse perfil fenotípico realizado confirmou a espécie *Cryptococcus gattii*.

6.4- IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA POR MÉTODO AUTOMATIZADO DE ASSIMILAÇÃO DE COMPOSTOS DE CARBONO E NITROGÊNIO- SISTEMA VITEK 2.

Quadro 6.1: Relatório bioquímico ilustrativo do cartão de identificação de leveduras (YST/ Yeast Identification Card)

Detalhes bioquímicos											
LysA	-	IMLTa	+	LeuA	+	ARG	+	ERYa	-	GLYLa	-
TyrA	-	BNAG	-	ARBa	-	AMYa	-	dGAL	+	GENa	-
dGLUa	+	LACa	-	MadGa	+	dCELa	-	GGT	-	dMALa	+
dRAFa	+	NAGA1	-	dMNEa	+	dMELa	-	dMLZ	+	ISBEa	-
IRHAa	+	XLTa	+	dSORa	+	SACa	+	URE	+	AGLU	-
dTURa	+	dTREa	-	NO3a	-	IARaA	+	dGATa	+	ESC	-
IGLTa	+	dXYLa	+	LATa	+	ACEa	+	CITa	+	GRTas	+
IPROa	+	2KGa	+	NAGa	+	dGNTa	+				

+ = 95% a 100% positivo; v = 6% a 94% positivo; - = 0% a 5% positivo

A identificação fenotípica foi complementada com sistema de identificação automatizada em 48 isolados, representativos da amostra inicial de 144 colônias fenoxidase positivas. O sistema automatizado VITEK2 utilizou um tempo de identificação entre 18h e 18h e 15min e, gerou os bionúmeros 6102545273137771, 6103545273137771 e 6102545273137770 que correspondem à identificação de *Cryptococcus neoformans*. Todos os 48 relatórios gerados pelo sistema VITEK2 informaram um perfil nitrato/NO₃a e lactose/LACa negativo consistente com a identificação dos agentes da criptococose. Ressaltamos que todos os isolados analisados apresentaram assimilação rápida de ácido málico/IMLTa perfil de assimilação contraditório para *C. neoformans* identificado pelo sistema automatizado em questão. O quadro com representação das siglas e respectivos açucares está disponível no anexo 2.

6.5- IDENTIFICAÇÕES DE GENÓTIPOS POR PCR-RFLP DO GENE *URA5*.

Todos os 144 isolados apresentaram um único genótipo VGII. A figura 6.3 ilustra os resultados.

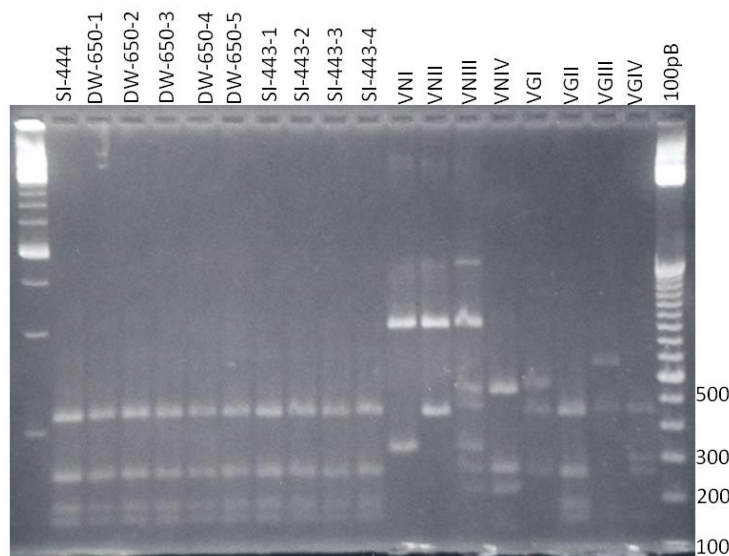


Figura 6.3: Eletroforese em gel de agarose 3% revelando o produto do PCR-RFLP do gene *URA5*. Resultados de 10 isolados representativos dos 144 isolados analisados, obtidos em três domicílios, ilustrando a identificação do tipo molecular VGII. Linha - 1: SI-444; Linhas 2 a 6: DW-650 1 a 5; Linhas 7 a 10: SI-443-1 a 4; linhas 11 a 14 padrões *C. neoformans* VNI-VNIV; linhas 15-18 padrões *C. gattii* VGI-VGIV e linha 19 peso molecular de 100pb.

6.6- IDENTIFICAÇÃO DO TIPO SEXUADO (MATING TYPE) POR PCR.

Todos os 48 isolados analisados apresentaram banda de 101bp, o que indica *MATalfa*. A figura 6.4 que se segue ilustra os resultados obtidos de um isolado por residência analisada.

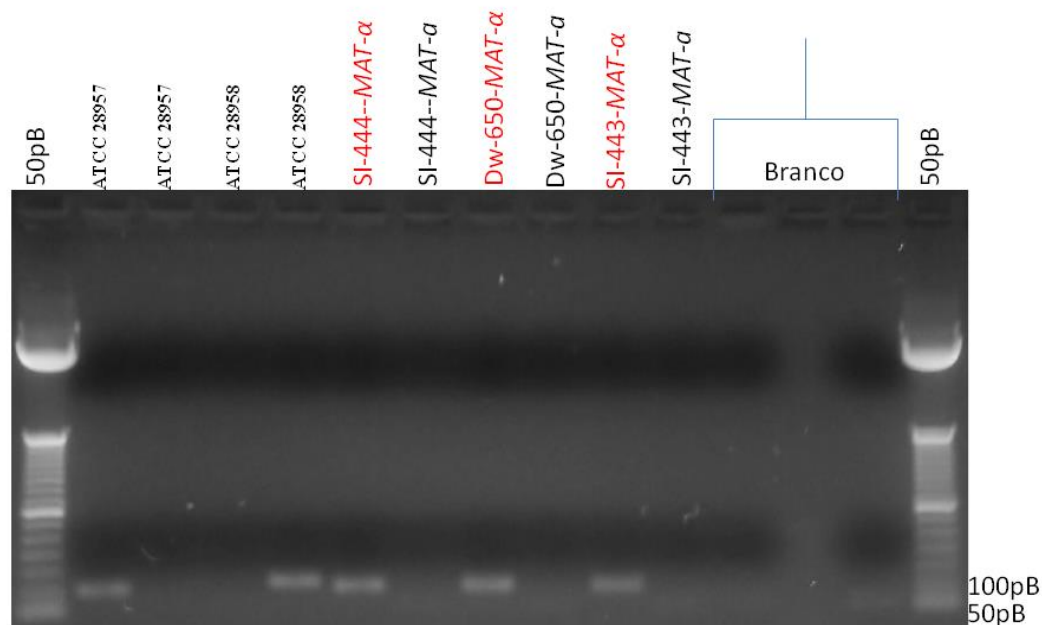


Figura 6.4: Caracterização do Tipo sexuado *MAT α* e *MAT α fa*. Eletroforese em gel de agarose 2% revelando o produto do PCR do tipo sexuado. Resultados ilustrativos de 3 isolados, um de cada domicílio, demonstrando a identificação de um único tipo sexuado *MAT α fa*, assim distribuídos: Linha 1 e 15 peso de 50pB; Linhas 2-3 *C. neoformans MAT α fa* ATCC 28957; Linhas 4-5 *C. neoformans MAT α* ATCC 28958; Linhas 6-7 SI-444; Linhas 8-9 DW-650; Linhas 10-11 SI-443; Linhas 12,13 e 14 controle negativo.

6.7 - ANÁLISES POR SEQÜENCIAMENTO DE MÚLTIPLOS *LOCI* (MLST)

A análise por seqüenciamento de múltiplos *Loci* (MLST) foi feita em 45 isolados, num total de 4108 pb analisados. Observaram-se 27 sítios polimórficos em 6 dos 7 loci estudados (*CAP59*, *GPD1*, *IGS1*, *PLB1*, *SOD1*, *URA5*) (quadro 6.2).

Quadro 6.2: Sítios polimórficos na análise conjunta dos 7 loci (*CAP59*, *GPD1*, *IGS1*, *LAC1*, *PLB1*, *SOD1*, *URA5*)

Posição	1 1 1 2 2 2 2 2 2 2 2 2 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3																											
	2 4 4 6 8 4 4 6 3 4 5 6 7 8 8 9 0 2 2 2 3 3 3 3 3 6 7																											
8 2 2 6 6 7 0 2 6 5 5 7 7 7 0 6 2 4 1 6 9 2 5 6 7 8 1																												
0 1 5 1 5 7 8 4 0 7 1 1 6 8 6 4 6 0 6 4 3 5 6 4 9 8 2																												
DW01	T	G	C	T	T	G	A	A	C	A	G	C	A	A	A	A	T	G	C	C	G	G	C	A	A	C	C	
DW02	C	A	.	.	C	.	G	.	T	G	G	C	C	.	T	A	A	
DW03	.	.	T	T	T	.	.	A	A	G	G	T	.	
DW04	.	.	T	T	T	.	.	A	A	G	G	T	.	
DW05	
DW06	.	.	T	T	T	.	.	A	A	G	G	T	.	
DW07	
DW08	
DW09	
DW10	
DW11	
DW12	
DW13	C	A	.	.	C	.	G	.	T	G	.	.	.	T	.	.	A	A	G	G	.	.	
DW14	
DW15	
DW16	
DW17	
DW18	
DW19	
DW21	.	.	T	T	T	.	.	A	A	G	G	T	.	
DW22	
DW23	C	A	.	.	C	.	G	.	T	G	G	C	C	.	T	A	A		
DW24	
DW25	
DW26	
DW27	
DW28	
DW29	.	.	T	T	T	.	.	A	A	G	G	T	.	
DW30	.	.	T	T	T	.	.	A	A	G	G	T	.	
DW39	
SI13	C	.	T	.	C	A	.	.	T	G	C	T	C	.	G	G	.	.	T	.	.	A	.	.	.	T	.	
SI14	C	.	T	.	C	A	.	.	T	G	C	T	C	G	G	G	.	.	T	.	.	A	.	.	.	T	.	
SI15	C	.	T	.	C	A	.	.	T	G	C	T	C	G	G	G	.	.	T	.	.	A	.	.	.	T	.	
SI16	C	.	T	.	C	A	.	.	T	G	C	T	C	G	G	G	.	.	T	.	.	A	.	.	.	T	.	
SI17	.	A	.	C	.	.	.	C	T	G	C	T	C	G	G	G	.	.	T	.	.	A	.	.	.	G	.	
SI18	C	.	T	.	C	A	.	.	T	G	C	T	C	G	G	G	.	.	T	.	.	A	.	.	.	T	.	
SI19	C	.	T	.	C	A	.	.	T	G	C	T	C	G	G	G	.	.	T	.	.	A	.	.	.	T	.	
SI20	C	.	T	.	C	A	.	.	T	G	C	T	C	G	G	G	.	.	T	.	.	A	.	.	.	T	.	
SI21	C	.	T	.	C	A	.	.	T	G	C	T	C	G	G	G	.	.	T	.	.	A	.	.	.	T	.	
SI22	C	.	T	.	C	A	.	.	T	G	C	T	C	G	G	G	.	.	T	.	.	A	.	.	.	T	.	
SI23	C	.	T	.	C	A	.	.	T	G	C	T	C	G	G	G	.	.	T	.	.	A	.	.	.	T	.	
SI24	C	A	.	.	T	G	C	T	C	G	G	G	.	.	T	.	.	A	.	.	.	T	.	
SI26	C	.	T	.	C	A	.	.	T	G	C	T	C	G	G	G	.	.	T	.	.	A	.	.	.	T	.	
SI27	C	.	T	.	C	A	.	.	T	G	C	T	C	G	G	G	.	.	T	.	.	A	.	.	.	T	.	
SI444
Loci	CAP59				GPD1				IGS1				PLB1				SOD1				URA5							

Quadro 6.3. Perfil de alelos dos genes identificados para cada um dos 45 isolados de poeira domiciliar e subtipos (ST) correspondentes.

Amostras	Cepas	<i>CAP59</i>	<i>GPD1</i>	<i>IGS1</i>	<i>LAC1</i>	<i>PLB1</i>	<i>SOD1</i>	<i>URA5</i>	ST
DW650	DW01	2	6	10	4	2	15	2	7
	DW05	2	6	10	4	2	15	2	7
	DW07	2	6	10	4	2	15	2	7
	DW08	2	6	10	4	2	15	2	7
	DW09	2	6	10	4	2	15	2	7
	DW10	2	6	10	4	2	15	2	7
	DW11	2	6	10	4	2	15	2	7
	DW12	2	6	10	4	2	15	2	7
	DW14	2	6	10	4	2	15	2	7
	DW15	2	6	10	4	2	15	2	7
	DW16	2	6	10	4	2	15	2	7
	DW17	2	6	10	4	2	15	2	7
	DW18	2	6	10	4	2	15	2	7
	DW19	2	6	10	4	2	15	2	7
	DW22	2	6	10	4	2	15	2	7
	DW24	2	6	10	4	2	15	2	7
	DW25	2	6	10	4	2	15	2	7
	DW26	2	6	10	4	2	15	2	7
	DW27	2	6	10	4	2	15	2	7
	DW28	2	6	10	4	2	15	2	7
DW39	2	6	10	4	2	15	2	7	
SI443	DW02	3	16	15	4	9	23	2	5
	DW23	3	16	15	4	9	23	2	5
	DW13	3	16	15	4	9	27	2	265
	DW03	21	6	25	4	2	27	7	264
	DW04	21	6	25	4	2	27	7	264
	DW06	21	6	25	4	2	27	7	264
	DW21	21	6	25	4	2	27	7	264
	DW29	21	6	25	4	2	27	7	264
	DW30	21	6	25	4	2	27	7	264
	SI14	1	1	4	4	1	14	7	20
SI15	1	1	4	4	1	14	7	20	
SI16	1	1	4	4	1	14	7	20	
SI18	1	1	4	4	1	14	7	20	
SI19	1	1	4	4	1	14	7	20	
SI20	1	1	4	4	1	14	7	20	
SI21	1	1	4	4	1	14	7	20	
SI22	1	1	4	4	1	14	7	20	
SI23	1	1	4	4	1	14	7	20	
SI26	1	1	4	4	1	14	7	20	
SI27	1	1	4	4	1	14	7	20	
SI13	1	1	4	4	16	14	7	266	
SI24	2	1	4	4	1	14	7	267	
SI17	69	6	82	4	1	14	6	268	
SI444	SI444	2	6	10	4	2	15	2	7

VGIIb

VGIIa

VGIIb

O quadro 6.3 mostra o resumo dos alelos discriminados por cores na ordem decrescente de frequência (maior para a menor frequência: verde, laranja, lilás, amarelo e azul) para visualização da distribuição de alelos encontrados para cada gene e subtipos moleculares identificados em 45 isolados ambientais. A análise individual de cada marcador demonstra que os marcadores mais heterogêneos foram IGS1 e *CAP59* com 5 alelos, *PLB1* e *SOD1* apresentaram 4 alelos, *GPD1* e *URA5* apresentaram 3 alelos e *LAC1* somente 1 alelo. No total foram identificados 8 diferentes genótipos de *C. gattii* VGII presentes na poeira domiciliar das casas estudadas. A amostra DW-650 apresentou 4 subtipos (genótipos) em 30 isolados analisados, sendo que o predominante (21/30 isolados) foi o VGIIb (ST7), um dos genótipos responsável pela epidemia de Vancouver, Canadá. Foram identificados dois novos subtipos (STs 264 e 265) exclusivos da região, sendo que um deles, ST 264, possui 6 isolados. Já na amostra SI443 a grande maioria das colônias (11/14) isoladas foi identificada como VGIIa (ST20), o subtipo mais virulento e predominante da epidemia do Canadá, sendo os outros 3 subtipos (STs 266, 267, 268) novos no banco de dados e exclusivos da região. Na amostra SI444 foi isolado apenas uma colônia identificada como VGIIb.

6.7.1 Análise filogenética dos 45 isolados ambientais de *C. gattii*

Análise filogenética resultou claramente em dois agrupamentos principais, um correspondendo ao domicílio DW-650 e o outro correspondendo ao domicílio SI443 (Figura 6.5). Os isolados do domicílio DW-650 foram um grande agrupamento com o subtipo VGIIb, seguindo-se os demais subtipos ST264 e 265. O domicílio SI443, com menor número de amostras, apresentou um agrupamento maior representado pelos subtipos VGIIa, ramificações individuais representadas pela cepa padrão e 3 subtipos exclusivos do Brasil. O único isolado do domicílio SI444 alinhou-se com 100% de similaridade aos isolados do grupo ST 7/VGIIb. Em resumo observou-se um agrupamento relacionado ao domicílio DW-650, distinto do agrupamento do domicílio SI-443, sendo que o terceiro domicílio, com um único isolado, agregou-se ao domicílio DW-650. Dentro dos dois grupos distintos observados, nenhum apresentou o ST semelhante à cepa tipo WM178/ST21/VGII da Austrália.

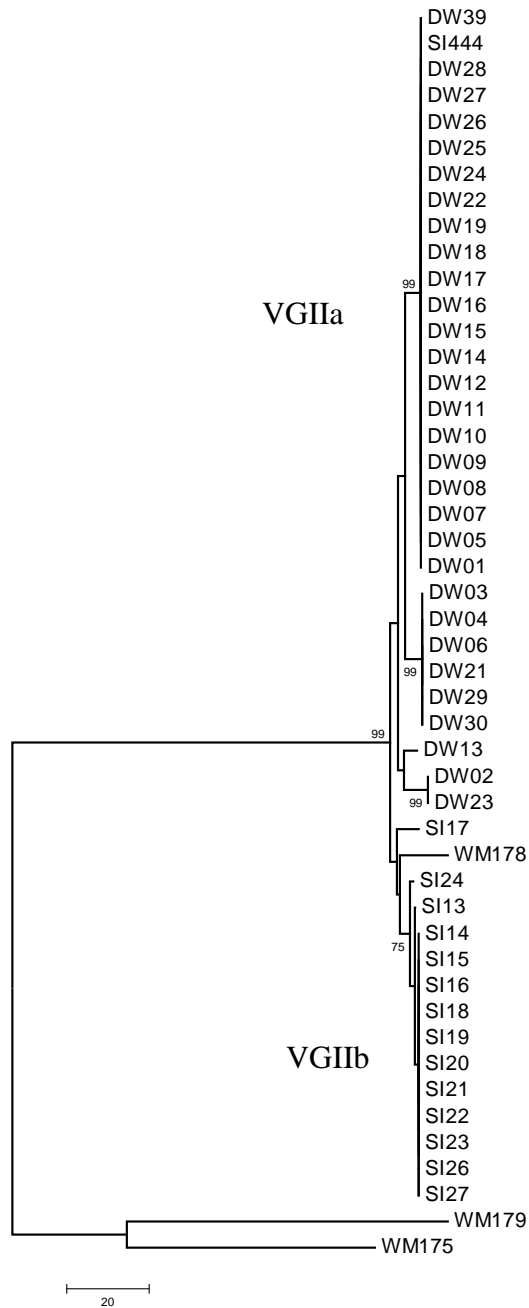


Figura 6.5: Árvore filogenética neighbor-joining a partir das sequências combinadas dos genes *CAP59*, *GPD1*, *LAC1*, *SOD1*, *URA5*, *PLB1* e IGS dos 45 isolados ambientais testados neste estudo. Os números sobre os ramos são valores de suporte de bootstrap obtidos a partir de 1000 pseudo-repetições. O isolado padrão WM178 (VGII) foi utilizado para comparação e WM179 (VGIII) e WM175 (VGI) como “outgroup”.

7-DISCUSSÃO:

A criptococose e seus agentes têm sido progressivamente estudados nas últimas décadas. Inicialmente as investigações foram induzidas pela pandemia da AIDS e progressão da infecção pelo HIV ao nível mundial. Tornou-se evidente a importância da criptococose como doença associada a AIDS e importante causa de morte para esse grupo de risco ao lado da tuberculose. Em meio aos avanços de diagnóstico e tratamento da criptococose observou-se o incremento significativo de estudos ambientais buscando conhecer melhor o micro habitat, ciclo de vida e as fontes com risco de infecção humana. Na última década, outro aspecto da criptococose, até então considerada ocasional, periférica, tropical ou subtropical, passou a apresentar importância crescente. Causa de infecção fatal e meningocelalite em hospedeiros aparentemente normais, a criptococose por *C. gattii* estendeu-se progressivamente abrangendo áreas temperadas e com caráter epidemiológico diferenciado de expansão geográfica, possibilidade de surtos e emergência de variantes virulentas. Nenhum hospedeiro animal foi observado como significativo no ciclo de vida desse agente, tampouco tem um papel importante na transmissão entre humanos e animais (Mitchell 1995). Portanto a infecção criptocócica é invariavelmente adquirida por exposição a fontes exógenas, sendo os reservatórios dos agentes da criptococose, particularmente de *C. gattii*, de fundamental interesse para compreender a dinâmica e adaptação do ciclo de vida em meio ambiente progressivamente antropizado, bem como buscar responder à principal pergunta; como o ser humano adquire essa infecção e quais os meios para evitá-la ou reduzir riscos.

Originalmente a investigação intensiva do habitat de pombo em diferentes continentes levou ao isolamento exclusivo de *C. neoformans* e ao desconhecimento do habitat primário natural dos agentes da criptococose por longo tempo. *C. gattii* tem sido isolado repetitivamente de madeira em decomposição de árvores de diferentes espécies em diferentes países do mundo. Algumas vezes *C. gattii* é co-isolado com *C. neoformans* nestes microambientes relacionados à decomposição de substratos ricos em lignina e, possivelmente, ao micro habitat dos agentes da criptococose (Lazéra *et al*, 2000). A lista de espécies de árvores das quais *C. gattii* e/ou *C. neoformans* são isolados é crescente, tais como na Argentina e Colômbia (15 gêneros); Canadá, México e Estados Unidos (9 gêneros); Índia (11 gêneros), Espanha e Holanda (4 gêneros) e Austrália (2 gêneros). No Brasil *C. neoformans* foi descrito (14 gêneros de árvores) e *C. gattii* em (7 gêneros) (Barbosa *et al*. 2013).

Estudos pioneiros realizados na África Central que estava em plena efervescência da criptococose associada a AIDS no final da década de oitenta levaram Swinne e colaboradores (1989) a estudar o ambiente domiciliar destes pacientes. Supreendentemente um elevado número de amostras de poeira analisadas foram positivas, tendo sido isolado *C. neoformans var. neoformans* (corresponde a *C. neoformans* na taxonomia atualmente aceita) de 7 domicílios de 20 pacientes com criptococose associados a AIDS. Em estudo posterior em Bujumbura, Burundi, Swinne e colaboradores (1991) analisaram 375 amostras de poeira domiciliar de 25 casas de pacientes com AIDS e criptococose, observando 54% de positividade nas casas estudadas. Outro estudo de porte similar foi realizado na cidade do Rio de Janeiro por Passoni e colaboradores (1998). Os autores analisaram 154 domicílios de pacientes da região metropolitana e encontraram 13% dos domicílios positivos para *C. neoformans*. Demonstrou também que pacientes com AIDS que moravam em domicílios com poeira positiva apresentavam um risco aumentado de adquirir criptococose. O principal fator associado à presença de *C. neoformans* no ambiente intradomiciliar, apontado por este autor, foi a ocorrência de criadouros ou gaiolas de aves positivas no ambiente peridomiciliar. Neste estudo não houve isolamento de *C.gattii* (Passoni *et al.* 1995).

Um estudo realizado no Nordeste do Brasil (Maranhão e Piauí) em trabalho de tese de Cavalcante (1995) analisou amostras de poeira em 39 domicílios, encontrando positividade em 8 (21%). Os agentes isolados foram *C. neoformans* e *C. gattii*. Outro estudo de tese realizado em Belém do Pará por Costa (2003) revelou a presença de ambas as espécies dos agentes da criptococose em amostras coletadas no intra e peridomicílio. Foram analisados 8 domicílios dos quais 3 foram positivos. De 186 amostras analisadas, 22 (11,8%) revelaram colônias fenoloxidase positivas suspeitas. Especificamente, com relação à poeira domiciliar, a positividade foi de 10/53 amostras (18%) com contagem de colônia de $1,5 \times 10^2$ até 75×10^2 UFC/g com a presença de *C. neoformans* VNI MATalfa (45,55%), *C. gattii* VGII MATalfa (18,64%) e *C. gattii* VGII MATalfa/a (0,45%), de um total de 140 isolados analisados (Costa *et al.*2009).

Em estudo realizado na cidade de Barcelona, 100 amostras de poeira domiciliar foram obtidas de 100 residências, das quais 7 eram casas de pacientes com AIDS e criptococose, 15 eram de pacientes com AIDS sem criptococose e 78, de indivíduos saudáveis. Todas as amostras foram negativas para os agentes da criptococose (Morera-López *et al.*2005)

O presente estudo baseou-se em trabalho de campo realizado em área da Amazônia ocidental, motivado pela positividade em poeira domiciliar observada em estudo similares nas

regiões Norte, Nordeste e Sudeste do Brasil. Esses estudos previamente citados estiveram relacionados a casos de criptococose com ou sem AIDS, realizados em áreas urbanas e não são comparáveis entre si, nem com o presente trabalho do ponto de vista metodológico. Com relação à coleta de amostra em domicílio o modelo de estudo da Espanha utilizou a varredura completa do domicílio utilizando uma amostra representativa por domicílio, similar ao presente estudo.

Santa Isabel do Rio Negro é uma cidade localizada na região do alto do Rio Negro no estado do Amazonas. Na região amazônica a criptococose por *C. gattii* ocorre de forma endêmica, o que pode ser constatado por diversos estudos realizados no estado do Pará (Santos 2001, Trilles *et al.* 2008; Correa *et al.* 2002) e alguns no estado do Amazonas (Freire *et al.* 2012). O estudo realizado em Santa Isabel do Rio Negro não foi relacionado a casos-índice de criptococose e nem a eventuais relatos da comunidade local. A positividade encontrada na poeira doméstica por residência analisada (3/51 - 5,88%) foi menor do que a encontrada em Belém do Pará (3/8 - 37,5%). No caso da área em estudo, os domicílios foram examinados ao acaso, sendo observadas duas áreas principais de agregação das casas. Chama a atenção o fato de que na área mais antiga do município todas as casas analisadas foram negativas: 38 casas, das quais 28 tiveram a localização definida por GPS e 10 foram relacionadas a essa área através de seus endereços. Por outra lado, na área mais nova, resultante de crescimento periférico, 3 (23%) das 13 casas foram positivas exclusivamente para *C. gattii* VGII, enquanto que nos estudos já relatados ambos os agentes foram isolados e com o predomínio de *C. neoformans* sobre *C. gattii*. Portanto o isolamento exclusivo de *C. gattii* VGII em Santa Isabel do Rio Negro chama a atenção e constitui o primeiro isolamento ambiental desta espécie e tipo molecular no estado da Amazônia, uma vez que existe somente um relato prévio de isolamento de *C. neoformans* em 2 árvores numa trilha (Restrepo *et al.* 2000; Trilles *et al.* 2008). De fato ao norte do estado da Amazônia, em Roraima, *C. gattii* VGII foi isolado de árvore nativa da ilha de Maracá, sugerindo habitat primário deste agente em ambientes preservados da floresta amazônica (Fortes *et al.* 2001).

A identificação dos nossos isolados levou à caracterização de *C. gattii* VGII, confirmado por testes fenotípicos e também por métodos de tipagem molecular. No entanto o sistema automatizado VITEK 2, também utilizado neste trabalho, não prevê a distinção entre *C. neoformans* e *C. gattii*, denominando a ambos indiscriminadamente como *C. neoformans*. Além do mais, esse sistema automatizado registrou em resultados uma informação de contradição: o perfil biológico típico esperado pelo sistema prevê para *C. neoformans* a não-assimilação de

ácido málico. No entanto, os 48 isolados assimilaram esta fonte de carbono em até 19h. De fato estudos anteriores indicam que *C. gattii* utiliza ácido málico como fonte de carbono e pode crescer 10 vezes mais em 48h do que *C. neoformans*, o qual pode levar até 5 dias para crescer ou não nessa fonte de carbono. Portanto, a assimilação rápida de ácido málico pode distinguir as duas espécies e o curto tempo de leitura utilizado no VITEK 2 correlaciona-se com a identificação de *C. gattii* no presente estudo (Kwon-Chung & Bennett, 1992).

Com relação ao tipo sexuado todos os 48 isolados de *C. gattii* VGII apresentaram exclusivamente *MATalfa*. Em estudo de 54 isolados (14 isolados clínicos, 28 isolados veterinários e 12 isolados ambientais) de *C. gattii* VGII de várias regiões da Austrália, 52 eram *MATalfa* e 2 *MATa* (Carriconde *et al.* 2011). No Canadá, estudo de tipo sexuado através de cruzamento *in vitro* com cepas padrão demonstrou que 82 isolados (clínicos e ambientais) eram *MATalfa*. (Kidd *et al.* 2004). Sem dúvida, a maioria dos estudos demonstra o predomínio de *MATalfa*. No presente estudo não é possível excluir a ocorrência de *MATa* no ambiente, vinculado ou não ao tipo VGII, pois se o número de amostras for aumentado há a possibilidade de detecção do mesmo. Assim, o padrão de distribuição do tipo sexuado em Santa Isabel do Rio Negro mostra-se similar ao observado na maioria dos estudos, sugerindo o predomínio de expansão clonal, mitótica deste agente na poeira domiciliar. Cabe comentar sobre os isolados da Colômbia onde *MATa* ocorre mais frequentemente (Escandón *et al.* 2006), consistente com ocorrência de recombinação entre isolados. Também sobre os isolados em domicílios em Belém do Pará, observou-se predomínio do *MATalfa*, mas foi registrada a presença de *C. gattii* VGII *MATalfa/a* sugerindo a ocorrência de recombinação (Costa *et al.* 2009).

Sobre o contexto da expansão dos agentes da criptococose por todo mundo, existe uma essencial necessidade de compreender a taxonomia, epidemiologia, ecologia e estrutura populacional desses agentes (Carriconde *et al.* 2011). O estudo da estrutura populacional pelo MLST é uma ferramenta recente que vem sendo aplicada cada vez mais em estudos epidemiológicos moleculares. Com base no estudo de polimorfismo de genes constitutivos relacionados à virulência dos agentes da criptococose essa técnica fornece dados de origem do isolado, sendo possível determinar se os mesmos são oriundos de expansão clonal ou de recombinação. A necessidade de estudar a origem do microorganismo partiu da extensa e contínua ocorrência de surtos por *C. gattii* em regiões temperadas, onde essa micose não era endêmica. Inicialmente, através da análise de isolados do surto de Vancouver, observou-se variabilidade entre os mesmos, com a identificação de dois subtipos VGIIa e VGIIb, sendo o

primeiro predominante (Galanis *et al.* 2010). Um estudo de isolados VGII na costa pacífica dos EUA (Califórnia, Idaho, Oregon e Washington), identificou VGIIa, VGIIb e pela primeira vez o VGIIc (Byrnes *et al.* 2009; CDC, MMWR,2010; Harris *et al.* 2011). Do ponto de vista epidemiológico, é importante considerar que já foram diagnosticados casos de criptococose na Dinamarca, Holanda, Alemanha e Suíça cujo agente foi *C. gattii* VGIIa. Esses pacientes desenvolveram a micose após ter visitado a Ilha de Vancouver, portanto, na análise de isolados clínicos deve-se ter sempre em conta a possibilidade de viagens e importação de casos relacionados a surtos provenientes de outras regiões geográficas (Hagen *et al.*2012).

Os estudos por MLST proporcionaram crescente identificação de ST (subtipos) para os agentes da criptococose e atualmente são mais de 200 descritos somente para *C. gattii*. Estudo realizado em 54 isolados *C. gattii* VGII de origem clínica, veterinária e ambiental de diferentes regiões da Austrália e 17 isolados da América do Norte, Ásia e América do Sul demonstrou um limitado número de subtipos de VGII e evidenciou expansão clonal para o ST7/VGIIb, que predominou entre os isolados australianos (72%) e corresponde à cepa de referência CDC R272 (VGIIb) identificado em Vancouver. Nenhum dos isolados australianos correspondeu à cepa de referência CDC R265 (VGIIa). Os autores comentam ainda a detecção de dois isolados *MATa* pertencentes ao ST38 indicando que de acordo com ciclo natural de *C. gattii* pode ter ocorrido também recombinação sexuada na formação inicial da estrutura dessa população seguida de expansão clonal, sugerindo que estudos sejam feitos envolvendo principalmente situações de surto. Encontrou ainda 2 isolados ST38, 1 isolado ST5 e ST21, 5 isolados ST33 e 6 isolados ST48 (Carriconde *et al.*2011)

No caso dos isolados de Santa Isabel do Rio Negro foi encontrado um total de 8 subtipos de VGII provenientes de 3 domicílios localizados em uma pequena área de aproximadamente 5Km². Chama atenção a diversidade de subtipos encontrados nessa área quando comparando com Vancouver com 2 subtipos, Austrália com 6 subtipos de diferentes regiões. Além do mais, a maior diversidade de subtipos de VGII tem sido observada na América do Sul, incluindo Brasil (Piauí, Rio de Janeiro, Roraima) com STs 4, 11, 16, 26, 27 e Uruguai com ST3 entre outros (Carriconde *et al.*2011). Quanto ao predomínio dos subtipos, o presente estudo mostra separação dos dois subtipos VGIIa e VGIIb por cada domicílio, sugerindo expansão localizada de cada um deles nestes micro ambientes e, portanto, tendência a distribuição focal e dispersão heterogênea, mesmo em pequenas áreas. Uma das casas (DW-650), que tem predominância de VGIIb, inclui também 2 isolados ST5. Da mesma forma os isolados da Austrália apresentam predomínio de

VGIIB e também incluem o ST5. De fato, no presente estudo, estes dois isolados ST5 se agregaram num “cluster” distinto, porém similar ao “cluster” dos isolados VGIIB, sugerindo que a dispersão dos subtipos não ocorre ao acaso por dispersão mecânica, como vento, transporte externo por animais ou humanos, mas pelo contrário, pode refletir mecanismo de reprodução no ambiente doméstico, com expansão clonal separadamente para VGIIa e VGIIB.

O presente estudo não se compara aos demais, já que em geral são analisados isolados provenientes de distantes áreas geográficas. Pela primeira vez foi identificado *C. gattii* VGII de fonte ambiental no estado do Amazonas, que se inclui na área endêmica de criptococose primária por este genótipo (Trilles *et al.*2007). Além do mais, o substrato positivo encontrado foi do ambiente domiciliar, sendo que duas das casas positivas apresentaram significativa densidade deste agente (2.500 UFC/g e 50.000 UFC/g de poeira), densidade esta equivalente ou maior do que aquelas descritas em habitats naturais como madeira em decomposição em árvores, ou em poeira domiciliar em Belém (150 a 7.500 UFC/g). O único estudo anterior de amostras ambientais por MLST analisou somente 12 amostras diversas (eucalipto, madeira sem origem especificada e ninho de marimbondo abandonado) (Carrionde *et al.* .2011). As amostras de poeira domiciliar mostram-se um bom substrato para isolamento dos agentes da criptococose, até então investigados em habitats naturais ou fontes adaptadas a áreas urbanizadas. As casas estudadas, construídas com tábuas, portas e janelas de madeira, chão de cimento, teto de amianto ou madeira, protegidos da iluminação direta e do vento constituem microambientes favoráveis à sobrevivência destes agentes, que parecem bem adaptados. A possibilidade de reprodução fúngica no ambiente, intradomiciliar, precisa ser mais bem estudada no futuro, pois a poeira representa um substrato de constituição diversa, orgânica e particulada. A casa, por ser constituída de madeira não tratada, pode apresentar pequenas áreas de decomposição, com perda de fragmentos que vão se juntar aos detritos da poeira. É possível que *C. gattii* VGII se reproduza sob forma de levedura, de forma mitótica, nestes substratos secos? Ou que a umidade acumulada na casa, ou as chuvas periódicas proporcionem condições satisfatórias para o crescimento sob forma de leveduras? As amostras do estudo foram coletadas no período de seca do Rio Negro. Não sabemos o que ocorreria com as amostras durante o período de cheia desse rio. De qualquer maneira, sem dúvida, este agente sobrevive a estes períodos de variação climática. Em estudo realizado em ocos de árvores no Piauí, observou-se persistente colonização de ocos de árvores, mesmo naquelas que tiveram suas cavidades queimadas por ação humana, e que tornaram a apresentar positividade meses depois (Lazéra *et al.* .2000). Além do mais, já foi observado que

amostras em ocos de árvores podem permanecer longo tempo positivas, por anos, mesmo sob diferentes condições de pluviosidade, uma vez que a chuva encharca esses ocos, mas em seguida o fungo volta a ser isolado destes ambientes (Alvarez *et al.*2013; Lazéra *et al.*2000). Portanto, este agente tem mecanismos de sobrevivência e adaptação em diversos ambientes e, possivelmente também no ambiente domiciliar. Podemos então supor que o domicílio além de casa para humanos, possa a abrigar também *Cryptococcus* patogênico, propiciando uma exposição contínua fungo-hospedeiro.

Uma vez presente em densidade elevada nestes domicílios, estes agentes que estão relacionados a surtos (VGIIa e VGIIb) devem ser inalados cotidianamente pelos moradores. Por que não encontramos evidências de surtos de criptococose no local? De fato, é possível que casos de criptococose tenham ocorrido sem diagnóstico, ou diagnosticado em centros distantes, aspecto que precisa ser revisto nos registros regionais de diagnóstico de meningites ou de criptococose no estado do Amazonas. No entanto, um perfil de surto não é relatado pelos moradores, que foram entrevistados, mas não houve perguntas dirigidas, específicas de ocorrência de criptococose.

Se consideramos a questão da virulência, atribuída principalmente ao VGIIa *MATalfa*, o mesmo perfil foi encontrado em um dos domicílios estudados. Para outros autores, devem-se considerar também outros fatores dos hospedeiros (fatores imunológicos) e achamos também que as condições do ambiente de exposição à fonte de risco precisam ser mais bem estudadas. Por exemplo, a inalação de leveduras pode ser menos infectante ou patogênica do que basidiósporos resultantes de ciclo sexuado no ambiente.

Fraser e colaboradores (2005) sugerem que o surto de Vancouver foi causado primariamente por um evento recombinante, entre cepas de mesmo tipo sexuado (*MATalfa/alfa*), variante do ciclo sexuado clássico alfa/a, denominado “same sex mating”. Este ciclo seria apto a produção de basidiósporos, estrutura mais resistentes, capazes de expandir geograficamente, ampliando nichos naturais e produzindo infecções em áreas onde a micose não era identificada. Além disso, este ciclo recombinante propicia o surgimento de variantes, sendo possível que dentre estes, VGIIa e VGIIb tenham se adaptado e posteriormente expandido clonalmente. Mas qual a origem destes agentes no caso de Santa Isabel do Rio Negro? Trabalho realizado em mata da Floresta Amazônica, numa ilha fluvial quase sem interferência antrópica, *C.gattii* VGII foi isolado de árvore nativa (*Guettarda* sp.), sendo este o único isolado VGII conhecido proveniente de ambiente primário, da floresta amazônica (Fortes *et al.*2001).

Florestas tropicais são ambientes originais e abrigam nichos primários de vários microorganismos. A produção de lacase por agentes da criptococose, enzima relacionada à degradação de madeira, facilita o crescimento saprofito neste tipo de substrato em ocos de árvores, que representam habitats naturais primário de *C. gattii* e *C. neoformans*. Além do mais, estes agentes são filogeneticamente relacionados a outros grupos decompositores de madeira, pertencentes à família Tremellaceae (Lazéra *et al.* 2000). A origem do surto no Canadá, para Fraser e colaboradores (2005), se inicia a partir de isolados de *C. gattii* MATalfa da Austrália, que alcançou a costa pacífica da América do Norte através da exportação de eucalipto e, ao chegar no Canadá, ocorreu um evento recombinante alfa-alfa, dando origem à variante virulenta que causou o surto. Está claro que os autores não levaram em consideração os achados brasileiros (Trilles *et al.* 2003, Nishikawa *et al.* 2003). Em estudo de tipos moleculares de 443 isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* (Trilles *et al.* 2008), ficou evidente que *C. gattii* VGII ocorre no meio ambientes associados a árvores das regiões N e NE do Brasil (desde a Amazônia até a caatinga) e é o principal agente de criptococose endêmica em hospedeiros normais, não HIV, nestas amplas regiões do país. Além disto, o trabalho ressalta que o primeiro isolado identificado como VGII foi isolado de paciente originário da região Nordeste do país em 1988, sugerindo que a presença do VGII no Brasil não é um evento recente, sendo identificado no país nos últimos 20 anos. Portanto, o registro de infecção humana por *C. gattii* VGII ocorre no Brasil desde período anterior ao surto de Vancouver.

Em torno das casas positivas na cidade estudada, não havia árvores para coleta de amostras, uma vez que tinham sido cortadas durante a ocupação e construção de residências. No limite destas áreas irregularmente ocupadas já dentro da floresta, não foi programada coleta de amostras. É possível que nestes ambientes de transição, os ocos das árvores revelem a presença de *C. gattii* como reflexo de seu habitat original. Observamos que postes rústicos (de troncos de árvores) são utilizados por toda a cidade para sustentação dos fios elétricos. São postes de madeira não tratada, apresentando focos de decomposição e cavidades em formação. É possível que representem um estágio de transição e adaptação destes agentes, possibilitando a dispersão secundária para os ambientes domiciliares, funcionando como corredores biológicos.

Os processos de construção das cidades causaram profundas alterações dos ecossistemas naturais do planeta. Compreender melhor essa interação entre o homem e o ambiente natural no qual as cidades se inseriram e transformaram é um dos aspectos da chamada ecologia urbana (Collins *et al.* 2000). Achados anteriores mostram positividade dos agentes da criptococose

associados a árvores em ambientes urbanos em cidades como Rio de Janeiro, Teresina, São Paulo, Belém, Boa Vista e também em cidades de outros países. A tolerância ao calor e adaptação a bruscas mudanças climáticas são importantes fatores de sobrevivência de microorganismos nestes ambientes. Sob este aspecto, a termotolerância em torno de 35°C dos agentes da criptococose constitui um fator favorável à sua sobrevivência no meio urbano e, por outro lado, os microambientes dos ocos propiciam proteção da luz solar direta, do vento e promovem o acúmulo de matéria orgânica.

A cidade de Santa Isabel poderia ser utilizada como um modelo natural de estudo para entender como as fontes originais de *C. gattii* do ecossistema amazônico se comportam em face do processo de ocupação urbana e de como esse conjunto de mudanças expõe o homem à infecção por este agente, seja de forma subclínica, seja como micose endêmica ou epidêmica.

8-CONCLUSÕES

- Pela primeira vez no estado do Amazonas *C. gattii* MATalfa foi isolado do ambiente, especificamente em poeira coletada do intradomicílio de residências da cidade de Santa Isabel do Rio Negro, localizada em área de desmatamento da floresta Amazônica e às margens do Rio Negro.
- Com relação à concentração do fungo na poeira das casas positivas, foi possível estimar uma variação de 50 colônias por grama em uma casa e elevadas concentrações nas duas outras casas, com 2.500 colônias/g e 50.000 colônias por grama cada, demonstrando distribuição heterogênea do agente nestes ambientes.
- A identificação fenotípica padrão (CGB, Níger, Agar Uréia) foi capaz de identificar todos os isolados desse estudo ao nível de espécie, porém a utilização do sistema automatizado Vitek 2 não permitiu a identificação de *C. gattii*, que foi identificado como *C. neoformans*. Há necessidade de revisão deste método, originalmente programado para identificação de *C. neoformans*, sendo importante considerar a assimilação rápida de ácido málico como um possível teste para distinguir *C. gattii* de *C. neoformans* no sistema automatizado.
- A técnica de MLST mostrou ser uma técnica laboriosa, porém uma boa ferramenta para análise epidemiológica molecular.
- A positividade do estudo foi de 3/51 (5,88%), sendo observada expressiva diversidade genética de *C.gattii* VGII, com identificação por MLST de 8 subtipos: VGIIa, VGIIb, ST5, e subtipos novos, ainda não descritos STs 264,265,266,267 e 268.
- Os subtipos genéticos predominantes nos domicílios, VGIIa e VGIIb, foram os mesmos que causaram e epidemia na América do Norte e, no Brasil são endêmicos na Região Norte.
- O conjunto de achados sugere ocorrência de expansão clonal de um subtipo principal por domicílio, onde é possível que haja condições para crescimento deste agente, já que os subtipos principais encontrados, VGIIa e VGIIb, foram identificados em casas distintas.

- As condições do domicílio, com predomínio das estruturas em madeira, podem estar relacionadas à geração de substratos adequados para este agente, que é produtor de enzima relacionada à decomposição de madeira.

9-PERSPECTIVAS

- O retorno ao município de Santa Isabel do Rio Negro se faz necessário, para realização de estudo clínico epidemiológico, iniciando nas casas positivas.
- A primeira etapa do trabalho de campo gerou 172 amostras ambientais de origem diversas, destas somente 51 amostras de domicílio foram analisadas até o momento.
- A realização de pesquisa de antígeno da criptococose utilizando a técnica CRAG pode ser aplicada nesse modelo de trabalho de campo.
- Na primeira etapa do estudo, foi realizado em paralelo inquérito parasitológico. Foi observado que 95% das crianças que participaram do estudo estavam parasitadas ou poli-parasitadas, incluindo as crianças das casas positivas para o agente da criptococose. Mediante esse evento se faz necessário um estudo de possíveis co-infecções *C. gattii* x Helmintos e/ou Protozoários.
- Estudar a virulência dos isolados de *C. gattii* de poeira domiciliar de Santa Isabel do Rio Negro procurando a resposta da não evidência de surto.
- A validação da assimilação rápida de ácido málico para a identificação de *C. gattii* pelo sistema VITEK 2 poderia contribuir para redução no erro de diagnóstico da criptococose com relação a espécie desse agente em laboratórios de rotina da rede pública e particular.

10-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexopoulos CJ, Mims CW 1979. *Introductor Mycology*. 3rd ed. New York, John Wiley & Sons
- Alvarez C, Barbosa GG, de Oliveira Rde V, Morales BP, Wanke B, Lazéra Mdos S; 2013 Techniques for the detection of pathogenic *Cryptococcus* species in wood decay substrata and the evaluation of viability in stored samples. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Feb;108(1):126-9.
- Aminnejad M, Diaz M, Arabatzis M, Castañeda E, Lazéra M, Velegraki A, Marriott D, Sorrell T C, Meyer W 2012. Identification of novel hybrids between *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* VNI and *Cryptococcus gattii* VGII. *Mycopathologia*, v. 173, p. 337-346.
- Barbosa CG, Trilles L, Wanke B, Lazéra M 2013 *Cryptococcus gattii* VGI and *Cryptococcus neoformans* VNI Associated with Wood Decay in Ficus Hollow Trees in Rio de Janeiro, Brazil; *British Microbiology Research Journal* 3(1): 106-115.
- Bartlett KH, Cheng PY, Duncan C, Galanis E, Hoang L, Kidd S, Lee MK, Lester S, Macdougall L, Mak S, Morshed M, Taylor M, Kronstad J 2012. A Decade of Experience: *Cryptococcus gattii* in British Columbia; *Mycopathologia*. Jun;173(5-6):311-9. Epub 2011 Sep 30.
- Bovers, M.; Hagen, F.; Kuramae, E. E.; Hoogveld, H. L.; Dromer, F.; St-Germain, G.; Boekhout, T 2008. AIDS Patient Death Caused by Novel *Cryptococcus neoformans* × *C. gattii* Hybrid. *Emerg. Infect. Dis.*, v. 14, n. 7, p. 1105–1108.
- Boekhout T, Theelen B, Diaz M, Fell JW, Hop WCJ, Abeln ECA, Dromer F, Meyer W 2001 Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology*; 147:891-907.
- Byrnes EJ, Heitman J. 2009. *Cryptococcus gattii* outbreak expands into the Northwestern United States with fatal consequences. *F1000 Biol Rep*. Aug 17;1. pii: 62.
- Botts MR, Giles SS, Gates MA, Kozel TR, Hull CM. (2009). Isolation and characterization of *Cryptococcus neoformans* spores reveal a critical role for capsule biosynthesis genes in spore biogenesis. *Eukaryot. Cell* 8(4), 595–605
- Campbell GD. 1996. Primary pulmonary cryptococcosis. *American Review Respiratory Diseases* 94:236-243.

- Cavalcanti MAS. 1995. Criptococose e seu agente no Meio Norte, estados do Piauí e Maranhão, Brasil. Tese de Doutorado, Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro) e Universidade Federal do Piauí (Teresina).
- Carriconde F, Gilgado F, Arthur I, Ellis D, Malik R, van de Wiele N, Robert V, Currie BJ, Meyer W 2011. Clonality and α -a recombination in the Australian *Cryptococcus gattii* VGII population-an emerging outbreak in Australia. PLoS One. Feb 24;6(2)
- Castro G, Cervi MC, Martinez R. 2006. Vertical transmission of *Cryptococcus neoformans* from a mother coinfecting with human immunodeficiency virus: case report. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39:501-503.
- Casadevall A, Perfect JR 1998. *Cryptococcus neoformans*. ASM Press, Washington DC.
- Casadevall A, Rosas AL, Nosanchuk JD 2000. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Curr. Opin. Microbiol.* 3(4), 354–358.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 2010. Emergence of *Cryptococcus gattii*--Pacific Northwest, 2004-2010. *Morb Mortal Wkly Rep.* Jul 23;59(28):865-8.
- Cogliati M N, Chandrasherkar A, Prigitano MC, Esposto B, Petrini A, Chandramuki M.A;2008. Clinical isolates from an India hospital: an unexpected detection of a serotype C *Cryptococcus gattii* population. 7th International Conference on *Cryptococcus* & Cryptococcosis, Nagasaki, Japan 11 to 14 September 2008, abstract # SY-05-04.
- Collins JP, Kinzig A, Grimm NB, Fagan WF, Hope D, Wu J, Borer ET 2000. A new urban ecology. *American Scientist*;88(5):416-425.
- Correa Mdo P, Oliveira EC, Duarte RR, Pardal PP, Oliveira Fde M, Severo LC 1999.. Cryptococcosis in children in the State of Pará, Brazil *Rev Soc Bras Med Trop.* 32(5):505-8,
- Correa MPSC, Severo LC, Oliveira FM, Irion K, Londero AT 2002. The spectrum of computerized tomography (CT) findings in central nervous system (CNS) infection due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in immunocompetent children. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 44:283-287,
- Costa SP, Lazéra Mdos S, Santos WR, Morales BP, Bezerra Cde C, Nishikawa MM, Barbosa GG, Trilles L, Nascimento JL, Wanke B 2009. First isolation of *Cryptococcus gattii*

- molecular type VGII and *Cryptococcus neoformans* molecular type VNI from environmental sources in the city of Belém, Pará, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Jul; 104(4):662-664.
- Costa S.P.S.E.; Lazera M.S.; Bezerra C.C.F. et al. 2003. Isolamento de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* e var. *gattii* a partir de fontes sapróbias na cidade de Belém – Pará. In: XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2003, Florianópolis. Resumos, São Paulo, Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2003. p. 91.
- Cox GM, Mukherjee J, Cole GT, Casadevall A, Perfect JR 2000. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. *Infect. Immun.* 68(2), 443–448
- Chatuverdi S, Rodeghier B, Fan J, McVlelland CM, Wickes BL & Chatuverdi V 2000. Direct PCR of *C. neoformans* *Mat-a* e *Mat-α* pheromones to determine mating type, ploidy and variety: a tool for epidemiological and molecular pathogenesis studies. *Journal of Clinical Microbiology*, 38:
- Chen LC, Blank ES, Casadevall A 1996.; Extracellular proteinase activity o *Cryptococcus neoformans*. *Clin. D Immunol.* 3(5), 570–574
- Christensen WB. Urea decomposition as a means of differentiating *Proteus* and paracolon cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella*. *J Bacteriol.* 1946; 52:461-466.
- Dannaoui E, Abdul M, Arpin M, Michel-Nguyen A, Piens MA, Favel A, Lortholary O, Dromer F; French Cryptococcosis Study Group 2006. Results obtained with various antifungal susceptibility testing methods do not predict early clinical outcome in patients with cryptococcosis. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 50:2464-2470.
- Diaz, M. R.; Boekhout, T.; Kiesling, T.; Fell, J. W 2004. Comparative analysis of the intergenic spacer regions and population structure of the species complex of the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Yeast Res.*, v. 5, n.12, p. 1129-1140.
- Dismukes WE, Cloud G, Gallis HA, Kerkering TM, Medoff G, Craven PC, Kaplowitz LG, Fisher JF, Gregg CR, Bowles CA, et al.. Treatment of cryptococcal meningitis with combination of amphotericin B and flucytosine for four as compared with six weeks. *New England of Medicine* 317:334-341, 1987.
- Ellis DH, Pfeiffer TJ 1990;. Ecology, life cycle and infectious propagule of *Cryptococcus neoformans*. *Lancet.* **336**:923-925..

- Escandón P, Sánchez A, Martínez M, Meyer W, Castañeda E . 2006. Molecular epidemiology of clinical and environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex reveals a high genetic diversity and the presence of the molecular type VGII mating type a in Colombia. *FEMS Yeast Res*, Jun;6(4):625-35.
- Ferrer C, Colom F, Frases S et al 2001. Detection and identification of fungal pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S ribosomal DNA typing in ocular infections. *J Clin Microbiol* 39:2873–2879;
- Fortes ST 2001.. Fontes sapróbias e sexualidade de isolados clínicos e ambiental de *Cryptococcus (Filobasidiella) neoformans* do estado de Roraima – Brasil. Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz. Tese de Doutorado.
- Fraser JA, Giles SS, Wenink EC, Geunes-Boyer SG, Wright JR, Diezmann S, Allen A, Stajich JE, Dietrich FS, Perfect JR, Heitman J 2005. Same-sex mating and the origin of the Vancouver Island *Cryptococcus gattii* outbreak. *Nature*. 2005 Oct 27;437(7063):1360-4. Epub Oct 9.
- Freire AK, dos Santos Bentes A, de Lima Sampaio I, Matsuura AB, Ogusku MM, Salem JI, Wanke B, de Souza JV 2012. Molecular characterisation of the causative agents of Cryptococcosis in patients of a tertiary healthcare facility in the state of Amazonas-Brazil. *Mycoses*. May;55(3):e145-50
- Galanis E, Macdougall L, Kidd S, Morshed M 2010. British Columbia *Cryptococcus gattii* Working Group. Epidemiology of *Cryptococcus gattii*, British Columbia, Canada, 1999-2007; *Emerg Infect Dis*. Feb;16(2):251-7
- Ganendren R, Carter E, Sorrell T, Widmer F, Wright L 2006.. Phospholipase B activity enhances adhesion of *Cryptococcus neoformans* to a human lung epithelial cell line. *Microbes Infect*. 8(4), 1006–1015
- Geunes-Boyer S, Beers MF, Perfect JR, Heitman J, Wright JR (2012). Surfactant protein D facilitates *Cryptococcus neoformans* infection. *Infect. Immun*. 80(7), 2444–2453
- Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev*. 13(1), 122–143, table of contents (2000)
- Goldman DL, Khine H, Abadi J, Lindenberg DJ, Pirofski LA , Niang R, Casadevall A 2006. Serologic evidence for *Cryptococcus neoformans* infection in early childhood. *Pediatrics*

107:E66, 2001.

Hagen F, Colom MF, Swinne D, Tintelnot K, Iatta R, Montagna MT, Torres-Rodriguez JM, Cogliati M, Velegraki A, Burggraaf A, Kamermans A, Sweere JM, Meis JF, Klaassen CH, Boekhout T .2012. Autochthonous and dormant *Cryptococcus gattii* infections in Europe; *Emerg Infect Dis*.Oct;18(10):1618-24.

Hawsworth DL, Kirk PM, Sutton BC, Pegler DN 1995; *Ainsworth & Bisby Dictionary of the Fungi*, 8ed, Oxon, CAB International.

Hayes GE, Denning DW. 2013 Frequency, diagnosis and management of fungal respiratory infections.;*Curr Opin Pulm Med*. Feb 14.

Harris JR, Lockhart SR, Debess E, Marsden-Haug N, Goldoft M, Wohrle R, Lee S, Smelser C, Park B, Chiller T 2011.; *Cryptococcus gattii* in the United States: clinical aspects of infection with an emerging pathogen.*Clin Infect Dis*. Dec;53(12):1188-95. Epub 2011 Oct 19

Heitman J, KozelTR, Kwon-Chung J, Perfect JR , Casadeval A 2010.*Cryptococcus:From Human Pathogen To Model Yeast*. 1 (Eds.). ASM Press, Washington, DC.

Igreja RP, Lazéra MS, Wanke B, Galhardo MC, Kidd S, Meyer W , 2004. Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* isolates from Aids patients of the Brazilian city Rio de Janeiro. *Medical Mycology*. , v.42, p.229 - 238.

Ikeda R, Shinoda T, Fukuzawa Y, Kaufman I 1982. Antigenic characterization of *Cryptococcus neoformans* serotypes and its application to serotyping of clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.*, v. 36, p. 22-29.

Kerkering TM, Duma RJ, Shadomy S 1981. The evolution of pulmonary cryptococcosis. Clinical implications from a study of 41 patients with or without compromising host factors. *Annals of Internal Medicine* 16:611-616.

Kidd SE, Hagen F, Tscharke RL, Huynh M, Bartlett KH, Fyfe M, Macdougall L, Boekhout T, Kwon-Chung KJ, Meyer W 2004. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 17258-17263.

Kishi K, Homma S, Kurosaki A, Kohno T,Motoi N, Yoshimura K 2006. Clinical features and

- high-resolution CT findings of pulmonary cryptococcosis in non-AIDS patients. *Respir. Med.* 100(5), 807–812
- Klein KR, Hall L, Deml SM, Rysavy JM, Wohlfiel SL, Wengenack NL 2009. Identification of *Cryptococcus gattii* by use of L-canavanine glycine bromothymol blue medium and DNA sequencing. *J Clin Microbiol.* Nov;47(11):3669-72. Epub 2009 Sep 30.
- Kronstad J, Saikia S, Nielson ED, Kretschmer M, Jung W, Hu G, Geddes JM, Griffiths EJ, Choi J, Cadieux B, Caza M, Attarian R 2012. Adaptation of *Cryptococcus neoformans* to mammalian hosts: integrated regulation of metabolism and virulence. *Eukaryot Cell.* Feb;11(2):109-18. Epub 2011 Dec 2.
- Kurtzman CP, The yeasts (5th Ed.): A taxonomic study: 04-2011 ;Langue : Anglais ;Ouvrage 2354 p ; Vol 3 ; Cap138 *Cryptococcus*.
- Kambugu A, Meya DB, Rhein J, *et al* 2008.. Outcomes of cryptococcal meningitis in Uganda before and after the availability of highly active anti-retroviral therapy. *Clin Infect Dis.*;46:1694–1701.
- Kwon-Chung KJ & Bennett JE 1992. Cryptococcosis. *In: Medical Mycology.*; pp.397-446. Lea & Febiger, Philadelphia, PA.
- Kwon-Chung, K. J. *Filobasidiella* Kwon-Chung 1998, In. Kurtzman C. P.; Fell, J. W. *The Yeast. A Taxonomic Study.* 4ª edição. Ed. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, , p. 656-662.
- Kwon-Chung KJ, Boekhout T, Fell JW, Diaz M 2002.. Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae). *Taxon*, v. 51, p. 804-806.
- Kwon-Chung, K J, Varma A 2006.. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? *FEMS Yeast Res.*, v. 6, n. 4, p. 574-587
- Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari, Melo NT 2002. Criptococose. In: Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Melo NT, organizadores. *Tratado de micologia médica* Lacaz. São Paulo: *Editora Sarvier.* p. 416.
- Lazéra, M. S.; Gutierrez Galhardo, M. C.; Cavalcanti, M. A. S.; Wanke, B 2005

- . Criptococose. Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias. 1ª edição. Ed. Coura, José Rodrigues, Rio de Janeiro; v. 2, p. 1223-1235.
- Lazéra MS, Cavalcanti MAS, Londero AT, Trilles L, Nishikawa MM & Wanke B 2000. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. *Med. Micol.*; 38:379-383
- Lazéra MS, Cavalcanti MA, Trilles L, Nishikawa MM, Wanke B 1998.. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* evidence for a natural habitat related to decaying wood in a pottery tree hollow. *Medical Mycology* 36:119 -122
- Lazéra MS, Pires FDA, Camillo-Coura L, Nishikawa MM, Bezerra CCF, Trilles L, Wanke B. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in decaying wood forming hollows in living trees. *J Med Vet Micol* 1996
- Li SS, Mody CH 2010. *Cryptococcus*. *Proc Am Thorac Soc*. May;7(3):186-96. Review.; 34:127-131
- Lin X, Heitman J 2006. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annu. Rev. Microbiol.* 60, 69–105.
- Lin X, Patel S, Litvintseva AP, Floyd A, Mitchell TG, Heitman J 2009. Diploids in the *Cryptococcus neoformans* serotype A population homozygous for the a mating type originate via unisexual mating. *PLoS Pathog.* 5(1), e1000283
- Litvintseva, A.P., Thakur, R., Vilgalys, R., *et al.*. 2006: Multilocus sequence typing reveals three genetic subpopulations of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A), including a unique population in Botswana. *Genetics*, 172, 2223–2238.
- MacDougall L, Kidd SE, Galanis E, Mak S, Leslie MJ, Cieslak PR, Kronstad JW, Morshed MG, Bartlett KH 2007. Spread of *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and detection in the Pacific Northwest, USA. *Emerg Infect Dis*. Jan;13(1):42-50.
- Martins LMS, Lazéra MS, Leal MJS, Cavalcanti MAS, Eulálio KD, Wanke B 2003. Infecção mista por sorotipo A e B de *Cryptococcus neoformans* como causa de meningoencefalite em criança de Itaituba-PA: relato de caso. In: XXXIX Congresso Sociedade Brasileira de Medicinal Tropical, 2003, Belém. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicinal Tropical.* v.36. p.216 – 216
- Martins LM, Wanke B, Lazéra Mdos S, Trilles L, Barbosa GG, de Macedo RC, Cavalcanti Mdo

- A, Eulálio KD, de Castro JA, da Silva AS, do Nascimento FF, Gouveia VA, do Monte SJ 2011. Genotypes of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* as agents of endemic cryptococcosis in Teresina, Piauí (northeastern Brazil). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Sep;106(6):725-30.
- Matsumoto MT, Fusco-Almeida AM, Baeza LC et al. 2007. Genotyping, serotyping and determination of mating-type of *Cryptococcus neoformans* clinical isolates from São Paulo State, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 49: 41-47.
- Meyer W, Gilcagdo F, Ngamskulrungrroj P, Trilles L, Hange F, Castañeda, Boekhout T 2011. Molecular Typing of the *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* Species complex; in: *Cryptococcus: From Human Pathogen to Model Yeast* (eds) J.Heitman *et al.*. ed ASM Press, Washington, DC.
- Meyer W, Aanensen DM, Boekhout T, Cogliati M, Diaz MR, Esposto MC, Fisher M, Gilgado F, Hagen F, Kaocharoen S, Litvintseva AP, Mitchell TG, Simwami SP, Trilles L, Viviani MA, Kwon-Chung J 2009. Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Med Mycol*.47(6):561-70.
- Meyer W, Castañeda A, Jackson S, Huynh M, Castañeda E 2003. IberoAmerican Cryptococcal Study Group. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerg Infect Dis.*, 9, 189-195.
- Meyer W, Marszewska K, Amirmostofian M, Igreja RP, Hardtke C, Methling K, Viviani MA, Chindamporn A, Sukroongreung S, John MA, Ellis DH, Sorrell TC 1999. 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*. Jun;20(8):1790-9
- Miyazaki Y. 2008. Cryptococcosis in Japan. 7th International Conference on *Cryptococcus* & Cryptococcosis, Nagasaki, Japan 11 to 14 September 2008, abstract # SY-01-04
- Mitchell TG, Perfect JR 1995.. Cryptococcosis in the era of AIDS-100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clinical of Microbiology Review* 8:515-548,
- Morera-López Y, Torres-Rodríguez JM, Jiménez-Cabello T, Baró-Tomás T, Alía-Aponte C, Lázera MS 2005. DNA fingerprinting pattern and susceptibility to antifungal drugs in

Cryptococcus neoformans variety *grubii* isolates from Barcelona city and rural environmental samples. *Mycopathologia*. Aug;160(1):9-14.

Ngamskulrungrroj P, Chang Y, Sionov E, Kwon-Chung KJ. The primary target organ of *Cryptococcus gattii* is different from that of *Cryptococcus neoformans* in a murine model. *mBio* 3(3), e00103-12 (2012) .

Nishikawa MM, Sant'Anna OD, Lazéra MS, Wanke B (1996) Use of D-proline assimilation and CGB medium for screening Brazilian *Cryptococcus neoformans* isolates. *J Med Vet Mycol* 34: 365–366

Nishikawa, M.M.; Lazera, M.S.; Barbosa, G.G. et al. 2003. Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Brazil: analysis of host and regional patterns. *J. Clin. Microbiol.* 41: 73-77.

Nishikawa MM, Lazéra MS, Barbosa GG, Trilles L, Balassiano BR, Macêdo RCL, Bezerra CCF, Perez MA, Leite PC, Wanke B 2003. Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Brazil: analysis of host and regional patterns. *Journal of Clinical Microbiology*. , v.41, p.73 - 77.

Osterholzer JJ, Surana R, Milam JE et al. 2009. Cryptococcal urease promotes the accumulation of immature dendritic cells and a non-protective T2 immune response within the lung. *Am. J. Pathol.* 174(3), 932–943.

Patel M, Beckerman KP, Reznik S, Madan RP, Goldman DL 2012. Transplacental transmission of *Cryptococcus neoformans* to an HIV-exposed premature neonate. *J Perinatol.* Mar;32(3):235-7. doi: 10.1038/jp.2011.112.

Park BJ et al 2009. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS*;23 (4):525-30

Passoni LFC, Lazéra MS, Nishikawa MM, Wanke B , 1995. *Cryptococcus neoformans* em excrementos de aves recolhidos de domicílios da região metropolitana do Rio de Janeiro. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. , v.28, p.91 - 91.

Passoni LFC, Wanke B, Nishikawa MM, Lazéra MS 1998.. *Cryptococcus neoformans* isolated from human dwellings in Rio de Janeiro, Brazil: An analysis of domestic environment of AIDS patients with and without cryptococcosis. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*. , v.36, p.305 – 311.

- Perfect J R 2006. *Cryptococcus neoformans*: the yeast that likes it hot. *FEMS Yeast Res.*, v. 6, n. 4, p. 463-468,
- Pongsai P, Atamasirikul K, Sungkanuparph S. The role of serum cryptococcal antigen screening for the early diagnosis of cryptococcosis in HIV-infected patients with different ranges of CD4 cell counts. *J Infect.*2010;60:474–477.
- Ramadan MF, Kroh LW, Mörsel JT. Radical scavenging activity of black cumin (*Nigella sativa* L.), coriander (*Coriandrum sativum* L.), and niger (*Guizotia abyssinica* Cass.) crude seed oils and oil fractions. *J Agric Food Chem.* 2003 Nov 19;51(24):6961-9.
- Restrepo A, Baumgardner DJ, Bagagli E, Cooper Jr CR, McGinnis MR, Lázera MS, Barbosa FH, Bosco SMG, Fr Camargo ZP, Coelho KIR, Fortes ST, Franco M, Montenegro MR, Sano A and Wanke B 2000.Clues to the presence of pathogenic fungi in certain environments Vol. 38, No. s1 , Pages 67-77
- Rozenbaum R, Gonçalves AR 1994. Clinical epidemiological study of 171 cases of Cryptococcosis. *Clinical of Infectious Diseases* 18:369-380.
- Sabiiti W, May RC 2012; Mechanisms of infection by the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*; *Future Microbiol.* 7(11) , 1297–1313
- Santos L.O. 2000. Criptococose no estado do Amazonas: estudo de 75 casos diagnosticados na Fundação de Medicina Tropical/FMT/IMTM, Manaus, AM (1988-1998). Tese de Mestrado, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ.
- Santos WR, Meyer W, Wanke B, Costa SP, Trilles L, Nascimento JL, Medeiros R, Morales BP, Bezerra CC, Macêdo RC, Ferreira SO, Barbosa GG, Perez MA, Nishikawa MM, Lazéra MS 2008. Primary endemic *Cryptococcosis gattii* by molecular type VGII in the state of Pará, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 103, n. 8, p. 813-818,.
- Santos G E O. Cálculo amostral: calculadora on-line. Disponível em: <<http://www.calculoamostral.vai.la>>. Acesso em: [09/05/2012].
- Siddiqui AA, Shattock RJ, Harrison TS 2006. Role of capsule and interleukin-6 in long-term immune control of *Cryptococcus neoformans* infection by specifically activated human peripheral blood mononuclear cells. *Infect Immun.* Sep;74(9):5302-10.
- Swinne D, Deppner M, Maniratunga S, Laroche R, Floch JJ, Kadende P 1991;. Aids-associated

- cryptococcosis in bujumbura, burundi: an epidemiological study. *J Med Vet Mycol.* 29(1):25-30.
- Swinne D, Deppner M, Laroche R, Floch JJ, Kadende P 1989. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from houses of AIDS-associated cryptococcosis patients in Bujumbura (Burundi). *AIDS.* Jun;3(6):389-90.
- Staib F, Seeliger HP 1966. A new selective medium for the isolation of *C. neoformans* from fecal material and from soil *Ann Inst Pasteur (Paris).* May;110(5):792-3
- Supparatpinyo K. 2008. Cryptococcosis in Tailândia. 7th International Conference on Cryptococcus & Cryptococcosis, Nagasaki, Japan 11 to 14 September 2008, abstract # SY-01-05.
- Woo J H. 2008. Prognostic factor of cryptococcal meningitides patients without HIV infection. 7th International Conference on Cryptococcus & Cryptococcosis, Nagasaki, Japan 11 to 14 September 2008, abstract # SY-01-02.
- Trilles, L.; Lazéra, M; Wanke, B. et al. 2003. Genetic characterization of environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex from Brazil. *Med. Mycol.* 41: 383-390.
- Trilles L, Lazéra Mdos S, Wanke B, Oliveira RV, Barbosa GG, Nishikawa MM, Morales BP, Meyer W 2008. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 103(5):455-62.
- Valdez PA, Vithayathil PJ, Janelsins BM, Shaffer AL, Williamson PR, Datta SK 2012.. Prostaglandin E2 suppresses antifungal immunity by inhibiting interferon regulatory factor 4 function and interleukin-17 expression in T cells. *Immunity* 36(4),668–679.
- Velagapudi R, Hsueh YP, Geunes-Boyer S, Wright JR, Heitman J 2009. Spores as infectious propagules of *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* 77(10), 4345–4355.
- Zaragoza O, Garcia-Rodas R, Nosanchuk JD, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL, Casadevall A 2010. Fungal cell gigantism during mammalian infection. *PLoS Pathog.* 6(6), e1000945.
- Zaragoza O, Rodrigues ML, De Jesus M, Frases S, Dadachova E, Casadevall A 2009. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Adv. Appl. Microbiol* 68, 133–216
- Zhang Y, Wang F, Tompkins KC et al. 2009. Robust Th1 and Th17 immunity supports

pulmonary clearance but cannot prevent systemic dissemination of highly virulent *Cryptococcus neoformans* H99. *Am. J. Pathol.*175(6),2489–2500

11-APÊNDICE



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas



Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER

Rio de Janeiro, 10 de novembro de 2003

Deliberação: APROVADO

Título do Projeto: "Seguimento do estudo das condições de saúde na sede do município de Santa Isabel do Rio Negro, Estado do Amazonas, incluindo intervenção para o tratamento em massa das helmintíases entéricas".

Protocolo nº CEP: 0011.0.009.000-03

Pesquisador Responsável: Márcio Neves Bóia

Instituição: Instituto Oswaldo Cruz – IOC / FIOCRUZ

Este projeto visa a ~~avaliar as condições sanitárias e de saúde~~ da população da sede do município de Santa Isabel do Rio Negro, incluindo intervenção para o tratamento em massa das helmintíases entéricas.

A metodologia está plenamente adequada. Faz parte integrante deste estudo: a) Termo de consentimento livre e esclarecido para o tratamento em massa das helmintíases entéricas (verminoses) na sede do município de Santa Isabel do Rio Negro; b) Termo de consentimento livre e esclarecido para participação no projeto "Controle e diagnóstico da hanseníase e doenças dermatológicas"; c) Termo de consentimento livre e esclarecido para coleta de nova amostra de sangue para exame de Hepatites B e C; d) Termo de consentimento livre e esclarecido para coleta de nova amostra de sangue para exame de HTLV I/II; e) Termo de Consentimento livre e esclarecido para coleta de amostra de sangue para exame de Malária; f) Termo de consentimento livre e esclarecido para coleta de nova amostra de sangue para exame de doença de Chagas.

11.1-ANEXOS

11.1.1- Anexo 1

Meios de Culturas

Sabourand dextrose agar

a) Fórmula para (1litro)

Neopeptone.....	10g
Dextrose.....	20g
Agar.....	20g
Cloranfenicol.....	400mg
Água destilada.....	1000L

b) Princípios:

Este meio é para cultivo de leveduras, fungos filamentosos e microorganismo acidúrico, e possibilita o crescimento de todos os fungos patogênicos para o homem, mas não contém nenhuma substância que atue seletivamente sobre a flora acompanhante e indesejável. Para inibir o crescimento de bactéria, ajusta-se o pH para 5,6 pois a reação ácida possibilita o crescimento dos fungos e inibe o de bactérias. Este efeito é potencializado ajustando-se o pH para valores extremos como 3,5. Recomenda-se, também o uso de antibiótico como cloranfenicol, para inibir o crescimento bacteriano.

Mycosel

a) Fórmula (para 1litro)

Soytone.....	10g
Dextrose.....	10g
Agar.....	15g

Cicloneximida.....0,5g
Cloranfenicol.....0,05g
Água destilada.....1000mL

b) Princípios

É um meio seletivo, de reação quase neutra, que se utiliza para o isolamento de fungos patogênicos. A cicloheximida inibe o crescimento de fungos saprófitos, enquanto que o cloranfenicol inibe o crescimento de bactérias. A ciclohexamida pode ser substituída pela actidiona, que possui o mesmo efeito inibidor.

Meio Seed Niger Agar (NSA)

a) REAGENTES E METODOLOGIA DE PRODUÇÃO:

- Bater 70g de semente de *Guizotia abyssínia*, em liquidificador, com 350mL de água destilada.
- Autoclavar por 10' a, 121°C.
- Filtrar a suspensão através de gaze, obtendo o extrato de semente de Niger.
- Dissolver 20g de Agar em 800mL de água destilada, aquecendo em microondas.
- Adicionar 10g de glicose, 780mg de creatina, 50mg de cloranfenicol e 10mg de difenil.
- Acrescentar 200mL do extrato de sementes de Niger e homogeneizar bem.
- Autoclavar a 120°C por 15' minuto distribuir em placas de Petri.

b) Princípios

O meio de Niger contém compostos fenólicos provenientes da semente de *Guizoita abyssinica*. Como o *C. neoformans* consegue metabolizar os composto fenólicos, produzindo a melanina como produto final, é possível identificar este fungo, já que suas colônias adquirem

coloração marrom devido à síntese de melanina, diferenciando-se de outras leveduras brancas, principalmente a *Candida* spp.

Agar uréia de Christensen

O meio Agar uréia de Christensen é para verificar a capacidade do fungo de produzir amônia pela ação da uréase, tornando o meio alcalino e mudando a cor do indicador de pH para rosa.

Composição em g/L:

Digestão peptídica de tecido animal:..... 1.5g

Dextrose:..... 1g

Cloreto de Sódio:..... 5g

Fosfato Monopotássico:..... 2g

Vermelho Fenol:..... 0.012g

Agar Bacteriológico:..... 15g

pH Final (a 25°C): 6.8 ± 0.2

Meio de cultura canavanina, glicina e azul de bromotimol (cgb)

Produção da solução A (para um volume final de 100 mL)

- L-Canavanina – 30mg
- Glicina - 10g
- KH₂PO₄ – 1g
- 7H₂O MgSO₄ – 1g
- Acrescentar 1mg de Tiamina HCl ou Tiamina.
- Diluir com água tipo I.
- Completar até o volume final de 100 mL com água tipo I.
- Verificar o pH da solução utilizando o potenciômetro.
- Corrigir, se necessário, com NaOH 1M ou HCl fumegante (37%).
- O pH final deverá ser 5.6

Dentro da cabine de segurança biológica esterilizar, por filtração utilizando membrana 0,22 μ m com o auxílio da bomba de vácuo e fazer alíquotas de 25 mL, em tubos de ensaio estéril com tampa de rosca.

Armazenar em freezer (-20°C).

Produção da solução B (para um volume final de 100 mL)

- Solução de Azul de Bromotimol Sódico 0,4%.
- Pesar na balança analítica o seguinte insumo:
- Azul de bromotimol sódico - 0,4g
- Colocar este insumo em Becker de 200 mL.
- Diluir com água tipo I.
- Completar até o volume final de 100ml com água tipo I.
- Homogeneizar.
- Colocar esta solução em frasco com tampa de rosca ao abrigo da luz.
- Armazenar em geladeira (+2 a +8°C).

Produção final do meio CGB.

Ágar ágar - 5g

Preparo do meio para volume final de 250mL.

Retirar do freezer a solução A e deixar em temperatura ambiente.

Colocar em Erlenmeyer 500 mL, 5g de agar-ágar, 5 mL da solução B, diluir e completar volume até 220 mL com água tipo I.

Autoclavar 121°C por 15 minutos.

Resfriar \pm 55°C.

Acrescentar ao meio resfriado 25 mL da solução A lentamente, homogeneizando bem.
Distribuir 2,5 mL nos tubos de ensaio estéreis 13x100 mm com tampa de rosca.

Estender os tubos em bancada com suporte para a formação de bisel.

Obs: A criopreservação de leveduras em skim milk a -20°C e o preparo de glicerol na concentração de 15% em água para criopreservação de leveduras a -70°C foram realizadas segundo o procedimento operacional padrão do laboratório de micologia do setor ambiental.

11.1.2-Anexo 2

TABELA 11.1 TESTES, MNEMÔNICO E CONCENTRAÇÃO DO CARTÃO YST

Poços no YST	Testes	mnemônico	Concentração
3	L-Lysine-ARYLAMIDASE	LysA	0.0228 mg
4	L-MALATE assimilation	IMLTa	0.15 mg
5	Leucine-ARYLAMIDASE	LeuA	0.0234 mg
7	ARGININE GP	ARG	0.15 mg
10	ERYTHRITOL assimilation	ERYa	0.3 mg
12	GLYCEROL assimilation	GLYLa	0.16 µL
13	Tyrosine ARYLAMIDASE	TyrA	0.0276 mg
14	BETA-N-ACETYL-GLUCOSAMINIDASE	BNAG	0.0408 mg
15	ARBUTINE assimilation	ARBa	0.3 mg
18	AMYGDALINE assimilation	AMYa	0.3 mg
19	D-GALACTOSE assimilation	dGALa	0.3 mg
20	GENTIOBIOSE assimilation	GENa	0.3 mg
21	D-GLUCOSE assimilation	dGLUa	0.3 mg
23	LACTOSE assimilation	LACa	0.96 mg
24	METHYL-A-D-GLUCOPYRANOSIDE assimilation	MAdGa	0.3 mg
26	D-CELLOBIOSE assimilation	dCELa	0.3 mg
27	GAMMA-GLUTAMYL-TRANSFERASE	GGT	0.0228 mg
28	D-MALTOSE assimilation	dMALa	0.3 mg
29	D-RAFFINOSE assimilation	dRAFa	0.3 mg
30	PNP-N-acetyl-BD-galactosaminidase 1	NAGA1	0.0306 mg
32	D-MANNOSE assimilation	dMNEa	0.3 mg
33	D-MELIBIOSE assimilation	dMELa	0.3 mg
34	D-MELEZITOSE assimilation	dMLZa	0.3 mg
38	L-SORBOSE assimilation	ISBEa	0.3 mg
39	L-RHAMNOSE assimilation	IRHAa	0.3 mg
40	XYLITOL assimilation	XLTa	0.3 mg
42	D-SORBITOL assimilation	dSORa	0.1875 mg
44	SACCHAROSE/SUCROSE assimilation	SACa	0.3 mg
45	UREASE	URE	0.15 mg
46	ALPHA-GLUCOSIDASE	AGLU	0.036 mg
47	D-TURANOSE assimilation	dTURa	0.3 mg
48	D-TREHALOSE assimilation	dTREa	0.3 mg
49	NITRATE assimilation	NO3a	0.03 mg
51	L-ARABINOSE assimilation	lARAAa	0.3 mg
52	D-GALACTURONATE assimilation	dGATa	0.15 mg
53	ESCULIN hydrolyse	ESC	0.225 mg
54	L-GLUTAMATE assimilation	lGLTa	0.15 mg
55	D-XYLOSE assimilation	dXYLa	0.3 mg
56	DL-LACTATE assimilation	LATa	0.15 mg
58	ACETATE assimilation	ACEa	0.15 mg
59	CITRATE (SODIUM) assimilation	CITa	0.15 mg
60	GLUCURONATE ASSIMILATION	GRTas	0.15 mg
61	L-PROLINE assimilation	lPROa	0.15 mg
62	2-KETO-D-GLUCONATE assimilation	2KGA	0.15 mg
63	N-ACETYL-GLUCOSAMINE assimilation	NAGA	0.15 mg
64	D-GLUCONATE assimilation	dGNTa	0.15 mg