

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ASPECTOS CLÍNICOS E MOLECULARES DA CRIPTOCOCOSE EM PACIENTES NÃO
HIV NO ESTADO DO AMAZONAS, BRASIL**

SILVIANE BEZERRA PINHEIRO

MANAUS – AM

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

SILVIANE BEZERRA PINHEIRO

**ASPECTOS CLÍNICOS E MOLECULARES DA CRIPTOCOCOSE EM PACIENTES NÃO
HIV NO ESTADO DO AMAZONAS, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza

Coorientadora: Dr. Luciana Trilles

MANAUS – AM

2019

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

P654a Pinheiro, Silviane Bezerra
Aspectos clínicos e moleculares da criptococose em pacientes não HIV no Estado do Amazonas, Brasil / Silviane Bezerra Pinheiro. 2019
89 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: João Vicente Braga de Souza
Coorientadora: Luciana Trilles
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Amazônia. 2. Cryptococcus gattii. 3. HIV negativo. 4. Mlst. I. Souza, João Vicente Braga de II. Universidade Federal do Amazonas III. Título


**"Aspectos clínicos e moleculares da criptococose em pacientes não HIV
no Estado do Amazonas, Brasil"**

DISCENTE: SILVIANE BEZERRA PINHEIRO

PARECER:


Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas em sua forma final e definitiva pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas.

Manaus, AM, 25/10/2019.




Prof. Dr. Emerson Silva Lima
Coordenador do PPGCF


A mesma foi apresentada perante a banca composta pelos seguintes
professores:



Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza
Orientador e presidente da banca



Dra. Ani Beatriz Jackisch Matsuura
Membro externo (FIOCRUZ)



Profa. Dra. Ariane Mendonça Kluczkowisk
Membro interno (UFAM)

“Até aqui nos ajudou o Senhor”. (I Samuel 7:12)

AGRADECIMENTOS

Àquele que é onipotente, onisciente e onipresente, ao Deus que comanda minha vida e coloca em meu coração o querer e o realizar. Sem Ele eu não teria concluído mais essa etapa da minha vida, Ele me inspirou a escrever e a persistir em cada processo vivido nesses dois anos. Em tudo que fizer glorificarei a Deus, pois Ele é a minha esperança e motivação para vencer. Toda honra e toda glória sejam dada a Ele, amém.

Ao meu esposo Roger Bier que sempre esteve comigo me apoiando, pela paciência em me ouvir falar sobre criptococose desde o primeiro dia que nos conhecemos e por me amparar nos momentos difíceis. Pelo seu amor, por me incentivar a ter disciplina, pensar positivo e a fazer dos momentos difíceis aprendizados.

Aos meu pais Raimundo Nonato e Maria Bezerra que me educaram mesmo com as dificuldades enfrentadas na vida sempre me aconselharam a dar prioridade aos estudos. Ao esforço da minha mãe que considero uma inspiração de mulher batalhadora, que sempre mostrava sua preocupação quando ficava no computador por muito tempo.

Ao meu orientador Dr. João Vicente por ter me aceitado no laboratório como voluntária há oito anos atrás e ter me dado a oportunidade de fazer iniciação científica e me instruir na carreira científica. Admiro muito o seu caráter e a forma que ensina cada aluno que orienta, se preocupando com a vida e com o bem-estar de cada um.

À Dra. Luciana Trilles que me ensinou o passo a passo das edições e análises de sequenciamento. Por ter me recebido no seu laboratório e ter compartilhado o seu conhecimento e experiência.

Aos amigos da família micologia pela ajuda, em especial a amiga da turma de mestrado Ednaira que me deu suporte e compartilhou seus conhecimentos sobre metodologia CLSI, a Valéria Chagas pelo seu auxílio com os ensaios de microdiluição, a Luciana pelo treinamento em extração de DNA e a Dra. Ana Cortez pelos seus conselhos e ensinamentos nas práticas da micologia.

À Dra, Kátia por todo seu ensinamento e auxílio durante todos esses anos, a sua cordialidade em ajudar e instruir acerca das técnicas da micologia médica. À Lizandra que me ajudou nas pesquisas das cepas e dados no *Idoctor*, me acompanhava nas entrevistas e a todos os técnicos do laboratório de Micologia da Fundação de Medicina Tropical.

Ao Msc. Diego Fernando, grande amigo que compartilhou seus conhecimentos sobre biologia molecular e toda a metodologia do MLST. Obrigada pelos seus conselhos e contribuições desde o início do mestrado.

À Dra. Aline Pérez, por me ajudar a descrever os casos dos pacientes.

Ao Msc. Felipe Almeida da Fiocruz/RJ que foi solícito em me ensinar sobre as edições de sequenciamento e a sanar minhas dúvidas.

Ao Walter Oliva por ter me apresentado ao Dr. Jaidson Becker que contribuiu na construção do mapa.

À Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) pela oportunidade, a todos os professores pelos ensinamentos. E ao órgão de fomento FAPEAM pelo auxílio financeiro e incentivo à pesquisa no Estado do Amazonas.

RESUMO

A criptococose é uma infecção fúngica causada pelo complexo de espécies *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii*. A maioria dos casos ocorrem em portadores do vírus HIV/AIDS, no entanto, essa infecção também ocorre em pacientes não HIV em uma frequência de 10-30% do total de casos. Trata-se de uma doença de alta morbidade e mortalidade, sendo a neurocriptococose a forma clínica mais severa. Esse estudo investigou aspectos clínicos e moleculares de sete casos de pacientes não HIV diagnosticados com criptococose na Fundação de Medicina Tropical (FMT-HVD) no período de Julho de 2016 a Junho de 2019. Um questionário foi utilizado para obtenção de informações epidemiológicas e clínicas dos pacientes incluídos no estudo. Para identificar os genótipos utilizamos a técnica de PCR-RFLP do gene *URA5* o qual comparou os genótipos dos isolados com cepas padrões previamente genotipadas. Para a técnica molecular do Multilocus Sequence Typing (MLST) foi realizado sequenciamento dos sete genes de referência preconizados pela International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM) para a determinação dos sequence typing (ST). Os ensaios de suscetibilidade antifúngica foram de acordo com a norma da CSLI M27-A3. Como resultados clínicos e epidemiológicos observamos que a maioria dos pacientes eram do sexo feminino (57,14%), faixa etária de 10-53 anos (média de 36,3 anos), a neurocriptococose foi a forma clínica predominante (100 %), o tempo decorrido desde os sintomas até o diagnóstico variou de 15 a 730 dias (média de 172,9 dias) e a mortalidade observada foi de 57,14%. As comorbidades prévias a criptococose observadas no presente estudo foram: hipertensão, diabetes mellitus e tuberculose intestinal. Os isolados foram obtidos de amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) e o diagnóstico foi feito por exame direto em tinta Nankin. A genotipagem inicial feita pela técnica de PCR-RFLP do gene *URA5* mostrou que todos os isolados clínicos foram do tipo molecular VGII. A partir do ensaio de MLST foi possível identificar os sequence typing ST20 (n=4), ST5 (n=3) e ST552 (n=1). Esse é o primeiro estudo a relatar a existência do ST552. As culturas demonstraram CIM média para os antifúngicos anfotericina B (AMB), fluconazol (FLC) e itraconazol (ITC) de 0,05, 3,85 e 0,18 ug/mL, respectivamente. Nesse estudo mostramos a importância do uso da ferramenta molecular do MLST para identificar os genótipos que causam as infecções em pacientes não HIV. Descrevemos o predomínio do acometimento no SNC por *C. gattii* principalmente do tipo molecular VGIIa que está amplamente disperso no Norte do Brasil.

Palavras-Chave: Amazônia, *Cryptococcus gattii*, HIV negativo e MLST.

ABSTRACT

Cryptococcosis is a fungal infection caused by the *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* species complex. Most cases occur in people with HIV/AIDS, however, this infection also occurs in non-HIV patients with a frequency of 10 to 30% of all cases. However, this is a disease with high morbidity and mortality, being neurocryptococcosis the most severe clinical form. This study investigated clinical and molecular aspects of seven cases of non-HIV patients diagnosed with cryptococcosis at the Tropical Medicine Foundation (FMT-HVD) from July 2016 to June 2019. A questionnaire was used to obtain epidemiological and clinical information from the patients included in the study. Then, to identify the genotypes we used the PCR-RFLP technique of the *URA5* gene which compared the genotypes of isolates with previously genotyped standard strains. For the Multilocus Sequence Typing (MLST) molecular technique, sequencing of the seven reference genes recommended by the International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM) was performed for the determination of sequence typing (ST). Antifungal susceptibility assays were in accordance with CSLI M27-A3 standard. As clinical and epidemiological results, we observed that most patients were female (57.14%), age range 10-53 years (mean 36.3 years), neurocryptococcosis was the predominant clinical form (100%). The time elapsed from symptoms to diagnosis ranged from 15 to 730 days (average 172.9 days) and the observed mortality was 57.14%. In addition, the comorbidities prior to cryptococcosis observed in the present study were: hypertension, diabetes mellitus and intestinal tuberculosis. Isolates were obtained from cerebrospinal fluid (CSF) samples and the diagnosis was made by direct examination in Nankin ink. Further, initial genotyping by the PCR-RFLP technique of the *URA5* gene showed that all clinical isolates were of molecular type VGII. From the MLST assay it was possible to identify the sequence typing ST20 (n = 4), ST5 (n = 3) and ST552 (n = 1). This is the first study to report the existence of ST552. Cultures showed mean MIC for amphotericin B (AMB), fluconazole (FLC) and itraconazole (ITC) antifungals of 0.05, 3.85 and 0.18 µg/mL, respectively. In this study we show the importance of using the MLST molecular tool to identify the genotypes that cause infections in non-HIV patients. We describe the predominance of CNS involvement by *C. gattii* mainly of molecular type VGIIa, which is widely dispersed in northern Brazil.

Keywords: Amazon, *Cryptococcus gattii*, HIV negative and MLST.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da infecção da criptococose por inalação de propágulos no ar.....20 e processos da infecção no ser humano	20
Figura 2. Características micro e macromorfológicas de <i>Cryptococcus</i> sp.....22	22
Figura 3. Célula de <i>Cryptococcus</i> sp. secretando seus fatores de virulência.....23	23
Figura 4. Esquema mostrando como as leveduras de <i>Cryptococcus</i> sp. migram para SNC.....24	24
Figura 5. Histórico do desenvolvimento das ferramentas moleculares32 para genotipagem do complexo de leveduras <i>C. neoformans/C. gattii</i> .	32
Figura 6. Fluxograma dos procedimentos e metodologia.....38	38
Figura 7. Esquema representando as etapas de extração de DNA.....42	42
Figura 8. Determinação dos genótipos de <i>Cryptococcus</i> sp.....43	43
Figura 9. Purificação de DNA amplificado com polietileglicol.....44	44
Figura 10. Mapa do Estado do Amazonas mostrando as cidades de origem dos sete56 pacientes e os STs correspondentes	56
Figura 11. Árvore filogenética neighbor-joining (NJ) contruída a partir da compilação.....60 dos sete loci do MLST	60
Figura 12. Imagem de ressonância magnética do crânio do paciente 3.....63	63

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Genótipos do complexo de espécies <i>C. neoformans/C.gattii</i>	21
--	-----------

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Sequelas da criptococose em pacientes não HIV.....29
- Tabela 2.** Estudos que utilizaram o MLST para isolados de *C. gattii* no Estado do34
Amazonas
- Tabela 3.** Aspectos clínicos e epidemiológicos da criptococose em pacientes não HIV.....58
diagnosticados na FMT-HVD
- Tabela 4.** Tipo molecular dos isolados de *C. gattii* e a sequência numérica dos alelos dos....61
genes no MSLT e o respectivo Sequence Typing.
- Tabela 5.** Teste de sensibilidade antifúngica e a concentração inibitória mínima dos sete.....61
isolados de *C. gattii*.

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDAS

µg – Micrograma

µl – Microlitros

µm - Micrômetros

µM – Micromolar

°C – Graus Celsius

5-FC – 5-Fluorocitosina

AFLP – Amplified Fragment Length Polymorphism (Polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado)

AIDS - Acquired immunodeficiency syndrome (Síndrome da imunodeficiência adquirida)

ART- Antiretroviral Therapy (Terapia Anti-retroviral)

AMB – Anfotericina B

CAAE - Certificado de apresentação para apreciação ética

CAP59 - Gene da proteína associada à cápsula de *Cryptococcus* spp.

CD4 – Cluster of differentiation 4

CEP – Comitê de ética em pesquisa com seres humanos

CIM – Concentração inibitória mínima

CLSI – Clinical and Laboratory Standard Institute

CRAG- Cryptococcal antigen (antígeno criptocócico)

ddNTP's – Dideoxynucleotídeos trifosfatados

DMSO – Dimetil sulfoxido

DM – Diabetes mellitus

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dNTPs – Deoxinucleotídeos trifosfatados

EDTA - Ethylenediamine tetraacetic acid (Ácido etilenodiamino tetra-acético)

EUA – Estados Unidos da América

FLC – Fluconazol

FcγRs – Receptores gama FC

FCGR- Receptor gama FC

FMT-HVD – Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado

GPD1 – Gene da enzima Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenaseHCl – Ácido clorídrico

GM-CSF - Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos)

HhaI – Enzima de restrição obtida de *Haemophilus haemolyticus*

HAS – Hipertensão arterial sistêmica
HIV – Human Immunodeficiency Virus (Vírus da Imunodeficiência Humana)
IGS1 – Espaço intergênico do DNA ribossomal
IFN- γ – Intérféron gama
INPA – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
ISHAM – International Society of Human and Animal Mycology (Sociedade Internacional de Micologia Médica e Veterinária)
IRA – Insuficiência Renal Aguda
ITC – Itraconazol
KCL – Cloreto de potássio
LAC1 – Gene da enzima Lacase
LAmB- Anfotericina Lipossomal
LCR- Líquido Cefalorraquidiano
M – Molar
MgCl₂ – Cloreto de magnésio
min – Minuto
ml- Mililitros
MLST- Multi Locus Sequence Typing
mM – Milimolar
MP88 – Gene da Manoproteína
MPD1 – Gene da enzima Manitol-1-fosfato desidrogenase
NaCl – Cloreto de sódio
NCPT - Neurocriptococose
ng – nanograma
nm – Nanômetro
NHNT – Non-Hiv Nontransplant
pb – pares de bases
PCR – Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)
pH – Potencial hidrogeniônico
PLB1 – Gene da enzima Fosfolipase B
PRRs - Receptores de reconhecimento de patógenos
RAPD- Random Amplified Polymorphic DNA (DNA polimórfico amplificado randomicamente)
RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism (Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição)
RNA – Ácido ribonucleico
rpm – Rotações por minuto

RPMI - Meios Roswell Park Memorial Institute
Sau96I – Enzima de restrição obtida de *Staphylococcus aureus*
SDS – Sodium dodecyl sulfate (Dodecil sulfato de sódio)
SIH-SUS – Sistema de Internação Hospitalar do Sistema Único de Saúde
SNC – Sistema Nervoso Central
SOD1CG – Gene da enzima Superóxido Dismutase de cobre e zinco de *C. gattii*
SOD1CN – Gene da enzima Superóxido Dismutase de cobre e zinco de *C. neoformans*
ST – Sequence Typing
Taq – *Thermus aquaticus*
TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Th1 – T helper 1
Th2 – T helper 2
Tris – 2-amino-2-hidroximetilpropano-1,3-diol
U – Unidade
UFC – Unidade formadora de colônia
URA5 – Gene da enzima Orotidina Monofosfato Pirofosforilase
URE1 – Gene da enzima Urease
V – Volt
var. – Variedade
VGI, VGII, VGIIa, VGIIb, VGIIc, VGIII, VGIV – Variedade *gattii* 1, 2, 2a, 2b, 2c, 3 e 4
VNB – Variedade *neoformans* de Botswana
VNI, VNII, VNIII, VNIV – Variedade *neoformans* 1, 2, 3 e 4

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	19

2.1 CRIPTOCOCOSE	19
2.1.1 AGENTES ETIOLÓGICOS: GENÓTIPOS, DISTRIBUIÇÃO E FATORES DE VIRULÊNCIA.....	21
2.1.2 ASPECTOS CLÍNICOS DA CRIPTOCOCOSE.....	23
2.2 CRIPTOCOCOSE EM PACIENTES NÃO HIV	25
2.3 SEQUELAS DECORRENTES DA CRIPTOCOCOSE.....	28
2.4 GENOTIPAGEM.....	30
2.4.1 MLST COMO UMA FERRAMENTA EPIDEMIOLÓGICA	32
2.5 RESISTÊNCIA ANTIFÚNGICA	35
3. OBJETIVOS.....	37
3.1 OBJETIVO GERAL	37
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4. METODOLOGIA.....	38
4.1 MODELO DE ESTUDO.....	38
4.2 LOCAIS DE ESTUDO	39
4.3 POPULAÇÃO ANALISADA E PERÍODO DE ESTUDO.....	39
4.3.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	39
4.3.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	40
4.3.3 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA	40
4.4 PROCEDIMENTOS	40
4.4.1 COLETA DE DADOS CLÍNICOS- EPIDEMIOLÓGICOS.....	40
4.4.2 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS CLÍNICOS	40
4.5 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR POR MLST.....	41
4.5.1 EXTRAÇÃO DE DNA.....	41
4.5.2 DETERMINAÇÃO DOS TIPOS MOLECULARES POR PCR-RFLP DO GENE URA5.....	42
4.5.3 PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DOS LÓCUS PARA O MLST.....	43
4.5.4 PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR.....	43
4.6 ENVIO DAS AMOSTRAS DE DNA E PREPARO PARA SEQUENCIAMENTO	44
4.8 DETERMINAÇÃO DO PERFIL ALÉLICO E DOS SUBTIPOS MOLECULARES (SEQUENCES TYPES -STS).....	45
4.9 ANÁLISE FILOGENÉTICA	46
5. AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA.....	46
6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	47
7. RESULTADOS.....	47
8. DISCUSSÃO	63

9. CONCLUSÃO	67
10. BIBLIOGRAFIA	68
12. ANEXOS.....	77
ANEXO 1. PARECER DO CEP DA FMT-HVD.....	77
ANEXO 2. TERMO DE CONCENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	78
ANEXO 3. FORMULÁRIO APLICADO PARA ENTREVISTA E COLETA DE DADOS CLÍNICOS – EPIDEMIOLÓGICOS E LABORATORIAIS	83
ANEXO 4. PRIMERS E SUAS RESPECTIVAS TEMPERATURAS DE AMPLIFICAÇÃO	86
ANEXO 5. GENOTIPAGEM POR PCR-RFLP.....	87
ANEXO 6. PURIFICAÇÃO O DOS GENES DO MLST.....	88

1. INTRODUÇÃO

A criptococose é doença potencialmente letal de ocorrência mundial que teve o aumento significativo de casos na metade da década 1980 estando associada a epidemia da AIDS (MAZIARZ e PERFECT 2016). No ano de 2014 estima-se que houve aproximadamente 225.000 casos mundialmente com 181.100 mortes por criptococose sendo a maior incidência em países em desenvolvimento.

Estudos têm evidenciado importantes diferenças epidemiológicas entre a criptococose em pacientes com HIV/aids e soronegativos (PAPPAS, 2013a). Embora a criptococose ocorra com maior frequência em indivíduos imunossuprimidos, estudos mostram que pacientes HIV negativos exibem maior taxa de mortalidade se comparado aos pacientes HIV positivos (BRATTON et al., 2012; RAJASINGHAM et al., 2017).

Condições mórbidas têm sido associadas a suscetibilidade a criptococose em pacientes não HIV, entre elas são citadas: insuficiência renal, diabetes, câncer, insuficiência cardíaca, doença pulmonar crônica, doença hepática, malignidade hematológica e doenças autoimunes como sarcoidose. Além disso, o uso de corticosteróides têm sido outro fator associado, sendo que, uma percentagem de 93% de pacientes não HIV, diagnosticados com criptococose faziam uso de imunossupressores (BRATTON et al., 2012; BRIZENDINE; BADDLEY; PAPPAS, 2013; HEVEY et al., 2019). Altos níveis do anticorpo anti-GM-CSF que inibe o fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) é um fator de risco para a infecção por *C. gattii* em pacientes não HIV (APPLEN CLANCEY et al., 2019). Saijo et al. (2014) encontraram altos níveis de anticorpos anti-GM-CSF no plasma de pacientes, aparentemente imunocompetentes, infectados por *C. gattii*, mas não encontrou no plasma de pacientes infectados por *C. neoformans*.

No Amazonas foram feitos estudos de detecção ambiental de *Cryptococcus* sp. a partir de fezes de pombos (*Columbia livia*), aves de cativeiro, ocas de árvores, poeira domiciliar, solo, insetos e água do Rio Negro (ALVES, 2016; ALVES et al., 2016; BRITO-SANTOS et al., 2015a; DOS SANTOS BENTES et al., 2019). Outros estudos abordaram a caracterização genotípica de isolados clínicos de pacientes diagnosticados com criptococose na Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD). Esses trabalhos trouxeram dados importantes sobre a epidemiologia da criptococose, genótipos frequentes, mortalidade e STs que ocorrem no Estado do Amazonas. Segundo Khell da Silva et al. (2012) cerca de 20

pacientes foram diagnosticados com criptococose no Estado do Amazonas, no período de março de 2006 a fevereiro de 2008, e aproximadamente 20% desses pacientes não possuíam HIV. A infecção em pacientes não HIV ocorre predominantemente por *C. gattii* de tipo molecular VGII. A forma clínica predominante é a neurocriptococose (ROCHA et al., 2018).

Apesar desses estudos prévios, não foram realizadas investigações específicas sobre o desfecho da criptococose em casos de pacientes não HIV. É necessário entender como a criptococose se manifesta nesse grupo, quais os fatores de risco eles são expostos, quais os genótipos dos agentes causadores da doença, como essa doença interfere na qualidade de vida e também quais os genótipos dos agentes causadores da doença.

Neste trabalho investigou-se aspectos clínicos e epidemiológicos dos pacientes não HIV com criptococose, os genótipos e a sensibilidade a antifúngicos dos agentes etiológicos regionais. Esse é o primeiro estudo voltado somente para pacientes não HIV no estado do Amazonas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CRIPTOCOCOSE

A criptococose é uma micose sistêmica grave que ocorre mundialmente causando infecções em humanos e animais, sendo relatada em gatos, cachorros, coalas e causando encefalite em cabras (HEADLEY et al., 2019; KROCKENBERGER et al., 2019). Os agentes etiológicos da criptococose são as leveduras do complexo *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii*. A infecção ocorre por inalação de propágulos fúngicos presentes no ambiente. Quando inalado esse fungo penetra no tecido pulmonar e pode ficar de 6 a 7 meses sem apresentar sintomas (MACDOUGALL; FYFE, 2006).

No ano de 1894 essa micose foi relatada pela primeira vez por Abraham Busse como “doença coccidia” e foi isolada da tibia de um paciente (BUSSE, 1895). Mas, somente em 1905 Von Hansemann descreveu o primeiro caso de meningite criptocócica que desde muito tempo tem levados pessoas a óbito (HANSEMANN, 1905).

A maioria dos pacientes com criptococose pulmonar não apresentam sintomas podendo ser confundido com câncer de pulmão (TANIWAKI et al., 2019). Após ser inalada a levedura agora encapsulada irá se reproduzir no pulmão e chegar até a corrente sanguínea onde se

disseminará para os órgãos e tecidos principalmente o Sistema Nervoso Central (SNC) (CHEN; MEYER; SORRELL, 2014) (Imagem 1).

O diagnóstico da criptococose é feita a partir da avaliação dos parâmetros do LCR que incluem: elevada contagem de células por exame direto em tinta de Nankin. Paciente não HIV tendem a demonstrar várias células fúngicas, facilitando o diagnóstico pelo exame direto com tinta de Nankin, mais proteínas e menos glicose no LCR quando comparado a pacientes imunossuprimidos (Shaunak et al. 1989). O exame direto é considerado o padrão ouro para o diagnóstico da criptococose, com 70-90% de sensibilidade (WILLIAMSON et al., 2016). Em casos de negatividade, a detecção pode ser feita pelo crescimento da cultura ou pelo teste de detecção do antígeno criptocócico (Crag) que pode ser por aglutinação do látex (LAT), elisa e agora por imunoenensaio de fluxo lateral (LFA) (CONTRERAS, 2019; DRAIN et al., 2019).

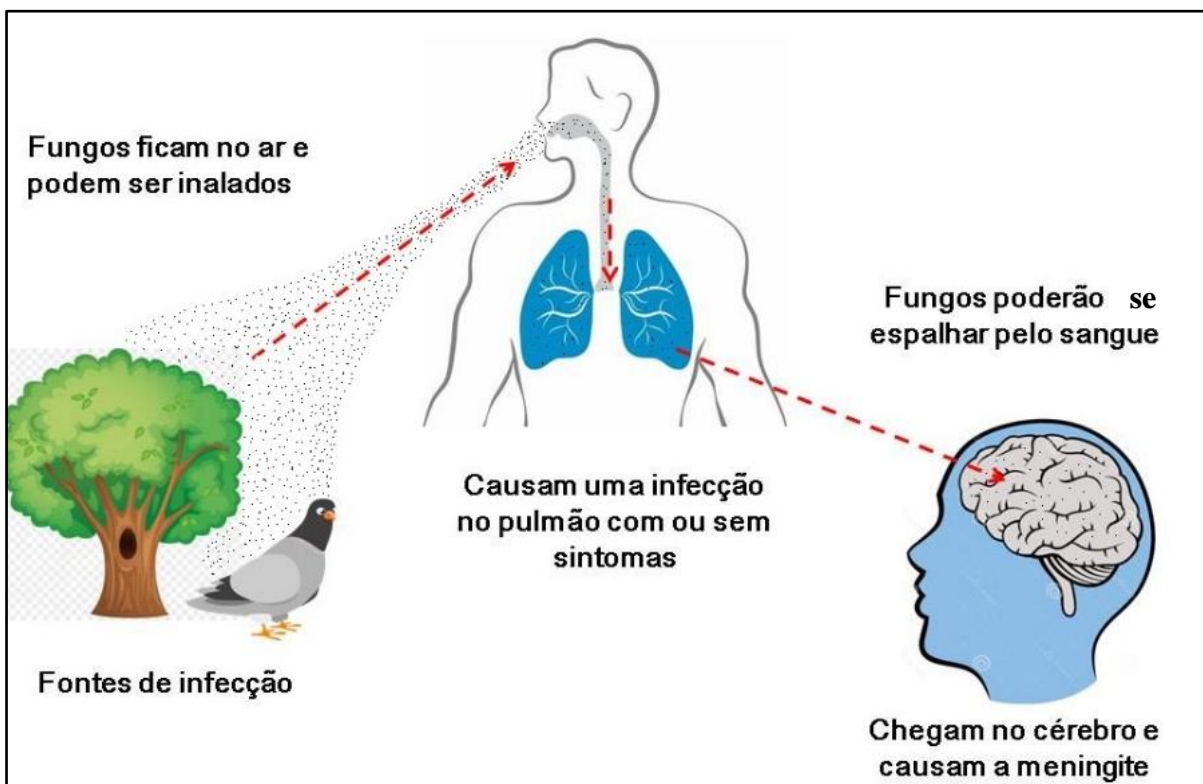


Figura 1. Esquema da infecção da criptococose por inalação de propágulos no ar e processos da infecção no ser humano.

2.1.1 AGENTES ETIOLÓGICOS: GENÓTIPOS, DISTRIBUIÇÃO E FATORES DE VIRULÊNCIA

Atualmente os agentes etiológicos da criptococose são classificados como pertencentes ao filo Basidiomycota, classe *Tremellomycetes*, ordem *Tremalles*, família *Tremellaceae* e gênero *Cryptococcus* (Mycobank Database). No ambiente encontram-se na forma sexuada ou telomórfica na qual *C. gattii* (sorotipos B e C) e *C. neoformans* (sorotipos A, D e AD) são denominados *Filobasidiella bacillispora* e *Filobasidiella neoformans*, respectivamente (Kwon-Chung, 1975).

Devido a patogenicidade das leveduras do complexo de espécies *C. neoformans/C. gattii*, muitas pesquisas envolvendo ferramentas moleculares têm sido desenvolvidas para verificar a divergência dos subtipos moleculares dentro de cada espécie. Várias técnicas de tipagem molecular tem sido aplicadas: multilocus enzyme eletroforesis (MLEE) (BRANDT et al., 1996), DNA *fingerprinting* (VARMA, 1992), DNA polimórfico amplificado randomicamente (RAPD) (CHEN et al. 1996), PCR *fingerprinting* (MEYER et al. 1993), polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (AFLP) (BOEKHOUT et al., 2001), polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP) do gene *URA5* (MEYER et al. 2003), sequenciamento da região do DNAr ITS 5.8S-ITS2 (KATSU et al., 2004) ou espaço intergênico (IGS) (DIAZ et al., 2005) e mais recentemente o multilocus sequence typing (MLST) (LITVINTSEVA et al., 2006a; MEYER et al., 2009).

Quadro1. Genótipos do complexo de espécies *C. neoformans/C.gattii* definidos por Meyer et al. (2003).

	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>		Híbrido A/D	<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	<i>C. gattii</i>			
Sorotipos	A	A	AD	D	B/C	B/C	B/C	B/C
Genótipos detectados a partir da RFLP do gene <i>URA 5</i>	VNI	VNII	VNIII	VNIV	VGI	VGII	VGIII	VGIV

C. gattii é prevalente em regiões tropicais e subtropicais da Austrália, África, Ásia, Califórnia (EUA) e América do Sul, mas pode ocorrer com menos frequência em zonas de clima temperados. No ambiente encontra-se associado a detritos de madeira em decomposição ou

colonizando ocos de árvores, principalmente do gênero *Eucalyptos* sp. árvore a qual está associado a décadas, mas no Brasil foi encontrado esse fungo habitando várias espécies de árvores e recentemente foi relatado ocorrendo em fezes de uma mamífero do gênero *Hyrax* exclusivo da África e Ásia(LAZERA et al., 2000; FORTES et al. 2001; LACAZ et al. 2002; MEYER e TRILLES 2010). Segundo Gassiep et al. (2018), 93 % dos hospedeiros infectados por *C.gattii* (sorotipo B/C) não apresentam imunossupressão.

C. neoformans tem distribuição universal, sendo responsável por 95% das infecções da criptococose (sorotipo A). Esse microrganismo é capaz de infectar ambos os grupos tanto os imunossuprimidos quanto os imunocompetentes. No ambiente esse fungo encontra-se associado à excreta de pombos (*Columbia livia*) e outras aves, grupos de invertebrados e colonizando ocos de uma variedade de árvores (EMMONS, 1955; RUIZ; NEILSON; BULMER, 1982; STEENBERGEN; SHUMAN; CASADEVALL, 2001).

Essas leveduras produzem vários fatores que potencializam a sua virulência. A cápsula mucilaginosa que é composta principalmente por dois tipos de polissacarídeos, glucunoroxilomanana e galactoxilomanana, responsáveis pela definição dos cinco sorotipos (A, B, C, D e AD). A cápsula também estimula a produção de citocinas e impede a fagocitose, pois exibe uma superfície que não é reconhecida, tornando-se invisível aos macrófagos (FRANZOT, SALKIN e CASADEVALL 1999; KOZEL e GOTSCHLICH 1982; ZARAGOZA et al. 2009). A enzima lacase sintetiza a melanina que confere proteção contra morte oxidativa e fagocitose pelos macrófagos e contribui para a disseminação extra-pulmonar (NOSANCHUK; CASADEVALL, 2006; PANEPINTO; WILLIAMSON, 2018).

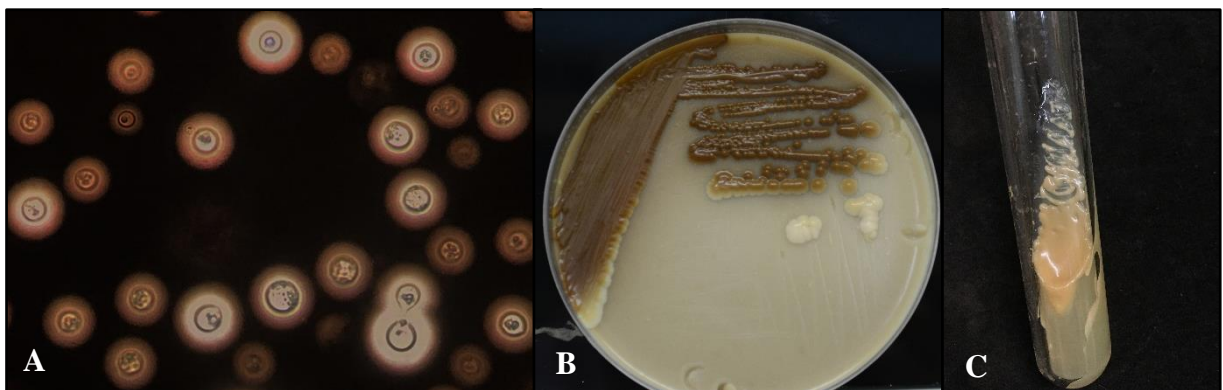


Figura 2. Características micro e macromorfológicas de *Cryptococcus* sp. A) Levedura globosa com cápsula polissacarídica evidenciada no fundo de Nankin (Fonte: Acervo pessoal). B) Produção de melanina em meio de cultivo seletivo agar níger (Fonte: Acervo pessoal). C) Levedura cor creme, mucilaginosa semeada em meio agar Sabouraud (Fonte: Acervo pessoal).

A fosfolipase B facilita a invasão do fungo no tecido pulmonar do hospedeiro e também contribui para a disseminação hematogênica. Tanto a fosfolipase B quanto a lacase estão na parede celular mediando a integridade e a formação da melanina, respectivamente (SIAFAKAS et al., 2007) (Imagem 3). A urease catalisa a formação da amônia a partir da ureia e essa atividade potencializa a invasão do fungo no SNC (NOSANCHUK; CASADEVALL, 2006; OLSZEWSKI et al., 2004; RODRIGUES et al., 2008; SIAFAKAS et al., 2007; ZHU; WILLIAMSON, 2004).

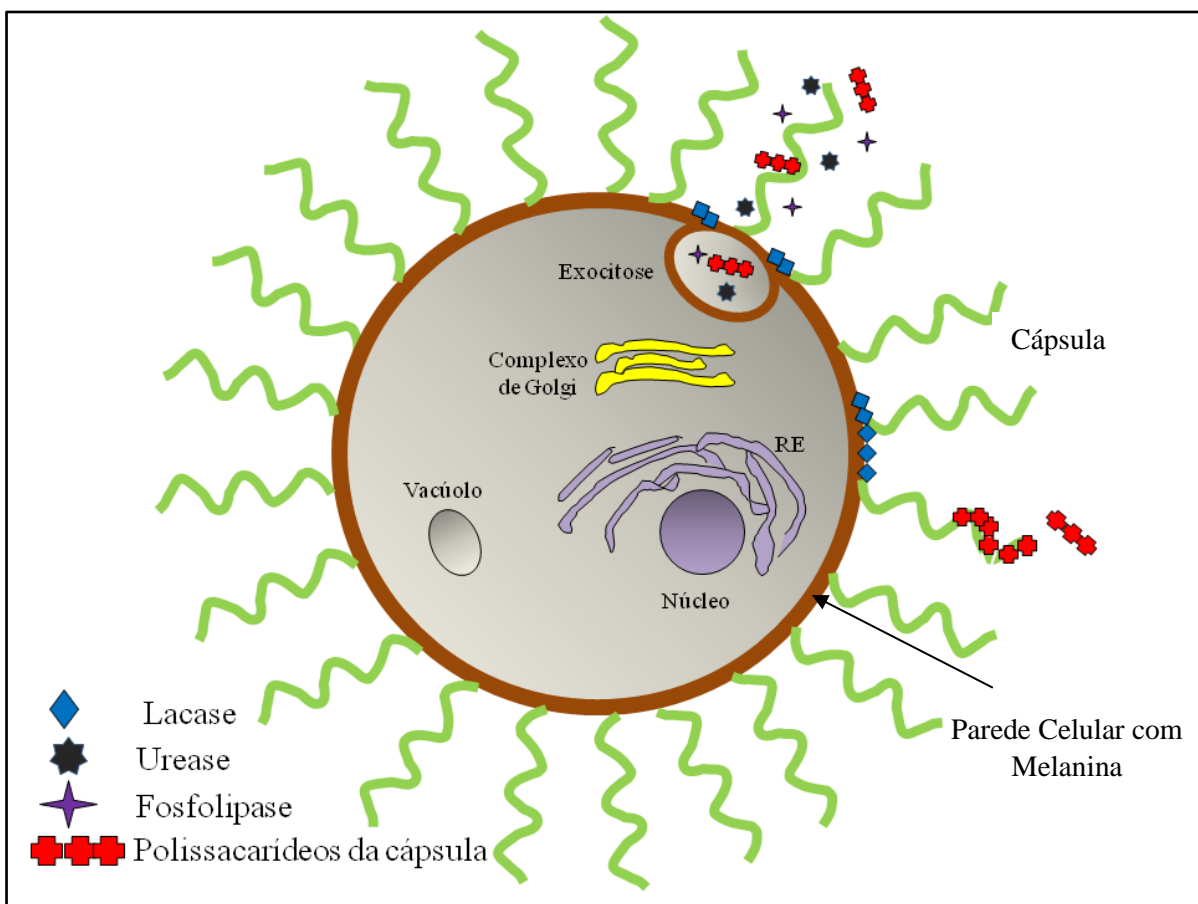


Figura 3. Célula de *Cryptococcus sp.* secretando seus fatores de virulência. Adaptado de: KRONSTAD et al., (2011).

2.1.2 ASPECTOS CLÍNICOS DA CRIPTOCOCOSE

Dentre todas as micoses oportunistas, a criptococose tem sido a mais prevalente em internações hospitalares, segundo o Sistema de Internação Hospitalar do Sistema Único de Saúde SIH-SUS (OMS, 2012).

Após a inalação das partículas infectantes ocorre a colonização do fungo em sua forma leveduriforme no tecido pulmonar o que leva ao quadro de pneumonia. Acredita-se que em alguns casos as leveduras permanecem em estado de latência nos fagocitossomos dentro dos gânglios linfáticos do tórax (MAZIARZ; PERFECT, 2016). O sistema imune também pode conduzir a formação de granulomas que podem ser formados na primeira infância (MAZIARZ; PERFECT, 2016). Quando a imunodeficiência ocorre as leveduras são reativadas e disseminadas na corrente sanguínea para diferentes órgãos (CHRÉTIEN et al., 2002; FRENCH et al., 2002; KRONSTAD et al., 2011b).

A disseminação para o SNC ocorre via migração através do endotélio microvascular (paracitose) ou o *Cryptococcus* sp. também pode utilizar as células do sistema de defesa como “cavalo de tróia” para chegar até os microcapilares que revestem o cérebro (Figura 4). Estudos relatam que a rota acontece após a ruptura dos criptococomas no espaço subaracnoide (CHRÉTIEN et al., 2002; OLSZEWSKI et al., 2004). Outros acreditam que uma rota alternativa pode acontecer pelo espaço perivascular (POLLOCK et al., 1997). O espaço perivascular é separado apenas pelo espaço subaracnoide pela pia-máter, aumentando a chance da disseminação por essa rota (POLLOCK et al., 1997; KINNECOM; PACHTER, 2005).

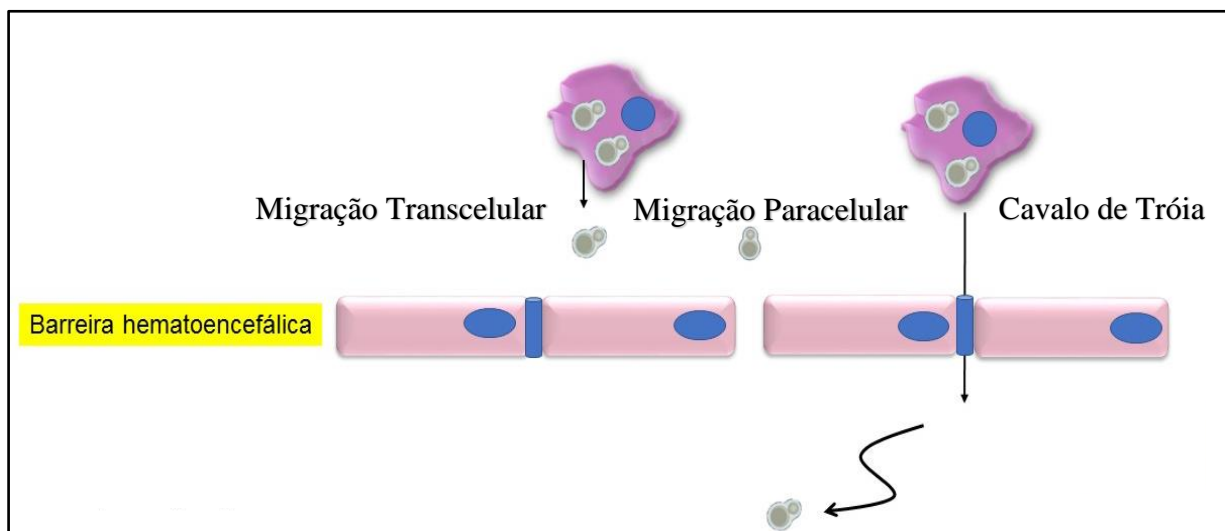


Figura 4. Esquema mostrando como as leveduras de *Cryptococcus* sp. migram para SNC. Adaptado de: LIU; PERLIN; XUE, (2012).

Com a chegada das leveduras no SNC ocorre a meningoencefalite a qual apresenta os seguintes sintomas como dor de cabeça, febre, confusão mental, perturbação visual, rigidez da nuca, pressão intracraniana, letargia, coma, demência e outros sintomas neurológicos

(BRIZENDINE; BADDLEY; PAPPAS, 2013; LARSEN et al., 1989; LIN; HEITMAN, 2006; STEINER; POLACHECK; MELAMED, 1984).

A neurocriptococose é marcada por uma resposta inflamatória intensa e aguda. Estudo de Rocha et al. (2018) demonstrou que 100% dos pacientes HIV negativos internados na FMT-HVD no período de 2014-2016 desenvolveram a neurocriptococose (GEORGE et al., 2018; LUI et al., 2006; PAPPAS, 2013b; ROCHA et al., 2018).

A mortalidade da criptococose é alta e ocorre principalmente em países que tem um acesso precário a cuidados da saúde como principalmente a África e partes da Ásia. Na África Subsaariana onde a taxa de mortalidade chega a 75% da média global, enquanto nos Estados, depois do uso dos ART, a taxa atual permanece em 28,8 %. O Brasil e a Colômbia são os países que relatam mais casos de criptococose dentre os países da América Latina, entre 1001 a 2500 casos por ano seguido de Argentina e México com 501 a 1000 casos (GEORGE et al. 2018).

2.2 CRIPTOCOCOSE EM PACIENTES NÃO HIV

Nos últimos anos é notável o esforço das pesquisas para compreender acerca da patogenicidade da criptococose em pacientes HIV positivos. Entretanto, são escassos dados clínicos e imunológicos que abordam os fatores pelos quais hospedeiros aparentemente hígidos adquirem essa infecção. Acredita-se que deficiências no sistema imune inato, desordens genéticas, comorbidades, transplantes, utilização de imunossupressores e câncer sejam os principais fatores que aumentam a pré-disposição a infecção nesses hospedeiros (O'HALLORAN; POWDERLY; SPEC, 2017).

Os casos de criptococose em pacientes não HIV ocorrem com maior frequência nos países asiáticos principalmente na China. Dentre 154 casos de criptococose relatados no Hospital de Huashan em Shangai, 103 (66,9 %) dos casos foram de pacientes não HIV (ZHU et al., 2010). Um estudo realizado no hospital Emílio Ribas em São Paulo, no período de 2007 a 2014, relatou 29 pacientes não HIV e não transplantado (NHNT) diagnosticados com criptococose. As comorbidades associadas a 22,2% dos pacientes foram: diabetes (4 casos), órgão com neoplasia (1) e síndrome de hiper IgE (1) (LOMES et al., 2016).

O controle eficiente da criptococose requer a ativação do sistema imune inato e resposta inflamatória efetiva (Garelnabi e May 2018). A primeira defesa contra os agentes patogênicos é mediada por dois tipos de células a Th1 e a Th2 (WOZNIAK et al., 2009). A primeira é efetiva

na remoção do patógenos por causa da produção de IFN – e citocinas que atuam no recrutamento das células de defesa. Enquanto que as células Th2 produzem citocinas que deixam os hospedeiros mais vulneráveis a desenvolver uma doença severa e a vir a óbito (MÜLLER et al., 2007). O polissacarídeo glucoronoxilomana (GXM) presente na cápsula do *Cryptococcus* sp. inibe diretamente a proliferação de células Th1 em camudongos, diminuindo o combate a infecção (YAUCH, LAM e LEVITZ 2006).

Além da atuação do sistema imune, as desordens genéticas e doenças crônicas também aumentam a suscetibilidade a criptococose. A lectina ligadora de manose (MBL) é uma proteína associadas a doenças infecciosas sendo um importante membro dos receptores de reconhecimento de patógenos (PRRs) que são essenciais para ativar o sistema imune inato do hospedeiro, sendo assim a MBL desempenha um papel importante na defesa do hospedeiro (KERRIGAN; BROWN, 2009). A malformação da MBL é causada por mutações do gene *MBL-2* que resultam em aumento da suscetibilidade a inúmeras infecções, entre elas a criptococose.

Um estudo investigou a correlação do gene da MBL com a infecção da criptococose em pacientes não HIV. Em um total de 103 pacientes com criptococose foi verificado a produção de MBL. Os autores encontraram associação entre a deficiência da MBL com a criptococose devido a proporção de genótipos deficientes produtores de MLB ser maior em pacientes com criptococose que o grupo controle. Esses resultados sugerem que deficiência em MBL é uma predisposição genética para a meningite criptocócica (OU et al., 2011).

A proteinose alveolar pulmonar, causada pela presença de anticorpos contra fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), tem sido associada a infecções intracelulares como a criptococose (LEE; CHEW; ROBINSON, 1999). Alguns pacientes aparentemente imunocompetentes com neurocriptococose por *C.gattii* foram relatados com anti-GM-CSF que inibe a sinalização dos macrófagos bloqueando a fosforilação do STAT5 (ROSEN et al., 2013; SAIJO et al., 2014). Anticorpos contra o IFN- γ também tem sido relacionado a infecções oportunistas como a tuberculose e a criptococose (BROWNE et al., 2012).

Infecções fúngicas também tem sido associadas a síndrome da monocitopenia esporádica dominante autossômica. Essa doença rara é causada por mutações com perda de função do gene *GATA2*, essencial para a proliferação e desenvolvimento das células

hematopoiéticas (SPINNER et al., 2014; VINH et al., 2010). Assim como, várias mutações ligada ao X têm sido associada a hiper-IgM relatado e um estudo por casos de criptococose em crianças com mutações no gene *CD40L* ligado a hiper-IgM (JACOBS et al., 1984; P. PACHARN et al., 2019).

Os receptores gama Fc (FcγRs) medeiam várias respostas imunes após a ligação de patógenos ou complexos imunes a IgG e atuam como reguladores de doenças autoimunes e infecções (CLATWORTHY; SMITH, 2004; WENINK et al., 2009). Estudos revelam que o polimorfismo do gene *FCCR*, gene que codifica os FcγRs, está associado a suscetibilidade a diversas infecções como meningite criptocócica, pneumonia por *Haemophilus influenza* e desenvolvimento de malária severa (ENDEMAN et al., 2009; NASR et al., 2007; PLATONOV et al., 1998).

Um estudo com 117 pacientes não HIV foi realizado para correlacionar o efeito do polimorfismo do gene *FCGR* com a suscetibilidade a meningite criptocócica. Dentre o total de pacientes, 59 deles apresentavam fatores de predisposição como: doenças autoimunes, diabetes mellitus, cirrose, transplante renal, uso de corticoides, doença renal crônica e linfopenia idiopática. Em pacientes com meningite criptocócica o genótipo *FCGR2B 232I/I* foi detectado com frequência, enquanto o gene *FCGR2B 232I/T* foi menos detectado. Além disso esse genótipo foi o menos frequente em paciente sem fatores de predisposição. Esses resultados sugerem que o polimorfismo genético do receptor FcγRIIB pode contribuir para a suscetibilidade a meningite criptocócica (HU et al., 2012).

Foi observado em um estudo nos EUA com 300 pacientes não HIV com neurocriptococose que destes 24% apresentavam doença crônica no fígado, pulmão e rim; 25% faziam tratamento com esteróides e 15% realizaram transplantes. Contudo, doenças hematopoiéticas também aumentam o risco para a neurocriptococose em indivíduos não HIV. Além disso, existe uma possível associação entre a criptococose a sarcoidose, assim como outras doenças autoimunes. Em outro estudo com 207 pacientes sendo 86 HIV positivos, 42 transplantados e 79 não HIV foi atribuído uma mortalidade duas vezes maior para não HIV que para HIV positivo e transplantados (BRATTON et al., 2012; PAPPAS et al., 2001).

Em um estudo com 8.769 casos de criptococose relatados entre os anos de 1985 a 2010, um total de 3.698 pacientes foram descritos com comorbidades. Entre elas a mais comum foi infecção pelo vírus HIV (15,74%), tuberculose (14%), doenças no fígado (12%), lúpus eritematoso sistêmico (8,76%), diabetes mellitus (5,76%), doenças renais (4,24%) e câncer

(3,33%) (YUCHONG et al., 2012). Recentemente, um estudo de coorte verificou que indivíduos NHNT têm mais comorbidades que pacientes com HIV. Nesse estudo foram avaliados 300 pacientes diagnosticados com criptococose no período de 2002 a 2017. Dentre eles, 158 (52%) pacientes eram NHNT, sendo 62 (39%) aparentemente imunocompetentes, 38 (23%) com malignidade em órgãos sólidos, 22 (14%) com malignidade hematológica, 36 (23%) realizavam quimioterapia, 27 (17%) tinham doença no fígado e 23 (15%) realizavam tratamento com glicocorticoide (HEVEY et al., 2019).

2.3 SEQUELAS DECORRENTES DA CRIPTOCOCOSE

As principais sequelas adquiridas por pacientes não HIV estão relacionadas a comprometimento do SNC. O aumento da pressão intracraniana contribui para o desenvolvimento das sequelas e conseqüentemente para aumento da mortalidade (VAN DER HORST et al, 1997). A maioria dos pacientes que desenvolvem a neurocriptococose desenvolvem a hidrocefalia devido aos altos níveis de proteínas e polissacarídeos que podem se acumular nas vilosidades aracnoides ou espaços subaracnoides e assim bloquear a saída do LCR (LU et al., 1999). Essas sequelas neurológicas podem incapacitar os sobreviventes a exercer suas atividades diárias e até mesmo impossibilitar o retorno ao trabalho. As sequelas podem ser tontura, perda da memória de curto prazo, depressão severa, comprometimento dos nervos cranianos, surdez e cegueira (ECEVIT et al., 2006).

A perda da visão é uma das sequelas mais frequentes ocorrendo em aproximadamente 40% dos pacientes que desenvolvem a neurocriptococose, ocasionando deterioração progressiva da visão até a cegueira (COHEN; GLASGOW, 1993; MORE et al., 2016; ADERMAN et al., 2018; ALDHALEEI; BHAGAVATHULA; ALHAJERI, 2019;). As causas não são claras, mas é possível que seja por infecção direta ou aracnoidite adesiva perineurítica, invasão dos nervos pelo fungo causando a perda da visão, hipertensão intracraniana, vasculite cerebral, compressão do nervo óptico e a toxicidade da anfotericina B (COHEN; GLASGOW, 1993; ECEVIT et al., 2006a; DUGGAN; WALLS, 2012; CURI; LAZERA; VASCONCELOS-SANTOS, 2016; MORE et al., 2016). Entre esses mecanismos, o aumento da pressão intracraniana é considerado o fator mais comum associado a perda de visão (VIEIRA et al., 2015) (Tabela 1).

Outro fator relevante para o desenvolvimento de complicações renais é o tratamento com anfotericina B, a qual é nefrotóxica. Estudos revelam que o antifúngico padrão, usado para combater vários fungos patógenos, contribui para aumentos dos níveis séricos de creatinina levando a insuficiência renal e aumento da mortalidade (DERAY; MERCADAL; BAGNIS, 2002). Em pacientes não HIV as leveduras migram com menos frequência para os demais órgãos: pele, considerada a terceira manifestação clínica mais comum; olhos causando a perda da visão devido a infiltração de leveduras no nervo óptico; próstata, sendo um importante reservatório das leveduras podendo ocasionar recaída da doença em pacientes com alta carga fúngica no organismo (LARSEN et al., 1989; MAZIARZ; PERFECT, 2016; SEATON et al., 1997).

Tabela 1. Comorbidades relacionadas a imunossupressão e sequelas observadas em pacientes não HIV acometidos por criptococose no mundo.

Idade/ Sexo	País	Espécie	Comorbidades/ Imunossupressão	Sequelas	Referência)
51/F	Brasil	<i>Cryptococcus gattii</i>	Diabetes mellitus	-	Araújo et al.,(2012)
62/F	Brasil	<i>Cryptococcus gattii</i>	-	Perda da visão e da audição	Favalessa et al., (2014)
7/M	India	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Tuberculose	Perda da visão	Jain et al., (2017)
81/M	Japão	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Doença renal crônica/Diabetes mellitus/câncer de próstata	Choque séptico/Falha múltipla dos órgãos	Hoshino et al., (2017)
14/F	México	<i>Cryptococcus neoformans</i>	-	Edema cerebral/Falha múltipla dos órgãos	Becerra-Pedraza et al., (2017)
54/F	Brasil	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Hipertensão	Insuficiência renal	Paiva et al., (2018)
81/F	China	<i>Cryptococcus neoformans</i>	-	Hidrocefalia e infarto cerebral	Zhou et al., (2018)
12/F	Turquia	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Herpes Labial/Pneumonia/Hipogamaglobulinemia	Perda da visão	(Aldemir Kocabas et al., (2018)

49/F	Alemanha	<i>Cryptococcus gattii</i>	-	Perda da visão	Bauer et al., (2018)
40/M	Estados Unidos	<i>Cryptococcus neoformans</i>	-	Hidrocefalia	Hamdan et al., (2018)
66/F	Tailândia	<i>Cryptococcus gattii</i>	Hipertensão	-	Dhitinanmuan Chongtrakool; Jitmuang, (2018)
71/M	Japão	<i>Cryptococcus gattii</i>	Hipertensão	-	Kitaura et al., (2018)
26/M	India	<i>Cryptococcus gattii</i>	Linfopenia D4 ⁺ Idiopática	Complicações neurológicas	Eshwara et al., (2018)
56/M	China	<i>Cryptococcus</i> sp.	Tuberculose	-	Sawai et al., (2018)
20/F	Canadá	<i>Cryptococcus gattii</i>	Osteopetrose autossômica dominante tipo 2	Insuficiência renal	St-Pierre et al., (2018)
42/F	África	<i>Cryptococcus gattii</i>	Hipertensão /Malária	Diminuição da acuidade visual	Wilson et al., (2018)
30/F	África	<i>Cryptococcus</i> sp.	Malária/Doença Renal/Transplante renal/Diabetes mellitus/Sarcoma de Kaposi	Insuficiência renal/Sepse	Muranda et al., (2018)
80/M	Estados Unidos	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Asma / Doença de obstrução pulmonar crônica / Infecção por <i>Mycobacterium</i>	-	Quintero et al., (2019)
84/F	África	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Diabetes/ Malária	-	Owuor and chege, (2019)

2.4 GENOTIPAGEM

As ferramentas moleculares permitem aplicar e desenvolver métodos de genotipagem para detectar os tipos moleculares de isolados de *Cryptococcus* sp. Analisando os genótipos inter e intra espécies é possível mapear a distribuição de cepas altamente virulentas, aprimorar a terapia com o diagnóstico rápido e ter uma rápida e efetiva prevenção contra surtos (Meyer e Trilles 2010).

Embora vários métodos moleculares tenham surgido para tipagem molecular de *C. neoformans* e *C. gattii*, PCR *fingerprinting*, AFLP e MLST são os mais utilizados, pois seus resultados geram dados que podem ser comparados entre si por meio de bancos de dados (Cogliati 2013).

Na técnica de PCR *fingerprinting* utiliza-se um primer único onde o perfil das bandas de DNA forma uma impressão única para cada microrganismos podendo ser possível identificar cepas e subtipos. Em 1993 foi aplicada pela primeira vez em cepas de *Cryptococcus* sp. no qual o alto polimorfismo separou as cepas em dois grupos: sorotipos A e D e outro grupo sorotipos B e C. Com essa ferramenta, a partir de um estudo com 360 cepas globais, sendo 271 *C. neoformans* e 69 *C. gattii* utilizando a PCR *fingerprinting* e o RFLP do gene URA5, foi possível mostrar que existem oito genótipos distintos (VNI, VNII, VNIII, VNIV, VGI, VGII, VGIII e VGIV) (Meyer et al. 2003).

Existem três importantes passos na técnica da AFLP: 1) Ocorre a digestão do DNA por enzimas de restrição (endonucleases); 2) Esses fragmentos de DNA são amplificados pela PCR utilizando pares de primers contendo sequencias comuns; 3) Visualização dos fragmentos amplificados por meio da eletroforese em gel de agarose. Quando esse DNA digerido é posto na PCR gera um perfil único que depende dos nucleotídeos presentes nos primers. Analisando 207 amostras globais de *C. neoformans* e *C. gattii* Boekhout et al. (2001) identificaram seis genótipos AFLP entre as amostras: (AFLP1, AFLP2 e AFLP3) entre as amostras de *C. neoformans* e (AFLP4, AFLP5, AFLP 6) entre as de *C. gattii*. Logo depois outros dois subtipos do AFLP1 foram identificados (AFLP1A e AFLP1B) e outro AFLP7 para *C. gattii*. Com essa técnica foi possível desvendar o perfil das cepas de *C. gattii* que causaram o surto na ilha de Vancouver, sendo elas: AFLP6A e AFLP6B. De todas as amostras isoladas 75% eram AFLP6A, forma mais virulenta (BOEKHOUT et al., 2001; FRASER et al., 2005a; VOS et al., 1995).

O tipo molecular predominante no mundo é o *C. neoformans* VNI (sorotipo A), isolado de amostras clínicas/veterinárias e ambientais. Foi observado uma diferença de distribuição global, com alta prevalência de *C. neoformans* mundialmente e *C. gattii* altamente distribuído nas Américas e no Hemisfério Sul. *C. gattii* é pouco encontrado em amostras clínicas e ambientais da Europa, incluindo Rússia, regiões da Ásia, China, Japão e Tailândia. A maioria das infecções em pacientes imunocomprometidos é causado por VNI, quanto que em pacientes não HIV predomina as formas moleculares VGI e VGII, com exceção do Japão, onde predomina a forma molecular VNI (MEYER; TRILLES, 2010).

Na América do Sul os tipos moleculares que ocorrem são o VNI seguido do VGII. Entretanto, na América do Norte o predominante é o VGII seguido do VNI. Na Oceania o tipo molecular mais encontrado é o VGI e na Europa o VNI. Na África é encontrado VNI, VNB e VNIII, sendo raros os genótipos de *C. gattii* (COGLIATI, 2013).

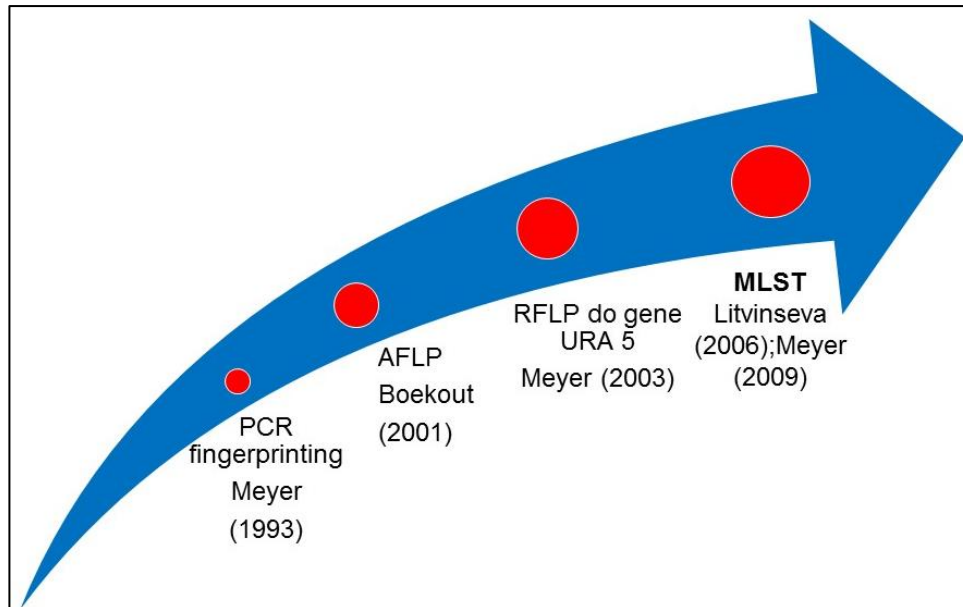


Figura 5. Histórico do desenvolvimento das ferramentas moleculares para genotipagem do complexo de leveduras *C. neoformans/C. gattii*.

2.4.1 MLST COMO UMA FERRAMENTA EPIDEMIOLÓGICA

Um das ferramentas moleculares mais utilizadas atualmente para diferenciar as variedades genotípicas dentro do complexo de espécies *C. neoformans/C. gattii* tem sido o Multilocus Sequence Typing (MLST). Essa técnica é baseada na análise do polimorfismo das sequências nucleotídicas de fragmentos de genes conservados, chamados “*house-keeping genes*”. O MLST foi proposto inicialmente em 1998 com o objetivo de fornecer dados confiáveis para a investigação epidemiológica de cepas altamente virulentas de *Neisseria meningitidis*. Nesse estudo eles analisaram 11 genes de 101 isolados evidenciando a alta diversidade entre os clones de *N. meningitidis* (MAIDEN et al., 1998).

Combinando o MLST com o método AFLP, mais comumente utilizado, é possível obter um alto poder discriminatório entre as cepas de *C. neoformans* var. *grubii*. A utilização dessas duas ferramentas demonstrou que a cepa de *C. neoformans* sorotipo A encontrada em Bostwana é uma variedade única e restrita ao Sul da África. Esse primeiro estudo analisou 102 isolados de *C. neoformans* var. *grubii*, para o MLST foram empregados 12 loci: *CAP10*, *CAP59*, *GPD1*,

LAC1, *MPD1*, *MP88*, *SOD1*, *TEF1 α* , *TOP1*, *URE1* e a região *IGS1* do DNA ribossomal. O MLST encontrou três grupos VNI, VNII e um novo genótipo VNB encontrado na região de Bostwana (LITVINTSEVA et al., 2006).

Um outro estudo analisou 9 loci de 202 cepas clínicas e ambientais que teve com objetivo investigar as variedades entre os genótipos das cepas que causaram o surto em Vancouver. O MLST revelou dois sub-genótipos VGIIa e VGIIb extremamente divergentes entre as cepas de *C. gattii*, estas tinham sido previamente identificados por RAPD (FRASER et al., 2005). Baseado nos estudos anteriores, em 2007 os membros do grupo da Sociedade Internacional de Micologia Médica Veterinária (ISHAM) estabeleceram o MLST como técnica padrão-ouro para tipagem molecular das cepas patogênicas de *Cryptococcus* sp. Esse padrão é baseado no sequenciamento de sete loci polimórficos: *CAP59* (responsável pela cápsula polissacarídica), *LAC1* (lacase), *GPD1* (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), *PLB1*(fosfolipase), *SOD1* (superóxido dismutase), *URA5* (urease) e a região *IGS1* (espaço intergênico) que representam o número mínimo de genes que conferem o máximo poder discriminatório entre os isolados (MEYER et al., 2009).

A vantagem do MLST sobre os outros métodos de tipagem molecular é a portabilidade das sequências entre os laboratórios permitindo a construção de um banco de dados global, permitindo estudos sobre a epidemiologia, distribuição e comparação filogenéticas entre os microrganismos (Urwin e Maiden 2003). Um exemplo dessa portabilidade via internet entre os laboratórios é o Banco de Dados *Fungal MLST Database* coordenado pela ISHAM. Esse banco de dados permite alinhamentos das sequências de interesse a sequências de referência. Cada variação na sequência do locus do gene recebe uma combinação em um perfil alélico e com isso é fornecido seu Sequence Typing (ST) (MEYER et al., 2009).

No Estado do Amazonas, até o momento, cinco estudos realizaram a caracterização molecular por MLST de amostras clínicas e ambientais de *Cryptococcus* sp. O primeiro estudo avaliou o relacionamento dos subtipos de VGII da América do Norte com a coleção global de *C. gattii* e o papel dos genes na virulência e adaptação dos nichos. Cepas clínicas, ambientais e provenientes de animais totalizando 118 cepas de *C. gattii* isoladas dos cinco continentes foram avaliados nesse trabalho, entre elas uma amostra do Amazonas de ST7 (VGIIb), genótipo distribuído globalmente e relacionado com o surto em Vancouver, Canadá. Outro estudo isolou cepas de *C. gattii* VGII de poeira domiciliar no município de Santa Isabel do Rio Negro. Com o MLST foi possível obter a variedade genética das 45 cepas de *C. gattii* isoladas e distribuídas em oito STs: ST20 (n=11) de VGIIa, ST7 (n=22) de subtipo VGIIb, estes foram previamente

encontrados em Vancouver e nos EUA. ST5 (n=2), ST264 (n=6) para o genótipo VGII e os ST265, ST266, ST267 e ST268 (n=1 cada) foram descritos com nova variação das sequências alélicas (ST), isolados pela primeira vez no mundo (BRITO-SANTOS et al., 2015) (Tabela 3).

SOUTO et al., (2016) verificou a diversidade genética de cepas de *Cryptococcus* sp. no Brasil. Como resultado foram descritos os seguintes STs para cepas clínicas isoladas no Amazonas: ST20, ST288, ST5, ST7 e ST274. Outro trabalho semelhante ao de Brito-Silva et al. (2015) analisou poeira domiciliar de residências em uma comunidade rural do município de Iranduba. E pela primeira vez foi identificado o ST46 (*C. gattii*) e o ST93 (*C. neoformans*) em amostras ambientais no Amazonas. Essas pesquisas em residências típicas da nossa região, em sua maioria de madeira, demonstram a possibilidade de infecções domiciliares. Além de evidenciarem a diversidade genética das cepas isoladas, que podem compartilhar o mesmo habitat (ALVES et al., 2016).

Recentemente Rocha et al. (2018) analisaram 38 isolados clínicos de pacientes diagnosticados na FMT-HVD. O MLST identificou que os pacientes com HIV foram exclusivamente infectados pelo ST93 (*C. neoformans*/VNI), o que demonstra que em nossa região esse ST tem importância clínica e epidemiológica associada com alta morbidade de pacientes HIV positivos. Outros dois STs para cepas de *C. gattii* (VGII) foram ST172 e ST5 e um novo ST foi descoberto, nomeado ST445. O MLST destacou nesse estudo a variabilidade entre as cepas de *C. gattii* e um grupo único de *C. neoformans* formado pelo ST93 (ROCHA et al., 2018).

Tabela 2. Estudos que utilizaram o MLST como ferramenta para identificação de isolados de *C. gattii* no Estado do Amazonas. A- Amostras ambientais; C – Amostras clínicas; ST – Sequence typing.

(Autor ano)	Origem	Genótipo	Genes do MLST							
			CAP 59	GPD 1	IGS 1	LAC 1	PLB 1	SOD CG	URA 5	ST
(ENGELTHA LER et al., 2014)	C	VGII	2	6	10	4	2	15	2	7
	A	VGII	3	16	15	4	9	23	3	5
	A	VGIIb	2	6	10	4	2	15	2	7
	A	VGIIa	1	1	4	4	1	14	7	20
(BRITO- SANTOS et al., 2015)	A	VGII	21	6	25	4	2	27	7	264
	A	VGII	3	16	15	4	9	27	2	265
	A	VGII	1	1	4	4	16	14	7	266
	A	VGII	2	1	4	4	1	14	7	267
	A	VGII	69	6	82	4	1	14	6	268

(SOUTO et al., 2016)	C	VGII	3	16	15	4	9	23	3	5
	C	VGIIb	2	6	10	4	2	15	2	7
	C	VGIIa	1	1	4	4	1	14	7	20
	C	VGII	4	21	36	4	18	22	2	274
	C	VGII	3	16	15	4	9	15	2	288
(ALVES, et al., 2016)	A	VGII	26	6	4	28	2	27	2	46
(ROCHA et al., 2018)	C	VGII	3	16	15	4	9	23	3	5
	C	VGII	4	17	80	16	1	88	7	172
	C	VGII	2	6	26	21	1	27	7	445

2.5 RESISTÊNCIA ANTIFÚNGICA

Com o aumento da resistência antifúngica surge a alta demanda por novos antifúngicos. A resistência de um microrganismo é observada quando o crescimento do patógeno é inibido por uma concentração de antimicrobiano maior que a faixa observada para cepas selvagens, aumentando assim a concentração inibitória mínima (CIM) do fármaco. A criptococose tem causado significativa morbidade e mortalidade, assim também como custo elevado no tratamento (ALEXANDER e PFALLER 2006; PFALLER 2012).

O tratamento da criptococose consiste em três fases: 1) Indução para reduzir a carga fúngica sendo preconizado a combinação de Anfotericina B (AMB) da classe dos polienos com Flucitosina (5-FC) um antifúngico fluorado sintético; 2) Consolidação que tem como objetivo a negatização da carga fúngica e normalização dos parâmetros clínicos por meio da administração de Fluconazol (FLC) da classe dos triazólicos em alta concentração 400 mg/d; 3) Manutenção onde o tratamento varia de acordo com o estado geral do hospedeiro podendo durar de seis meses a um ano, nesse caso o FLC é administrado a uma concentração menor de 200mg/d (PERFECT et al., 2010).

A resistência das cepas de *Cryptococcus* sp. não é comum. Para verificar a atividade de 1.811 isolados de *Cryptococcus* sp. frente a seis antifúngicos, Pfalleer et al. (2005) realizaram teste *in vitro* com isolados de coleções de cinco regiões mundiais e não houve ocorrência de resistência, todos agentes antifúngicos, entre eles AMB e FLC, apresentaram atividade contra os patógenos (PFALLER et al. 2005).

A resistência à AMB é rara, sendo esta classe potente agente fungicida usada nestes últimos 50 anos (GALLIS; DREW; PICKARD, 1990). A classe dos polienos causa instabilidade nas células fúngicas devido à ligação ao ergosterol da membrana. Entre outros efeitos, essa ligação induz a formação de poros e o extravasamento do citoplasma o que promove a rápida morte celular (BRAJTBURG et al. 1990).

Foi observado que cepas de pacientes HIV são menos sensíveis a FLC que cepas de pacientes imunocompetentes (TRILLES et al., 2012). O FLC é a terapia de primeira escolha para a profilaxia da criptococose e esse tratamento prolongado tem causado resistência em cepas de *C. neoformans*, além disso espécie *C.gattii* mostra ter alta taxa de heteroresistência inata frente FLC (VARMA; KWON-CHUNG, 2010). A resistência de *Cryptococcus* sp. a classe dos azóis está relacionada a mutações genéticas do gene *ERG* (RODERO et al., 2003; SIONOV et al., 2012). O FLC e o ITC possuem o mesmo mecanismo de ação, esses medicamentos induzem a oxidação *in vitro*. O tratamento com FLC não induz a formação de radicais livres enquanto o ITC atua produzindo radicais livres no início do tratamento, desencadeando o sistema enzimático oxidativo (FERREIRA et al., 2013).

Alves et al. (2016) verificaram a sensibilidade de 7 cepas do complexo de espécies *C. neoformans/C.gattii* isolados ambientais na cidade de Manaus. Nesse estudo foram realizados os testes de sensibilidade com fitas E-test e como resultado todos os isolados foram sensíveis aos antifúngicos Anfotericina B, Fluconazol, Cetoconazol, Itraconazol e Posaconazol. Em outro estudo (ALVES, 2016) descreveu variações significativas do valor da CIM para isolados ambientais de poeira domiciliar no município do Iranduba, AM. A suscetibilidade foi elevada para cepas de *C. neoformans* frente a fluconazol (2-48 µg/mL) e as cepas *C. gattii* foram resistentes com variação de (8-256 µg/mL. Rocha et al. (2018) realizaram testes de microdiluição em caldo para cepas clínicas isoladas no Amazonas e todas foram sensíveis aos antifúngicos AMB, FLC e ITC (ALVES et al., 2016; ROCHA et al., 2018).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar aspectos clínicos e moleculares da criptococose em pacientes não-HIV no estado do Amazonas, Brasil.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever as características clínico-epidemiológicas e laboratoriais dos casos de Criptococose em pacientes não HIV;
- Genotipar os agentes por multilocus sequence typing (MLST) para definir os sequence types (STs) dos isolados clínicos;
- Verificar a correlação genética entre os subtipos moleculares (STs) dos isolados regionais com outros descritos na literatura;
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos antifúngicos Anfotericina B, Fluconazol e Itraconazol frente aos isolados.

4. METODOLOGIA

4.1 MODELO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo de corte transversal, retrospectivo e prospectivo que foi realizado com o objetivo de descrever aspectos moleculares dos agentes etiológicos e clínico-epidemiológicos dos pacientes não-HIV acometidos por criptococose no período de Julho de 2016 a Junho de 2019 e atendidos Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD).

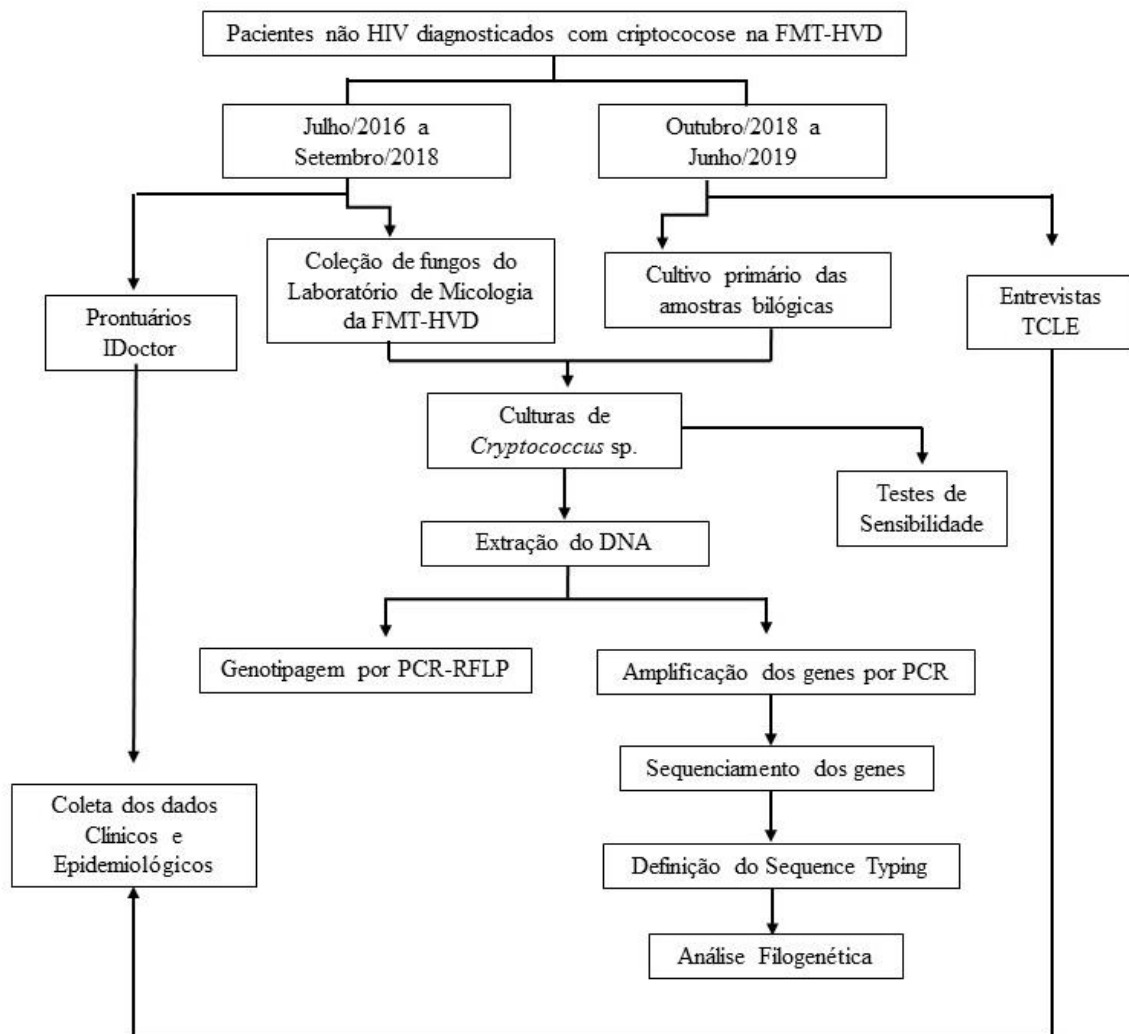


Figura 6. Fluxograma dos procedimentos e metodologia do trabalho.

4.2 LOCAIS DE ESTUDO

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Micologia da FMT-HVD, onde os pacientes com criptococose foram diagnosticados e onde também foi realizado o isolamento por cultivo das respectivas cepas fúngicas. Parte deste estudo também foi realizado na Unidade de internação hospitalar Prof. Nelson Antunes, onde os pacientes foram entrevistados.

Os procedimentos de extração de DNA, reação em cadeia da polimerase (PCR) e a purificação dos produtos de PCR foram executados no Laboratório de Micologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e o preparo das amostras de DNA para a reação de sequenciamento foi realizado no Laboratório de Micologia do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI), Fiocruz do Rio de Janeiro.

4.3 POPULAÇÃO ANALISADA E PERÍODO DE ESTUDO

Esse estudo avaliou, no período de Julho de 2016 a Junho de 2019, pacientes não HIV que apresentaram diagnóstico micológico de infecção por leveduras do complexo *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii*. Foram incluídos os pacientes que atenderam os critérios abaixo.

4.3.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídos no presente estudo pacientes não HIV diagnosticados com criptococose que: a) que possuíam cultivo positivo para *Cryptococcus* sp.; b) que foram diagnosticados com criptococose por meio de exame direto a partir do líquido cefalorraquidiano (LCR); c) que aceitaram participar da pesquisa voluntariamente mediante o consentimento do TCLE ou sob autorização do responsável legal mediante a assinatura do Termo de Assentimento para menores; d) que possuíam suas informações clínico-epidemiológicas disponíveis no sistema de prontuários *IDoctor*.

4.3.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos pacientes diagnosticados com criptococose na FMT-HVD que: a) que ao longo da pesquisa foram identificados com portadores do vírus HIV; b) tiveram as culturas inviáveis por contaminação; c) suas culturas não estiveram disponíveis nos acervos do laboratório de Micologia da FMT-HVD; e) pacientes que decidirem abandonar o estudo.

4.3.3 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

Esse estudo foi revisado e aprovado pelo Comitê de Ética da FMT-HVD sob o CAAE de número 90749718.3.0000.0005.

4.4 PROCEDIMENTOS

4.4.1 COLETA DE DADOS CLÍNICOS- EPIDEMIOLÓGICOS

Os dados clínico-epidemiológicos foram obtidos dos prontuários e histórico dos pacientes disponível no sistema *iDoctor* que é uma plataforma digital onde permite a visualização simultânea dos dados dos pacientes bem como prontuários, exames e evolução clínica. Outras informações foram adicionadas por meio de uma entrevista, sendo aplicado um formulário próprio de investigação clínica, epidemiológica e laboratorial dos casos de criptococose. Os pacientes foram questionados sobre informações sociodemográficas (nome da mãe, idade, naturalidade, endereço e profissão), assim como sobre as condições de moradia, sintomas iniciais, histórico médico, relações de trabalho ou atividades de risco que poderiam ter facilitado o desenvolvimento da criptococose e assim tentar avaliar a extensão das possíveis áreas de transmissão, como o próprio ambiente domiciliar ou áreas de lazer e trabalho (Anexo 1).

4.4.2 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS CLÍNICOS

Os isolados clínicos obtidos no período retrospectivo (Julho de 2016 a Setembro de 2018) foram obtidos a partir da liberação por meio do TCUD que permite acesso a amostras

biológicas de pacientes que foram diagnosticados na FMT-HVD em período anterior ao início da pesquisa. A partir de amostras de LCR foi realizada a reativação da cultura em meio Sabouraud para os testes moleculares e sensibilidade antifúngica.

Os isolados clínicos obtidos no período prospectivo (Outubro de 2018 a Julho de 2019) foram inseridos no estudo a partir do diagnóstico com cultura positiva para *Cryptococcus* sp.

4.5 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR POR MLST

4.5.1 EXTRAÇÃO DE DNA

Primeiramente os isolados foram cultivados por 48 horas em ágar Sabouraud líquido, em seguida a biomassa foi transferida para microtubos de 2,0 ml. Posteriormente foram adicionados aos microtubos 500 µl de tampão de lise (contendo SDS a 0,5%, NaCl a 1,4%, EDTA a 0,73% e 20 ml de Tris-HCl para 100 ml de água destilada) e 5 µL de proteinase K sendo então incubados à 65 °C por 1 hora. Foram adicionados 500 µL de Fenol: clorofórmio: álcool-isoamílico (25:24:1), sendo posteriormente realizada a agitação no vórtex para obtenção de uma suspensão homogênea e em seguida a centrifugação a 14000 rpm por 15 min, conforme o protocolo de Ferrer et al. (2001).

O sobrenadante obtido foi transferido para um novo microtubo de 1,5 ml e em seguida foram adicionados 500 µl de isopropanol para precipitação do DNA, homogeneizando levemente as amostras que foram novamente incubadas à -20 °C por 15 minutos. Em seguida, foi realizada a centrifugação a 14000 rpm por 15 min para sedimentar o DNA e retirar toda a fase líquida. Após esta etapa, o precipitado foi lavado com 500 µl de etanol 70% e novamente realizada a centrifugação a 14000 rpm por 15 min para retirar toda a fase líquida. Após a secagem do precipitado, este foi ressuscitado em 100 µl de Tampão Tris-HCl/EDTA.

A concentração de DNA foi verificada por leitura em espectrofotômetro (GeneQuant-pro RNA/DNA Calculator, GE Healthcare) no comprimento de onda de 260 nm (unidade de absorvância de 50 µg/ml) e a razão de pureza determinada pela razão entre as absorvâncias a 260 e 280 nm.

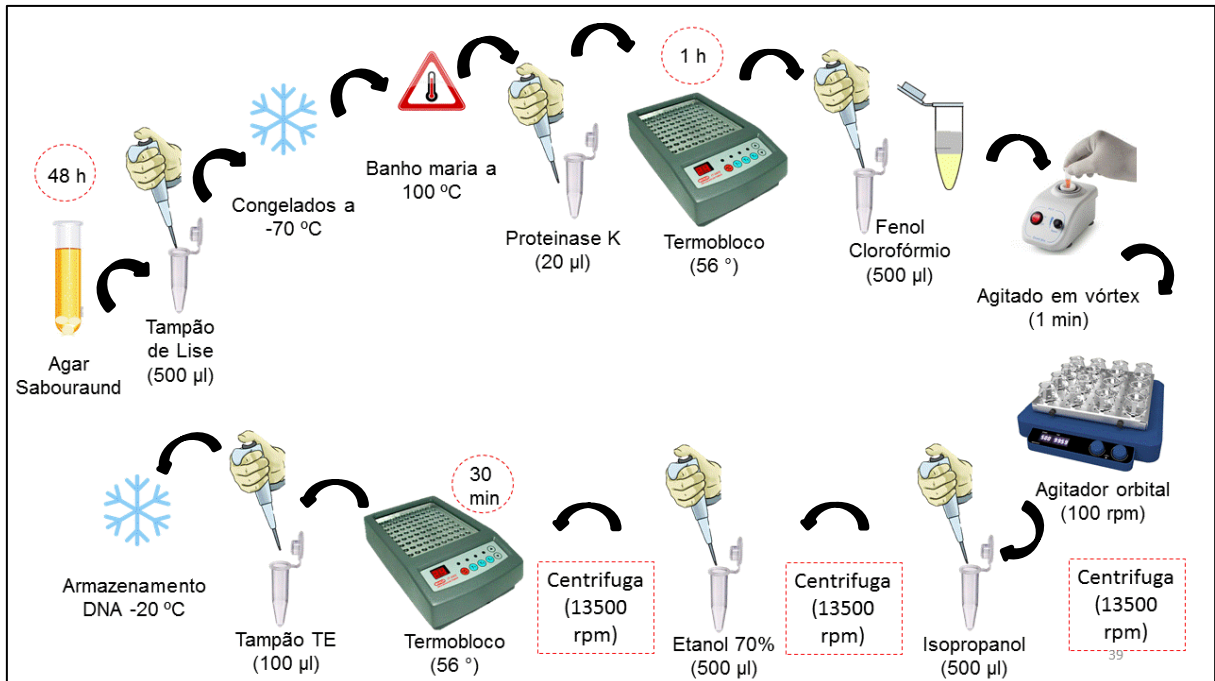


Figura 7. Esquema representando as etapas de extração de DNA conforme a metodologia de (FERRER et al, 2001), modificada.

4.5.2 DETERMINAÇÃO DOS TIPOS MOLECULARES POR PCR-RFLP DO GENE *URA5*

A reação de amplificação foi realizada em um volume final de 40 µl contendo 50 ng de DNA molde, solução tampão 10X (Tris-HCl 10 mM, pH 8,3, KCl 50 mM), 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,4 µM de cada primer (senso: 5' ATGTCCTCCCAAGCCCTCGAC-3'/anti-senso: 5'-TTAAGACCTCTGAACACCGTACTC-3') e 1,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen). A PCR consiste em 5 minutos de desnaturação à 94 °C; 40 ciclos de 45 segundos à 94 °C, 1 min à 63 °C, 2 min à 72 °C e uma extensão final de 10 min à 72 °C. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, por 50 minutos a 100 V (Figura 4). Posteriormente 8 µl dos amplicons foram misturados a 1 µl de tampão da enzima *Hha* I e digeridos duplamente com 0,5 µl da enzima *Sau96I* (10 U/µl) e 0,5 µl de *Hha* I (20 U/µl), sendo em seguida incubados por 3 horas a 37 °C (MEYER et al., 2003). Os genótipos foram atribuídos por comparação com as cepas de referência: WM 148 (sorotipo A, VNI), WM 626 (sorotipo A, VNII), WM 628 (sorotipo AD, VNIII), WM 629 (sorotipo D, VNIV), WM 179 (sorotipo B, VGI), WM 178 (sorotipo B, VGII), WM 161 (sorotipo B, VGIII) e WM 779 (sorotipo C, VGIV).

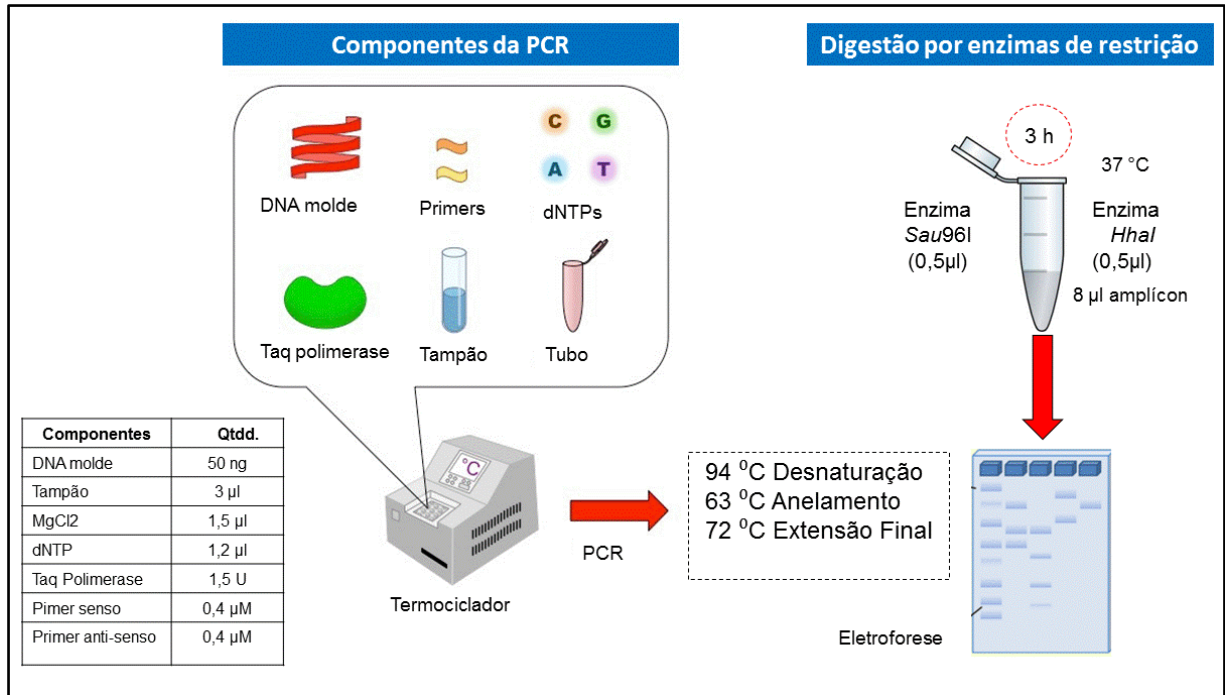


Figura 8. Determinação dos genótipos de *Cryptococcus* sp. por meio PCR RFLP do gene *URA5* (MEYER et al., 2003).

4.5.3 PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DOS LÓCUS PARA O MLST

Para a caracterização genotípica de cada isolado pelo MLST foi realizada inicialmente a amplificação individual dos genes conservados: *CAP59*, *LAC1*, *GPD1*, *SOD1*, *PLB1*, *URA5* e da região IGS1 padronizados pela ISHAM para *C. gattii*. As concentrações dos reagentes utilizados na PCR foram determinadas após modificações no protocolo proposto por Litvintseva et al. (2006). As temperaturas de amplificação da PCR seguiram a padronização da ISHAM (Anexo 5). E os produtos de PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1,5 % por 40 min a 100 V.

4.5.4 PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR

Para a precipitação e remoção de primers e nucleotídeos não incorporados na reação de PCR, os amplicons foram purificados conforme protocolo descrito por Dunn & Blattner (1987) com modificações. Em microtubos de 1,5 ml foram adicionados 32 µl do produto de PCR e

igual volume de Polietilenoglicol (20%, 2.5M de NaCl). As amostras foram homogeneizadas em vórtex e incubadas a 37 °C por 15 minutos com posterior centrifugação a 6000 rpm por 15 minutos para realizar a separação dos componentes precipitados do DNA.

O sobrenadante foi descartado e em seguida foram adicionados 125 µl de etanol 80% gelado, sendo então centrifugado a 4500 rpm por 2 minutos para remoção de oligos e nucleotídeos residuais. O sobrenadante foi descartado e os microtubos foram incubados com as tampas semiabertas por 5 minutos a 60 °C em termobloco (IT-2002, Bioplus) para remoção de resíduos de etanol. Para eluição do DNA foram adicionados 20 µl de água ultrapura MilliQ® e posteriormente as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose a 1,5% por 40 minutos a 100 V para avaliar a qualidade da purificação.

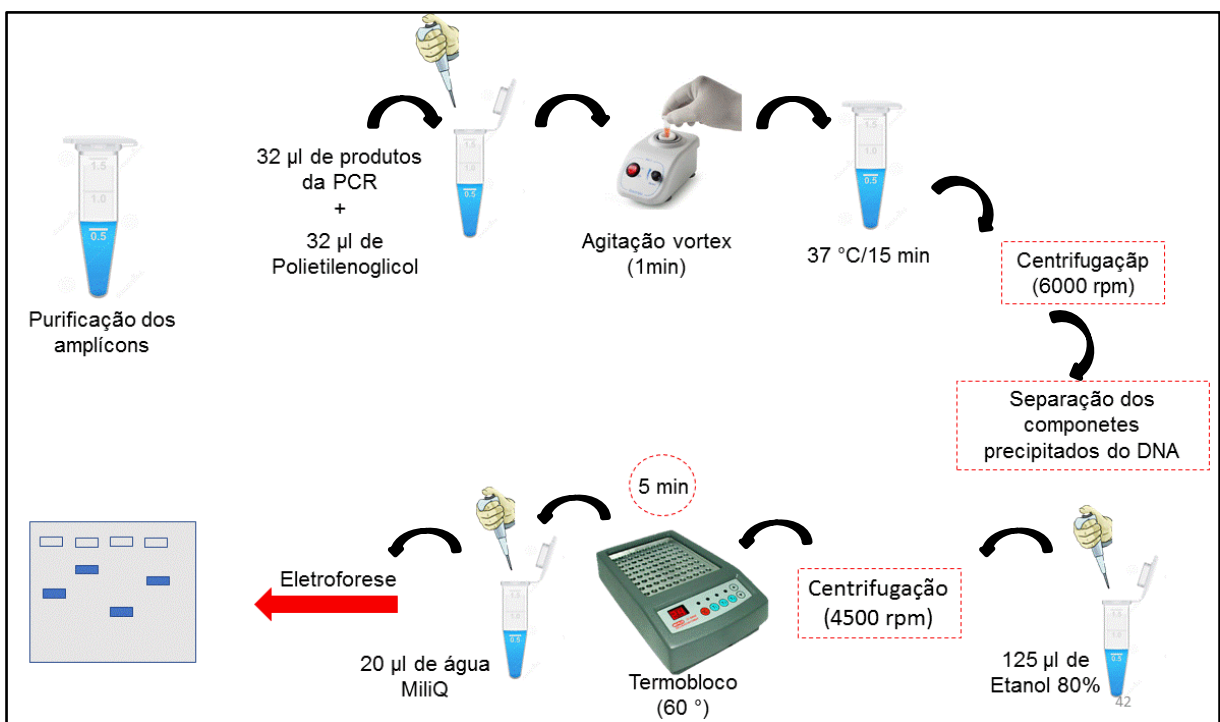


Figura 9. Purificação de DNA amplificado com polietilenoglicol usando a metodologia de (DUN; BLATTNER, 1987).

4.6 ENVIO DAS AMOSTRAS DE DNA E PREPARO PARA SEQUENCIAMENTO

Após a etapa de purificação os produtos de PCR foram enviados para a Fiocruz do Rio de Janeiro. O preparo das reações de sequenciamento de DNA foi realizado no Laboratório de Micologia do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI), na Fiocruz do Rio de Janeiro.

4.7 SEQUENCIAMENTO DE DNA

O sequenciamento foi realizado no Laboratório de Genômica Funcional e Bioinformática – Fiocruz/RJ. Na reação de sequenciamento foi utilizado o Kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems). O DNA foi adicionado na microplaca de 96 poços (Applied Biosystems) com o primer e água MilliQ®, totalizando um volume de 7,5 µl. O volume final de 10 µl da reação de sequenciamento para cada poço foi completado com a adição de 1 µl de *BigDye®* e 1,5 µl de tampão 5X. As microplacas foram colocadas em termociclador ABI3130 v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) com temperaturas de acordo com o protocolo do fabricante.

4.8 DETERMINAÇÃO DO PERFIL ALÉLICO E DOS SUBTIPOS MOLECULARES (SEQUENCES TYPES -STS)

As sequências nucleotídicas foram recebidas por e-mail (em formato abi.) e pelo software Sequencher 5.4.6 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA) foram analisadas e corrigidas para remoção/substituição de gaps ou de bases nitrogenadas incorretas, sendo então gerada uma sequência consenso (contig).

O algoritmo Muscle presente no software MEGA v.10.0.2 foi utilizado para o alinhamento dos contigs com sequências já conhecidas (alelos) oriundas do banco de dados Fungal MLST Database, permitindo então realizar uma segunda revisão das sequências nucleotídicas por comparação visual com os alelos já caracterizados. Utilizando o recurso de alinhamento “Single Locus ID” no site do banco de dados (<http://mlst.mycologylab.org/>), as sequências foram analisadas para identificação do seu número alélico, sendo considerado como aceitável o índice de 100% de similaridade com alelos já conhecidos e depositados.

Todos os contigs e seus respectivos números alélicos identificados foram armazenados em uma planilha Excel. E para determinar o número do ST as sequências dos sete loci foram copiadas e submetidas ao algoritmo de identificação polifásica “Multi Loci ID” online da Fungal MLST Database, sendo aceito como resultado o valor de 100% de similaridade e 100% de overlap. O isolado cujas sequências apresentaram novos alelos também receberá um novo número de ST corresponde a sua ordem de identificação em relação aos já conhecidos.

4.9 ANÁLISE FILOGENÉTICA

Para se obter a relação genética evolutiva foi feito a análise dos STs por meio do programa MEGA v.10.0.2 e para a construção da árvore filogenética foi usado o modelo Neighbor Joining (NJ) com espaço p e com um bootstrap de 1000 repetições (KUMAR et al., 2018).

5. AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA

Os procedimentos foram realizados de acordo com o protocolo M27-A3 recomendado pela Clinical and Laboratory Standards Institute (CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE (CLSI), 2008). As soluções estoque de antifúngicos Anfotericina B (AMB) e Itraconazol (ITC) foram preparadas previamente diluídas em dimetil sulfoxido (DMSO) e a de Fluconazol (FLC) diretamente em meio RPMI 1640. Em seguida as soluções foram diluídas em meio RPMI 1640 líquido (pH= 7,0) tamponado com ácido morfolino propanossulfônico (MOPS). Todas as soluções foram armazenadas a uma temperatura de -20 °C até o momento do uso.

Para a preparação do inóculo fúngico, as cepas foram previamente reativadas e cultivadas em ágar Sabouraud dextrose por 48 horas. Em seguida foi feita a suspensão de células em 5 ml de solução salina estéril (0,85%) e a quantificação das mesmas em câmara de Neubauer. De acordo com a quantidade de células presentes na solução foi calculada uma concentração final de 2×10^3 células/ml e posteriormente o volume correspondente do inóculo inicial foi transferido para um novo tubo contendo 10 ml de meio RPMI 1640.

Para a microdiluição em caldo, 100 µl de meio RPMI 1640 e 100 µl da solução da droga foram transferidos em duplicata para a microplaca de 96 poços com o auxílio da pipeta multicanal, realizando a diluição seriada da droga do segundo até o penúltimo poço. E por fim, foram adicionados 100 µl do inóculo fúngico, delimitando a 1ª e a 12ª coluna de poços da placa para o controle positivo (RPMI + Inóculo) e controle negativo (apenas meio RPMI), respectivamente. A faixa de concentração testada para o FLC será de 0,125 µg/ml a 64 µg/ml e a da AMB e ITC de 0,062 µg/ml a 16 µg/ml.

As microplacas foram incubadas a 35 °C por 72 horas, após este tempo foi realizada a leitura visual da concentração inibitória mínima (CIM), tendo como comparação o crescimento

nos poços do controle positivo. A CIM da ANF foi determinada como a menor concentração capaz de inibir completamente (100%) o crescimento fúngico e para os azólicos a que gerar o uma redução parcial quando comparado ao crescimento nos poços do controle positivo.

6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Foi criado um banco de dados com as informações clínico-epidemiológicas e laboratoriais no software Microsoft Office Excel[®]. As análises estatísticas foram feitas por meio do software R versão 3.3.1 (<https://www.r-project>).

7. RESULTADOS

Os resultados e discussão do presente trabalho estão apresentados em formato de artigo, o qual será submetido a revista *Medical Mycology Cases Reports*.

Artigo**Casos de neurocriptococose por *Cryptococcus gattii* VGII em pacientes não HIV no Estado do Amazonas, Norte do Brasil**

Silviane Bezerra Pinheiro^{1,2}, Lizandra Stephany Fernandes Menescal³, Ana Cláudia Cortez²
Valéria Soares Chagas³, Diego Fernando da Silva Rocha², Ednaira Sullany Souza^{1,2}, Aline
Stephanie Pérez Gómez³, Marla Jalene Alves⁴, Ani Beatriz Jackisch Matsuura⁴, Kátia Santana
Cruz³, Luciana Trilles⁵, João Vicente Braga de Souza².

¹Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas.

²Laboratório de Micologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

³Laboratório de Micologia Médica, Hospital de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado.

⁴Instituto Leônidas Maria Deane, Fiocruz - AM.

⁵Instituto Nacional de Infectologia, Fiocruz - RJ.

RESUMO

A criptococose é uma infecção fúngica causada pelo complexo de espécies *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii*. A maioria dos casos ocorrem em portadores do vírus HIV/AIDS, no entanto, essa infecção também ocorre em pacientes não HIV em uma frequência de 10-30% do total de casos. Trata-se de uma doença de alta morbidade e mortalidade, sendo a sua forma clínica mais severa a neurocriptococose. Esse estudo investigou aspectos clínicos e moleculares de sete casos de pacientes não HIV diagnosticados com criptococose na Fundação de Medicina Tropical (FMT-HVD) no período de Julho de 2016 a Junho de 2019. Como resultados clínicos e epidemiológicos, observamos que a maioria dos dos pacientes eram do sexo feminino (57,14%), faixa etária de 10-53 anos (média de 36,3 anos), a neurocriptococose foi a forma clínica predominante (100 %), o tempo decorrido desde os sintomas até o diagnóstico variou de 15 a 730 dias (média de 172,9 dias) e a mortalidade observada foi de 57,14%. As morbidades prévias a criptococose observadas no presente estudo foram: hipertensão, diabetes mellitus e tuberculose intestinal. Os isolados foram obtidos de amostras de LCR e o diagnóstico foi feito por exame direto em tinta de Nankin. A genotipagem inicial feita pela técnica de PCR-RFLP do gene *URA5* mostrou que todos os isolados clínicos foram da espécie *C. gattii* do tipo molecular VGII. A partir do ensaio de MLST foi possível identificar os sequence typing ST20 (n=4), ST5 (n=3) e ST552 (n=1). Esse é o primeiro estudo a relatar a existência do ST552. As culturas de *C. gattii* demonstraram CIM média para os antifúngicos anfotericina B (AMB), fluconazol (FLC) e itraconazol (ITC) de 0,05, 3,85 e 0,18 ug/mL, respectivamente. Nesse estudo mostramos a importância do uso da ferramenta molecular do MLST para identificar os genótipos que causam as infecções em pacientes não HIV. Descrevemos o predomínio do acometimento no SNC por *C. gattii* principalmente do tipo molecular VGIIa que está amplamente disperso no Norte do Brasil.

Palavras – Chave: Amazônia, *Cryptococcus gattii*, HIV negativo e MLST.

ABSTRACT

Cryptococcosis is a fungal infection caused by the *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* species complex. Most cases occur in people with HIV / AIDS however, this infection also occurs in non-HIV patients at a frequency of 10-30% of all cases. However, this mycose has high morbidity and mortality, and its most severe clinical form is neurocryptococcosis. This study investigated clinical and molecular aspects of seven cases of non-HIV patients diagnosed with cryptococcosis at the Tropical Medicine Foundation (FMT-HVD) from July 2016 to June 2019. As clinical and epidemiological results, we observed that most of the patients were female (57.14%), age range 10-53 years (mean 36.3 years), neurocryptococcosis was the predominant clinical form (100%), the time since symptoms until diagnosis ranged from 15 to 730 days (average of 172.9 days) and observed mortality was 57.14%. In addition, morbidities prior to cryptococcosis observed in the present study were: hypertension, diabetes mellitus and intestinal tuberculosis. Isolates were obtained from CSF samples and the diagnosis was made by direct examination in Nankin ink. Further, initial genotyping by the PCR-RFLP technique of the *URA5* gene showed that all clinical isolates were of the species *C. gattii* and molecular type VGII. From the MLST assay it was possible to identify the sequence typing ST20 (n = 4), ST5 (n = 3) and ST552 (n = 1). This is the first study to report the existence of ST552. Thus, cultures of *C. gattii* showed mean MIC for amphotericin B (AMB), fluconazole (FLC) and itraconazole (ITC) antifungals of 0.05, 3.85 and 0.18 $\mu\text{g} / \text{mL}$, respectively. In this study we show the importance of using the MLST molecular tool to identify the genotypes that cause infections in non-HIV patients. We describe the predominance of CNS involvement by *C. gattii* mainly of molecular type VGIIa, which is widely dispersed in northern Brazil.

Keywords: Amazon, *Cryptococcus gattii*, HIV negative and MLST.

INTRODUÇÃO

A criptococose é doença de ocorrência mundial que teve o aumento significativo de casos na metade da década 1980 estando associada a epidemia da AIDS (MAZIARZ e PERFECT 2016). No ano de 2014, estimou-se a existência de aproximadamente 225.000 casos com 181.100 mortes. A alta mortalidade ocorre em países que tem um acesso precário a cuidados da saúde como principalmente a África e partes da Ásia. Na África Subsaariana a taxa de mortalidade chega a 75% da média global, enquanto nos Estados Unidos, depois do uso dos ART, a taxa atual permanece em 28,8 %. O Brasil e a Colômbia são os países que relatam mais casos de criptococose dentre os países da América Latina, entre 1001 a 2500 casos por ano seguido de Argentina e México com 501 a 1000 casos (GEORGE et al. 2018).

Embora a criptococose ocorra com maior frequência em indivíduos imunossuprimidos, estudos mostram que pacientes HIV negativos exibem maior taxa de mortalidade se comparado aos pacientes HIV positivos (BRATTON et al., 2012; RAJASINGHAM et al., 2017). Os estudos acerca da criptococose em pacientes não HIV tem sido frequentes nos dias de hoje. Esses estudos tem desvendado causas e associações da criptococose nesse grupo de pacientes que por um período de tempo foram esquecidos por apresentarem menor frequência de infecção. Condições comórbidas têm sido associadas a suscetibilidade a criptococose em pacientes não HIV, são elas: insuficiência renal, diabetes, câncer, insuficiência cardíaca, doença pulmonar crônica, doença hepática, malignidade hematológica e doenças autoimunes como sarcoidose. Além disso, o uso de corticosteróides têm sido outro fator agravante. Sendo relatado uma percentagem de 93% de pacientes, diagnosticados com criptococose, estavam em tratamento imunossupressor (BRATTON et al., 2012; BRIZENDINE; BADDLEY; PAPPAS, 2013; HEVEY et al., 2019). Altos níveis do anticorpo anti-GM-CSF que inibe o fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) é um fator de risco para a infecção por *C. gattii* em pacientes não HIV (APPLEN CLANCEY et al., 2019). Saijo et al. (2014) encontraram altos níveis de anticorpos anti-GM-CSF no plasma de pacientes, aparentemente imunocompetentes, infectados por *C. gattii*, mas não encontrou no plasma de pacientes infectados por *C. neoformans*.

Segundo Khell da Silva et al. (2012) cerca de 20 pacientes foram diagnosticados com criptococose no Estado do Amazonas, no período de março de 2006 a fevereiro de 2008, e aproximadamente 20% desses pacientes não possuem HIV. A infecção em pacientes não HIV ocorre predominantemente por *C. gattii* de tipo molecular VGII e a forma clínica predominante

é a neurocriptococose (KHELL DA SILVA et al., 2012; ROCHA et al., 2018). No entanto, estudos específicos para investigar o desfecho da criptococose na minoria dos casos, que são os pacientes não HIV, são necessários para compreendermos quais linhagens de *Cryptococcus* sp. estão causando essas infecções, o prognóstico da criptococose nesse grupo, quais os fatores de risco são relevantes para a manifestação da doença e como ela vai interferir na qualidade de vida dos pacientes.

Neste trabalho iremos relatar a frequência do genótipo de *Cryptococcus* sp. e os STs que causam a criptococose no Estado do Amazonas, além de descrever aspectos clínicos como sintomas, fatores de risco, dados epidemiológicos e investigação de cepas resistentes aos antifúngicos convencionais. Esse é o primeiro estudo voltado somente para pacientes não HIV no estado do Amazonas. O objetivo foi investigar a criptococose nesse grupo e apresentar informações a comunidade médica sobre a importância do diagnóstico precoce que ainda não é realizado nas comunidades ribeirinhas do Estado do Amazonas.

METODOLOGIA

Universo de estudo

Modelo de estudo

Trata-se de um estudo de corte transversal, retrospectivo e prospectivo que foi realizado com o objetivo de descrever aspectos moleculares dos agentes etiológicos e clínico-epidemiológicos dos pacientes não-HIV acometidos por criptococose no período de Julho de 2016 a Junho de 2019 e atendidos Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD).

População de estudo

Esse estudo avaliou, no período de três anos, pacientes não HIV que apresentaram diagnóstico micológico de infecção por leveduras do complexo *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii*. Foram incluídos os pacientes que atenderam os critérios abaixo.

Critérios de Inclusão

a) pacientes que possuíam cultivo positivo para *Cryptococcus* sp.; b) que foram diagnosticados com criptococose por meio de exame direto a partir do líquido cefalorraquidiano

(LCR); c) que aceitaram participar da pesquisa voluntariamente mediante o consentimento do TCLE ou sob autorização do responsável legal mediante a assinatura do Termo de Assentimento para menores; d) que possuíam suas informações clínico-epidemiológicas disponíveis no sistema de prontuários *IDoctor*.

Critérios de Exclusão

Foram excluídos do estudo pacientes:

a) que ao longo da pesquisa foram identificados com portadores do vírus HIV; b) que não apresentaram cultivo positivo para *Cryptococcus* sp.; c) tiveram as culturas inviáveis por contaminação; d) suas culturas não estiveram disponíveis nos acervos do laboratório de Micologia da FMT-HVD; e) pacientes que decidirem abandonar o estudo.

Amostras Clínicas

Os isolados clínicos obtidos no período retrospectivo foram reativados meio Sabouraud para os testes moleculares e de sensibilidade antifúngica. Os isolados clínicos adquiridos no período prospectivo foram obtidos a partir do diagnóstico com cultura positiva para *Cryptococcus* sp. Todos os isolados foram mantidos em tubos de agar Sabouraud dextrose (SDA) e armazenados a 4 ° C no Laboratório de Micologia Médica da FMT-HVD.

Procedimentos

Coleta de Dados Epidemiológicos e Laboratoriais

Os registros clínicos, epidemiológicos e laboratoriais de todos os pacientes foram acessados no banco de dados on-line de registro médico (*IDoctor*). Os dados coletados para análise incluíram idade, sexo, localização geográfica, risco de fatores como doenças subjacentes, sintomas iniciais e sequelas desenvolvidas, resultado clínico necessidade de hospitalização na unidade de terapia intensiva (UTI) devido a complicações, formas clínicas e tempo de internação. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos da FMT-HVD (CAAE 90749718.3.0000.0005).

Genotipagem inicial por PCR-RFLP do gene *URA5*

A extração de DNA foi realizada usando o método fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (Ferrer et al. 2001). A PCR foi conduzida com cada reação contendo 20 ng de molde de DNA, solução tampão (Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM), 0,2 mM de cada dNTP, 30 ng de iniciador *URA-5* (adiante 5 'ATG TCC TCC CAA GCC CTC GAC 3' e 5 'TTA reverso AGA CCT CTG AAC ACC GTA CTC 3') e 2,5 U de polimerase de DNA Taq recombinante (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). A PCR foi realizada em um termociclador Kyratec modelo SC200 (Kyratec Pty Ltd Queensland, Austrália). Os tipos moleculares foram determinados pela análise do RFLP do gene *URA5* com as enzimas Sau96I e HhaI (Thermo Scientific, Waltham, EUA), conforme descrito por ((MEYER et al., 2003)). Os genótipos foram atribuídos por comparação com as respectivas cepas de referência: WM 148 (sorotipo A, VNI), WM 626 (sorotipo A, VNII), WM 628 (sorotipo AD, VNIII), WM 629 (sorotipo D, VNIV), WM 179 (sorotipo B, VGI), WM 178 (sorotipo B, VGII), WM 161 (sorotipo B, VGIII) e WM 779 (sorotipo C, VGIV).

Multi Locus Sequence Typing

A análise do MLST foi realizada pela amplificação individual dos seis genes *CAP59*, *GPD1*, *LAC1*, *PLB1*, *SOD1* e *URA5*, juntamente com a região IGS1, conforme preconizado pela ISHAM (MEYER et al., 2009) . Os produtos de PCR foram purificados com um método modificado usando polietileno-glicol / NaCl (DUN; BLATTNER, 1987)e sequenciados bidirecionalmente em um analisador de DNA ABI3130 com BigDye Terminators v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA) no Laboratório de Genômica Funcional e Bioinformática (Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil). As seqüências foram editadas manualmente usando o software Sequencher 5.4.6 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, EUA), e os contigs foram alinhados usando o algoritmo Muscle vinculado ao programa MEGA v.10.0.2 (KUMAR et al., 2018). Todas as seqüências foram analisadas no banco de dados do complexo MLST para espécies de *C. gattii* (<http://mlst.mycologylab.org>) para determinar o número do alelo e o respectivo ST.

Determinação da CIM frente aos antifúngicos convencionais

Os procedimentos foram realizados de acordo com o protocolo M27-A3 recomendado pela Clinical and Laboratory Standards Institute (CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE (CLSI), 2008). As soluções estoque de antifúngicos Anfotericina B (AMB) e Itraconazol (ITC) foram preparadas de acordo com as normas da CSLI. Para a preparação do inóculo fúngico, as cepas foram previamente reativadas e cultivadas em ágar Sabouraud dextrose por 48 horas. Em seguida foi feita a suspensão de células em 5 ml de solução salina estéril (0,85%) e realizada a quantificação das células. Posteriormente o volume correspondente do inóculo inicial foi transferido para um novo tubo contendo 10 ml de meio RPMI 1640. Para a microdiluição em caldo, 100 µl de meio RPMI 1640 e 100 µl da solução da droga foram transferidos em duplicata para a microplaca de 96 poços realizando a diluição seriada da droga. E por fim, foram adicionados 100 µl do inóculo fúngico, delimitando a 11ª e a 12ª coluna de poços da placa para o controle positivo (RPMI + Inóculo) e controle negativo (apenas meio RPMI), respectivamente. A faixa de concentração testada para o FLC foi de 0,125 µg/ml a 64 µg/ml e a da AMB e ITC de 0,062 µg/ml a 16 µg/ml. As microplacas foram incubadas a 35 °C por 72 horas, após este tempo foi realizada a leitura visual da concentração inibitória mínima (CIM), tendo como comparação o crescimento nos poços do controle positivo.

Análises Estatísticas

Foi criado um banco de dados com as informações clínico-epidemiológicas e laboratoriais no software Microsoft Office Excel®. As análises estatísticas foram feitas por meio do software R versão 3.3.1 (<https://www.r-project>).

Resultados

No período de 2016 a 2019 foram diagnosticados 11 pacientes com criptococose não associada a HIV na FMT-HVD. Do total de 11 amostras, não foi possível reativar quatro prosseguindo o estudo com 7 amostras. A localidade dos sete pacientes foi, em sua maioria, da Cidade de Manaus (3/7) e os demais de outros Municípios como: Manicoré (1/7) Maués (1/7), Parintins (1/7) e São Gabriel da Cachoeira (1/7) (Figura 9).

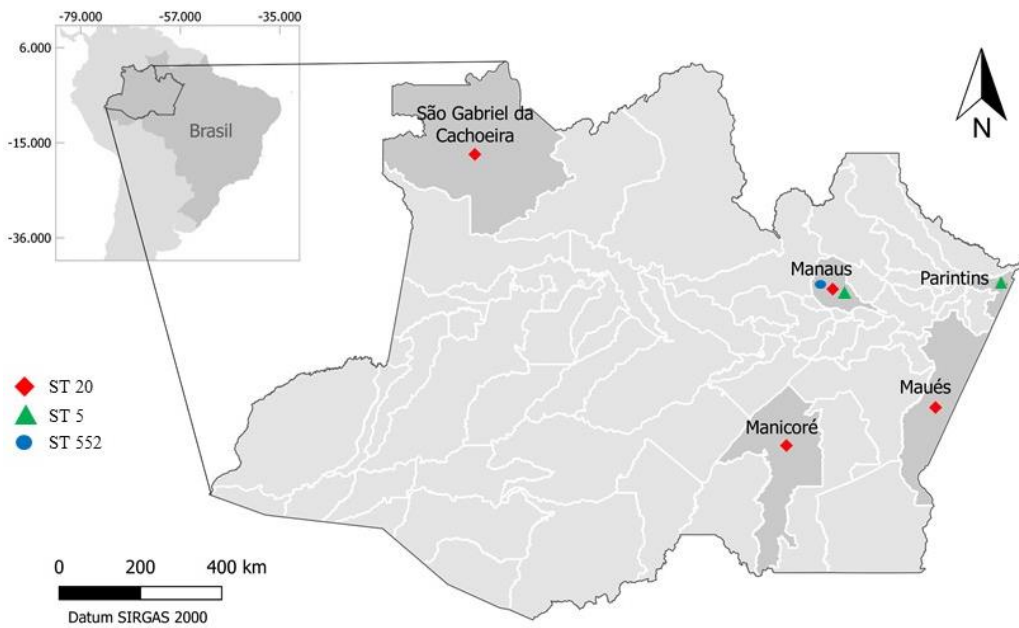


Figura 10. Mapa do Estado do Amazonas mostrando as cidades de origem dos sete pacientes estudados e o ST correspondente (formas coloridas). O programa Quantum GIS versão 2.18 foi utilizado para construir o mapa.

Características Clínicas e Epidemiológicas

Os resultados dos aspectos clínicos e epidemiológicos da criptococose em pacientes não HIV diagnosticados na FMT-HVD mostraram um discreto predomínio do sexo feminino (57,14%), a média das idades foi de 36 anos e com variação de 10-53 anos. Na investigação sobre exposição a fatores de risco ambiental destacaram-se: exposição a fezes de pombos (*Columba livia*) (42,85%), moradia de madeira (28,57%), criação de aves (28,57%), e moradia próxima a madeireira (14,28%). Em relação a ocupações laborais de risco foi observado a construção civil (14,28%) e agricultura (14,28%) (Tabela 3).

Os principais sintomas descritos antes da hospitalização foram: cefaleia intensa (100%), vômito (71,42%), fotofobia (71,42%), rigidez da nuca (42,85%) e perda ponderal (57,14%). O tempo de apresentação dos sintomas a confirmação do diagnóstico da criptococose variou de 15 – 730 dias. Os sintomas mais frequentes apresentados durante a hospitalização e tratamento dos pacientes foram: constipação intestinal (57,14%), convulsão (57,14%), rebaixamento do nível de consciência (57,14%) e delirium (42,85%).

Quatro pacientes apresentavam comorbidades, mas em alguns casos ou não eram tratadas ou os pacientes desconheciam que eram portadores, sendo elas: diabetes mellitus, hipertensão arterial, e tuberculose extrapulmonar (Tabela 3). Os demais pacientes não

apresentavam, simultaneamente, outras doenças, mas tinham históricos médicos de tuberculose pericárdica, malária e depressão.

O diagnóstico foi feito exclusivamente a partir de amostras de LCR onde foi verificado a presença de leveduras encapsuladas no exame direto com fundo de tinta de Nankin. Após o crescimento da cultura em meio agar Sabouraud. A forma clínica, predominante, apresentada pelos pacientes foi a neurocriptococose. O tratamento foi realizado com os antifúngicos AMB (50 mg) e FLC (400 mg). Somente um paciente recebeu anfotericina lipossomal (LAmB), devido ao desenvolvimento de insuficiência renal aguda (IRA).

Devido a gravidade da doença e o rebaixamento do nível de consciência, houve necessidade da internação de quatro pacientes na unidade de terapia intensiva (UTI). As sequelas desenvolvidas devido a infecção cerebral pelo *C. gattii* foram em sua maioria relacionadas ao nervo óptico (57,14%), com quadros de diminuição da acuidade visual e casos de amaurose unilateral e bilateral. Além disso, os pacientes também desenvolveram diminuição da acuidade auditiva (28,57%), coroidite ocular (14,28%), edema cerebral (14,28%) entre outros (Tabela 3). Dos sete pacientes estudados, quatro vieram a óbito, sendo que dois foram admitidos no hospital apresentando sequelas neurológicas devido ao período de tempo desde os sintomas iniciais até a obtenção do diagnóstico. O tempo de internação variou de 13-100 dias (Tabela 3).

PCR-RFLP do gene *URA5* e MLST de *C. gattii*

A partir da extração de DNA foi realizado a PCR-RFLP, a qual mostrou, por meio da leitura em gel de eletroforese, que todos os isolados pertencem a espécie *Cryptococcus gattii* de genótipo VGII. A partir do sequenciamento e edição dos *contigs* dos sete genes de virulência *CAP59*, *GPD1*, *IGS1*, *LAC1*, *PLB1*, *SODCG* e *URA5* foi possível verificar, através da comparação dos alelos depositados no Fungal MLST Data Base, os números dos alelos de cada gene. Em seguida, na plataforma *searching*, foi revelado o ST por meio da compilação numérica dos alelos dos sete genes (Tabela 5). Sendo assim, nesse estudo os STs responsáveis pelas infecções em pacientes não HIV foram: o ST20 ocorrendo em Manaus, Maués, Manicoré e São Gabriel da Cachoeira; o ST5 presente em Parintins e Manaus; e um novo ST presente na Cidade de Manaus, o ST552 (Figura 9), (Tabela 4).

Tabela 3. Aspectos clínicos e epidemiológicos da criptococose em pacientes não HIV diagnosticados na FMT-HVD.

	Pacientes						
	1	2	3	4	5	6	7
Sexo	M	F	F	M	F	F	M
Idade	50	23	41	25	52	10	53
Sintomas Iniciais antes do diagnóstico	Cefaleia, febre, vômito, dor ocular, astenia, fotofobia, perda ponderal	Cefaleia, fotofobia, náusea, vômito, diplopia, irritabilidade	Cefaleia, rigidez da nuca, vômito, fotofobia, sudorese noturna, paralisia facial D e perda ponderal	Cefaleia, rigidez da nuca, febre, convulsão, fotofobia e perda ponderal	Cefaleia, convulsão, fotofobia, dor ocular, rigidez da nuca, letargia	Cefaleia, febre, vômito, hiporexia, perda ponderal, astenia	Cefaleia, febre, vômito, hiporexia, astenia e perda ponderal
Sintomas apresentados durante o tratamento	Constipação intestinal, rebaixamento da consciência, picos de HAS e perda ponderal	Paresia MI, convulsão e rebaixamento da consciência	Constipação intestinal, convulsão, anemia, delirium, astenia e perda ponderal	Rebaixamento da consciência, paresia MIS, disfagia, anemia, disartria, febre, neuropatia periférica	Constipação intestinal, rebaixamento da consciência, paralisia da língua e convulsão	Constipação intestinal, convulsão, delirium e estrabismo	Rebaixamento da consciência, AVC, delirium e perda ponderal
Duração dos sintomas antes do diagnóstico (dias)	180	150	30	15	730	90	15
Fatores Ambientais	Exposição a fezes pombos	Casa de madeira e criação de aves	Exposição a fezes de pombos	Exposição a fezes de pombos	-	Casa de madeira e criação de aves	-
Ocupações	Construção civil	Dona de casa	Professora	Agricultor, Auxiliar de limpeza	Dona de casa	Estudante	Gerente comercial

Doenças anteriores	Depressão, Tuberculose pericárdica	-	Tuberculose ganglionar	Malária (5 vezes)	-	-	-
Comorbidades	-	HAS	Tuberculose intestinal	-	DM, HAS	-	DM, HAS
LCR nível de Proteínas (mg/dL)	25,0	109,0	59,0	52,0	22,1	29,0	26,7
LCR nível de Glicose (mg/dL)	47,0	3,0	59,0	44,0	102,0	61,0	46,0
Forma clínica	NCPT	NCPT	NCPT	NCPT	NCPT	NCPT	NCPT
Tratamento	AmB + FLU	AmB + FLU	LAmB-L+ FLU	AmB + FLU	AmB + FLU	AmB + FLU	AmB + FLU
Tempo de internação na UTI (dias)	4	5	-	26	-	-	5
Sequelas	IRA, coroidite ocular (D)	Amaurose bilateral	Diminuição da acuidade visual e auditiva	Paralisia facial (D), alteração VII par de nervo craniano, disartria e disfunção motora	Diminuição da acuidade visual. disfagia	Amaurose D, diminuição da acuidade auditiva	Edema cerebral, vasculite cerebral
Tempo de hospitalização (dias)	18	20	57	100	13	85	15
Resultados Clínicos	Óbito	Óbito	Recuperado	Recuperado	Óbito	Recuperado	Óbito
Microrganismo isolado	<i>C. gattii</i> (VGII/ST20)	<i>C. gattii</i> (VGII/ST5)	<i>C. gattii</i> (VGII/ST5)	<i>C. gattii</i> (VGII/20)	<i>C. gattii</i> (VGII/ST20)	<i>C. gattii</i> (VGII/ST20)	<i>C. gattii</i> (VGII/ST552)

*HAS Hipertensão arterial; DM Diabetes Mellitus; NCPT Neurocriptococose; MIS Membro inferior e superior; AVC Acidente vascular cerebral; IRA Insuficiência renal aguda; (-) Não relatado.

Foi construída uma árvore monofilética para verificar a relação de ancestralidade dos sete isolados com cepas de *C. gattii* descritas na Região Norte do Brasil. Observou-se a relação de parentesco e compartilhamento de ancestral entre o ST552 e o ST27 descrito no Estado de Roraima (Figura 10).

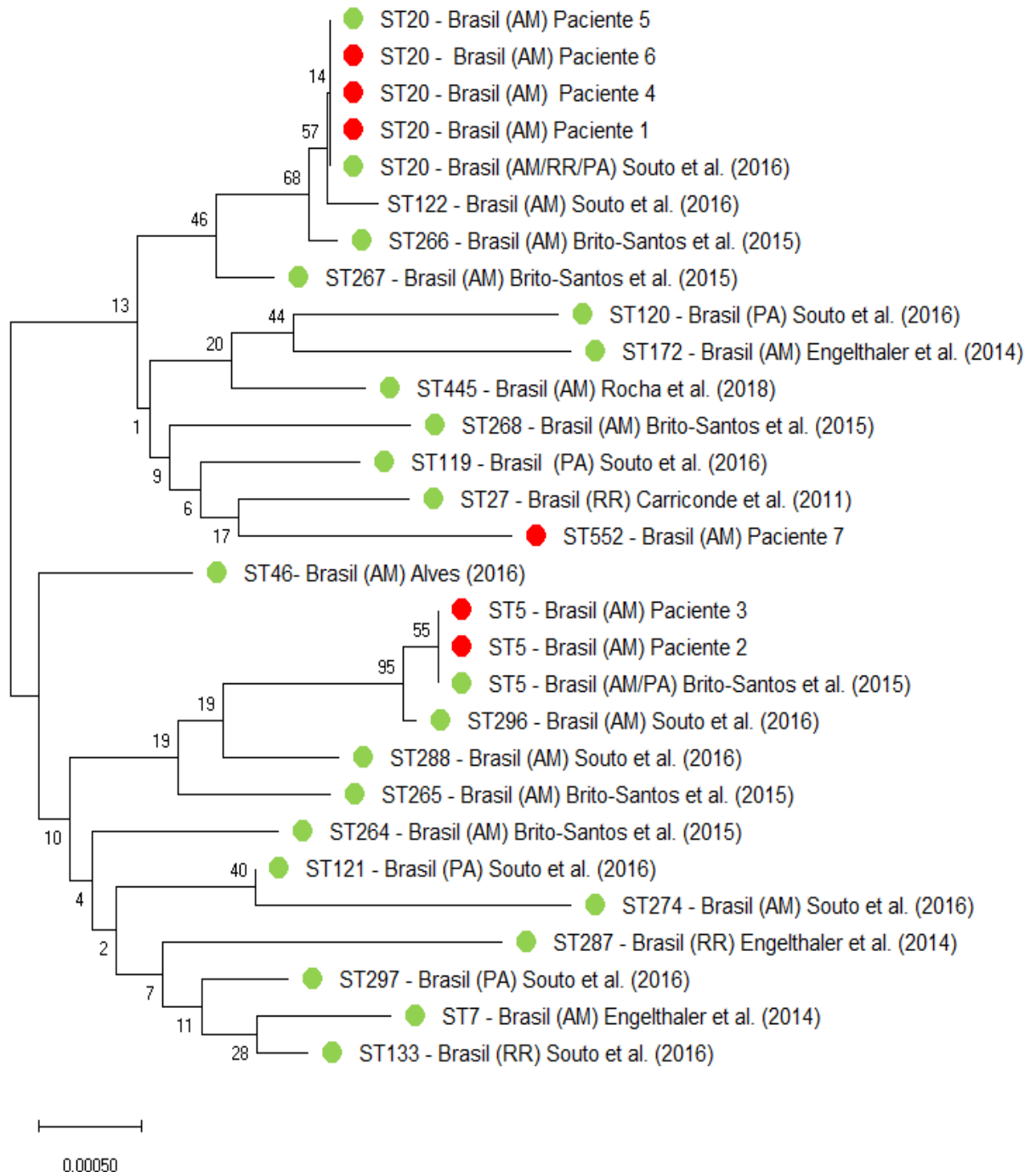


Figura 11. Árvore filogenética Neighbour-Joining (NJ), modelo *p-distance* com boodstrap de 1.000, construída usando o software Mega versão v.10.0.2 , a partir do alinhamento da compilação dos sete loci do MLST (*CAP59*, *GPD1*, *IGS1*, *LAC1*, *PLB1*, *SODCG* e *URA5*) e das cepas isoladas na Região Norte. .Podemos observar a relação genética entre os sete isolados clínicos do estudo (cor vermelha) com isolados de *C. gattii* da Região Norte do Brasil (cor verde) obtidos do Fungal MLST Database <http://mlst.mycologylab.org>. Abreviações: AM (Amazonas), RR (Roraima) e PA (Pará).

Tabela 4. Tipo Molecular dos isolados de *C. gattii* e a sequência numérica dos alelos dos genes no MSLT e o respectivo Sequence Typing.

Isolado	Genótipo	Genes do MLST							
		CAP59	GPD1	IGS1	LAC1	PBL1	SODCG	URA5	ST
P1FMT-66	VGII	1	1	4	4	1	14	7	20
P2FMT-103	VGII	3	16	15	4	9	23	2	5
P3FMT-111	VGII	3	16	15	4	9	23	2	5
P4FMT-215	VGII	1	1	4	4	1	14	7	20
P5FMT-339	VGII	1	1	4	4	1	14	7	20
P6FMT-346	VGII	1	1	4	4	1	14	7	20
P7FMT-829	VGII	2	6	27	4	1	104	2	552

*P- Paciente; FMT – Fundação de Medicina Tropical

Sensibilidade aos Antifúngicos Convencionais

Os testes de sensibilidade dos sete isolados frente a AMB, FLU e ITC apresentaram CIM satisfatória mostrando que todos os isolados de *C. gattii* foram sensíveis aos antifúngicos convencionais utilizados no tratamento da criptococose. A CIM para AMB e ITC foram baixas com valor < 1 µg/mL e FLU apresentou maior valor de CIM com 8 µg/mL, nenhum isolado apresentou resistência aos antifúngicos como pode ser observado na Tabela 5.

Tabela 5. Teste de sensibilidade antifúngica e a concentração inibitória mínima dos sete isolados de *C. gattii*. (P) paciente.

Antifúngico	Isolados de <i>Cryptococcus gattii</i>						
	P1FMT-66	P2FMT-103	P3FMT-111	P4FMT-215	P5FMT-339	P6FMT-346	P7FMT-829
	CIM ₅₀ (µg/mL)	CIM ₅₀ (µg/mL)	CIM ₅₀ (µg/mL)	CIM ₅₀ (µg/mL)	CIM ₅₀ (µg/mL)	CIM ₅₀ (µg/mL)	CIM ₅₀ (µg/mL)
AMB	0,03	0,03	0,03	0,25	0,03	< 0,03	0,03
FLC	4	8	4	2	4	4	1
ITC	0,12	0,12	0,62	0,12	0,12	0,12	< 0,03

*P- Paciente; FMT - Fundação de Medicina Tropical

Entre os sete casos de criptococose em paciente não HIV abordados nesse estudo é importante a descrição do caso 3 porque apresenta uma co-infecção por *Micobacterium* sp. que foi diagnosticada simultaneamente quando a paciente estava em tratamento para a criptococose. Portanto, esse caso será descrito a seguir:

Relato de caso

Uma mulher de 41 anos, diagnosticada dois anos antes com tuberculose ganglionar, professora de escola pública apresentou sintomas que começaram com uma forte dor de cabeça, febre, rigidez de nuca, vômito e fraqueza. Inicialmente, ela descreveu uma forte dor de cabeça constante e com delírios. Na escola onde trabalha há presença de pombos e fezes nas paredes da instituição. Devido a piora dos sintomas, a paciente foi a pronto-socorro de diferentes hospitais da cidade de Manaus, sendo inicialmente diagnosticada com gripe e recebeu somente medicamento endovenoso para aliviar a dor de cabeça. No entanto, a dor de cabeça continuou com frequência. Dois meses após o início da dor de cabeça contínua, ela foi para o pronto-socorro inconsciente e fraca. Após ser diagnosticada com criptococose foi transferida para o hospital de referência em tratamento de criptococose (Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado). O teste de anticorpos do HIV e antígeno do HIV foi negativo, confirmando o status de HIV negativo do paciente. O antígeno de *Cryptococcus* sérico (CRAG) foi positivo no líquido cefalorraquidiano (LCR). Os outros parâmetros do LCR foram os seguintes: nível de glicose de 59,0 mg / dl, nível proteico de 59,0 mg / dl, citometria 67 cel / mm³ e observação com fundo de tinta Nankin mostrou frequentes leveduras de *Cryptococcus* sp. em processo de brotamento. Após 48 horas, o esfregaço no meio de cultura Heart Brain Infusion (BHI) e no meio Saboraund apresentou crescimento de cultura. Ela iniciou a anfotericina B lipossomal por causa da disfunção renal e manteve fluconazol por via intravenosa, já que a flucitosina não está disponível em nosso país. Durante a internação, desenvolveu anemia progressiva aguda (Hb: 5,91 / Ht: 17,17), dor ocular, perda de peso (12 kg), constipação, icterícia, cefaleia crônica e episódios de convulsão. As imagens neurológicas mostraram múltiplas lesões de cistos criptocócicos na região núcleo-capsular (Figura 6). A radiografia e a amostra de escarro foram negativas. Porém, as fezes foram positivas para *Mycobacterium* sp. Após essa evidência a paciente foi diagnosticada com tuberculose intestinal, iniciou a terapia com a combinação de rifampicina (150 mg por dia), isoniazida (75 mg por dia), pirazinamida (400 mg por dia) e etambutol (275 mg por dia). Após 57 dias de internação,

recebeu alta hospitalar. Após um ano seguindo o tratamento com fluconazol, a paciente encontra-se recuperada e retornou as suas atividades laborais.

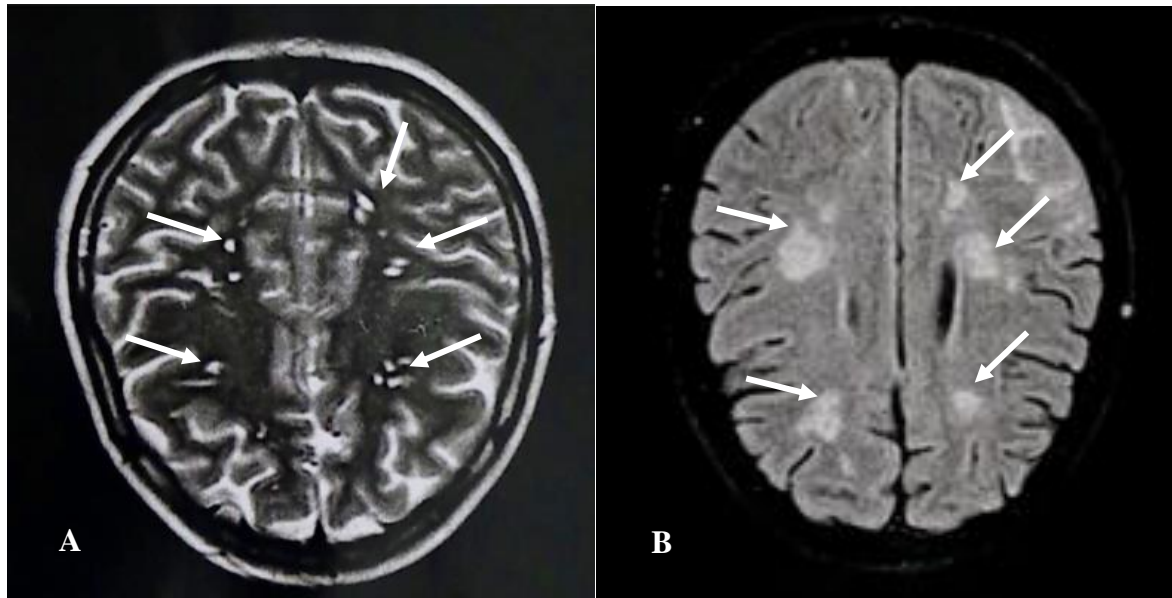


Figura 12. Imagem de ressonância magnética do crânio do paciente 3. A) Técnica turbo-spin-eco (TSE) ponderada em T2 no plano axial com contraste paramagnético mostrando múltiplas lesões na região núcleo – capsular com aspecto de possíveis pseudo-cistos gelatinosos relacionados à criptococose, um mês com tratamento antifúngico. B) Imagem com a técnica turbo-spin-eco em T2 no plano axial mostrando presença de sinal de alteração da substância branca subcortical dos hemisférios cerebrais e cerebelares mais evidentes nas regiões parieto-occipitais. Sinais de quebra da barreira hematoencefálica, processo inflamatório decorrente da meningoencefalite, sete meses após o tratamento.

8. DISCUSSÃO

Esse é o primeiro estudo que apresenta descrição clínica e epidemiológica em pacientes não HIV diagnosticados com neurocriptococose na Região Norte do Brasil. Todos os pacientes foram infectados exclusivamente pela espécie *C. gattii* de genótipo VGII, responsável por manifestação neurológica clínica severa e alta taxa de mortalidade. Na Região Norte do Brasil, *C. gattii* causa criptococose principalmente em pacientes não HIV (DOS SANTOS et al., 2008; KHELL DA SILVA et al., 2012). Os fatores região geográfica e condições do hospedeiro são variáveis significativas para a infecção. Como as linhagens de VGII são consideradas endêmicas nas Regiões Norte e Nordeste do Brasil o risco relativo de hospedeiros não HIV serem infectados por linhagens VGII é dez vezes maior que por qualquer outro genótipo (TRILLES et al., 2008).

No presente estudo houve predomínio de infecções em pacientes do sexo feminino com média de idade de 36 anos que variou de 10-53 anos. George et al., (2018) observaram uma média de 58 anos com variação de 18-98 anos em pacientes NTNH nos EUA. Spec et al., (2016) relataram maior frequência em pacientes do sexo masculino com 66% dos casos. Estudos mostram que pacientes não HIV que desenvolvem a criptococose são significativamente mais velhos quando comparados a pacientes HIV positivos (BRATTON et al., 2012; BRIZENDINE; BADDLEY; PAPPAS, 2013; SPEC; RAVAL; POWDERLY, 2016).

Todos os pacientes não HIV desse estudo (100%) desenvolveram a neurocriptococose como observado igualmente por Rocha et al., (2018). O que pode estar relacionado à virulência do tipo molecular VGII ou por diagnóstico tardio. Ao contrário do cenário em países desenvolvidos, como exemplo EUA, observa-se que de um total de 300 pacientes não HIV diagnosticados com criptococose 50% têm envolvimento no SNC. Mundialmente, casos de meningite causada por *C. gattii* são frequentes na Austrália, América do Sul e no Pacífico Noroeste da América do Norte (WILLIAMSON et al., 2016). Outro achado importante foi a descrição das sequelas que em sua maioria estava relacionada ao comprometimento óptico e auditivo. Estudos revelam que as sequelas neurológicas são mais proeminentes em pacientes não HIV podendo causar prejuízo na cognição em até 78% dos casos (SPEC et al., 2016). A mortalidade observada no presente trabalho foi de 57,14 % (4/7), percentagem maior que a relatada por Aye et al., (2016) que verificou taxa de mortalidade de 45% (10/22), George et al., (2018) de 20,7% (304/1470) e Hevey et al., (2019) de 41,1% (65/108). Essa alta taxa de mortalidade pode estar relacionada com a diagnóstico tardio como afirma um estudo realizado na Universidade do Alabama, o qual verificou que o tempo prolongado para o diagnóstico possivelmente é responsável pela alta mortalidade em até 90 dias (BRATTON et al., 2012; BRIZENDINE; BADDLEY; PAPPAS, 2013). E os pacientes desse estudo vieram a óbito em até 20 dias.

As comorbidades estão relacionadas com a aquisição de criptococose em pacientes não HIV. Nesse estudo os pacientes tinham diagnóstico de hipertensão arterial (n=2), diabetes mellitus (n=2) e tuberculose (n=1). Diabetes mellitus (DM) é considerado um fator de risco para a criptococose (BEARDSLEY; SORRELL; CHEN, 2019). A hiperglicemia em pacientes pode ocasionar o declínio das células mediadoras do sistema imune que pode explicar a associação entre a criptococose e a DM (LIN et al., 2016). A hipertensão arterial pode levar ao AVC como mostra a ocorrência no paciente 7 (Tabela 3). O infarto cerebral em pacientes com neurocriptococose está associada a mortalidade de 100% o que pode levar a hidrocefalia em

71% dos casos (LAN, 2001). Casos de coinfeção de criptococose e tuberculose são comuns em lugares onde a tuberculose é endêmica. De acordo com a secretaria de vigilância sanitária em 2017 foi observado um total de 69.569 novo casos de tuberculose no Brasil. A taxa de incidência de tuberculose no Amazonas é alta, com 74,1 por 100.000 habitantes. Existem evidências que ambas possuem atividade imunomodulatória no hospedeiro, ou seja uma é porta de entrada para outra, pois atuam na desregulação do sistema imune de defesa (VAN TONGEREN; SHAI PANICH; FLEETHAM, 2011).

O caso 3 nos mostra que a paciente tivera tuberculose ganglionar dois anos atrás e a criptococose possivelmente colaborou para a reativação da tuberculose. O *Cryptococcus* sp. produz a melanina e o polissacarídeo da cápsula (GXM) que causam a supressão das células mediadoras do sistema imune por inativação das células T, impedindo a migração dos linfócitos T e ocasionando apoptose dos macrófagos. Todos esses mecanismos predisõem os pacientes a reativação ou infecção da tuberculose (HUFFNAGLE et al., 1995; DECOTE-RICARDO et al., 2019; TAJIMA et al., 2019).

Nesse estudo pudemos observar infecções exclusivas por *C. gattii* de tipo molecular VGII. Recentemente foi constatado que o VGII possui distribuição mundial e dentre todos os genótipos isolados ele é o predominante (CHEN; MEYER; SORRELL, 2014). Além disso, infecções por *C. gattii* são mais comuns em hospedeiros não HIV na Austrália e América do Sul (PHILLIPS et al., 2015). A maioria dos isolados do presente estudo foram do ST20 (VGIIa), seguido do ST5 e o novo ST552. As cepas de VGIIa possuem uma alta virulência, se reproduzem rapidamente na temperatura de 37° C e produzem mais melanina que os outros tipos moleculares (NGAMSKULRUNGROJ et al., 2011). Os clados do ST20 (VGIIa) foram responsáveis pelo surto em Vancouver no Canadá desde 1999 e provavelmente têm um ancestral comum recente sugestionando que esse subtipo tem origem na América do Sul (ENGELTHALER et al., 2014; KIDD et al., 2004). Há descrições de ocorrência de ST5 no Amazonas isolado de poeira domiciliar, principalmente em casas de madeira (BRITO-SANTOS et al., 2015).

Os testes de suscetibilidade antifúngica revelaram que a CIM de AMB e ITC frente aos sete isolados clínicos foram baixas variando de < 0,62-0,25 µg/mL e < 0,62-0,12 respectivamente. Resistência a esses antifúngicos são incomuns, mas há relatados referente a cepa clínica de *C. gattii* VGII que apresentou CIM de 2 µg/mL para AMB (TRILLES et al., 2012). Todos os isolados foram sensíveis ao FLC, com CIM que variou de 1-8 µg/mL. Lee et al., (2019) também descreveram a suscetibilidade de cepas clínicas de VNI, VNII, VGI e VGII

que não mostraram altas concentrações de CIM em teste de microdiluição. Nesse estudo as cepas do genótipo VGII apresentaram a variação da CIM para AMB (0,5-0,5 µg/mL), FLC (2-4 µg/mL) e para ITC (0,015-0,03 µg/mL). No entanto, é descrito CIM maiores para o genótipo VGII frente a FLC que variam de 2-64 µg/mL (CHOWDHARY et al., 2011; TRILLES et al., 2012b; ROCHA et al., 2018). No presente estudo nenhum dos sete paciente apresentaram criptococose recidiva, situação em que ocorre resistência aos antifúngicos (BONGOMIN et al., 2018).

9. CONCLUSÃO

Nesse estudo mostramos a importância do uso da ferramenta molecular do MLST para identificar os genótipos que causam as infecções em pacientes não HIV. Descrevemos o predomínio do acometimento no SNC por *C. gattii* principalmente do tipo molecular VGIIa que está amplamente disperso no Norte do Brasil e foi o genótipo causador do surto no Canadá (KIDD et al., 2004). Foi observado a variedade genética de *C. gattii* no Amazonas, sendo descrito um novo ST denominado ST552. No entanto, as infecções por *C. gattii* apresentam complicações neurológicas, por vezes irreversíveis como por exemplo a perda da visão. Nesse estudo todas as drogas convencionais tiveram atividade *in vitro* contra os isolados de *C. gattii* mas, em alguns pacientes ocorreu o desenvolvimento de pré IRA devido a toxicidade da AMB.

Além disso, a criptococose em pacientes não HIV causa alta taxa de mortalidade que pode estar associada ao atraso no diagnóstico ou má interpretação dos sintomas. Sendo assim, mais estudos precisam ser feitos para avaliar a associação entre a gravidade da doença e a linhagem que causa a infecção e estudos para determinar possíveis predisposições genéticas que atuam na supressão das células de defesa em pacientes não HIV.

10. BIBLIOGRAFIA

- ADERMAN, C. M. et al. Cryptococcal choroiditis in advanced AIDS with clinicopathologic correlation. **American Journal of Ophthalmology Case Reports**, v. 10, n. January, p. 51–54, 2018.
- ALDEMIR KOCABAŞ, B. et al. Disseminated Cryptococcosis with Severe Increased Intracranial Pressure Complicated with Cranial Nerve Palsy in a Child. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 37, n. 4, p. 373–375, 2018.
- ALDHALEEI, W. A.; BHAGAVATHULA, A. S.; ALHAJERI, A. Vision loss in an AIDS patient with cryptococcal meningitis. **Medical Mycology Case Reports**, v. 24, n. February, p. 51–53, 2019.
- ALEXANDER, B. D.; PFALLER, M. A. Contemporary Tools for the Diagnosis and Management of Invasive Mycoses. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, n.1, p. 15-27, 2006.
- ALVES, G. S. B. et al. Molecular typing of environmental *Cryptococcus neoformans*/*C. gattii* species complex isolates from Manaus, Amazonas, Brazil. **Mycoses**, v. 59, n. 8, p. 509–515, 2016.
- ALVES, G. S. B. Genotipagem De *Cryptococcus neoformans* E *C. gattii* Isolados De Poeira Domiciliar E Avaliação Da Susceptibilidade a antifúngicos E Da Presença Do Aantígeno Em Moradores De Uma Comunidade Rural Do Amazonas. [Dissertação] **Universidade Federal do Amazonas**, p. 1–71, 2016.
- APPLEN CLANCEY, S. et al. *Cryptococcus deuterogattii* vgiia infection associated with travel to the pacific northwest outbreak region in an anti- granulocyte-macrophage colony-stimulating factor autoantibody-positive patient in the united states. **mBio**, v. 10, n. 1, p. 1–14, 2019.
- ARAÚJO, B. S. et al. Intra-abdominal Cryptococcosis by *Cryptococcus gattii*: Case Report and Review. **Mycopathologia**, v. 174, n. 1, p. 81–85, 2012.
- AYE, C. et al. Cryptococcosis—the impact of delay to diagnosis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 7, p. 632–635, 2016.
- BAUER, M. et al. Case report: A fatal case of cryptococcosis in an immunocompetent patient due to *Cryptococcus deuterogattii* (AFLP6/VGII). **JMM Case Reports**, v. 5, n. 10, 2018.
- BEARDSLEY, J.; SORRELL, T. C.; CHEN, S. C.-A. Central Nervous System Cryptococcal Infections in Non-HIV Infected Patients. **Journal of Fungi**, v. 5, n. 3, p. 71, 2019.
- BECERRA-PEDRAZA, L. C. et al. Paciente inmunocompetente con criptococosis cerebral: reporte de un caso. **Gaceta medica de Mexico**, v. 153, n. 7, p. 911–914, 2017.
- BOEKHOUT, T. et al. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology**, 2001.
- BONGOMIN, F. et al. A systematic review of fluconazole resistance in clinical isolates of *Cryptococcus* species. **Mycoses**, v. 61, n. 5, p. 290–297, 2018.
- BRAJTBURG, J. et al. Amphotericin B: Current understanding of mechanisms of actionAntimicrobial. **Agents and Chemotherapy**, v. 34, n. 2, p. 183-188, 1990.
- BRANDT, M. E. et al. Molecular subtype distribution of *Cryptococcus neoformans* in four areas of the United States. Cryptococcal Disease Active Surveillance Group. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 4, p. 912–917, 1996.
- BRATTON, E. W. et al. Comparison and temporal trends of three groups with cryptococcosis: HIV-infected, solid organ transplant, and hiv-negative/non-transplant. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, 2012.
- BRITO-SANTOS, F. et al. Environmental isolation of *cryptococcus gattii* VGII from indoor dust from typical wooden houses in the deep Amazonas of the rio Negro basin. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, 2015.
- BRIZENDINE, K. D.; BADDLEY, J. W.; PAPPAS, P. G. Predictors of Mortality and Differences in Clinical Features among Patients with Cryptococcosis According to Immune Status. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, 2013.

- BROWNE, S. K. et al. Adult-onset immunodeficiency in Thailand and Taiwan. **New England Journal of Medicine**, v. 367, n. 8, p. 725–734, 2012.
- BUSSE O. Uber parasitare Zelleinschlusse und ihre Zuchtung [About parasitic cell enclosures and their generation]. **Z Bacteriol**, v. 16, p. 175–180, 1905.
- CHEN, S. C. et al. Identification by random amplification of polymorphic DNA of a common molecular type of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in patients with AIDS or other immunosuppressive conditions. **The Journal of infectious diseases**, 1996.
- CHEN, S. C. A.; MEYER, W.; SORRELL, T. C. *Cryptococcus gattii* infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 4, p. 980–1024, 2014.
- CHOWDHARY, A. et al. In vitro antifungal susceptibility profiles and genotypes of 308 clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii* serotype B from north-western India. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, p. 961–967, 2011.
- CHRÉTIEN, F. et al. Pathogenesis of Cerebral *Cryptococcus neoformans* Infection after Fungemia . **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 4, p. 522–530, 2002.
- CLATWORTHY, M. R.; SMITH, K. G. C. FcγRIIb Balances Efficient Pathogen Clearance and the Cytokine-mediated Consequences of Sepsis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 199, n. 5, p. 717–723, 2004.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE (CLSI). **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts -Third Edition. CLSI document M27-A3.** [s.l: s.n.].
- COGLIATI, M. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types. **Scientifica**, v. 2013, p. 23, 2013.
- COHEN, D. B.; GLASGOW, B. J. Bilateral Optic Nerve Cryptococcosis in Sudden Blindness in Patients with Acquired Immune Deficiency Syndrome. **Ophthalmology**, v. 100, n. 11, p. 1689–1694, 1993.
- CONTRERAS, M. E. M. Lateral Flow Assay: A World of Possibilities for the Diagnostic. v. 3, n. 1, p. 4, 2019.
- DECOTE-RICARDO, D. et al. Immunomodulatory Role of Capsular Polysaccharides Constituents of *Cryptococcus neoformans*. **Frontiers in Medicine**, v. 6, n. June, p. 1–8, 2019.
- DERAY, G.; MERCADAL, L.; BAGNIS, C. Amphotericin B nephrotoxicity. **Nephrologie**, v. 23, n. 3, p. 119–122, 2002
- DHITINANMUANG, W.; CHONGTRAKOOL, P.; JITMUANG, A. Undiagnosed *Cryptococcus gattii* meningitis leading to subsequent ventriculoperitoneal shunt infection in a patient with symptoms of normal pressure hydrocephalus: Case report and literature review. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 1–7, 2018.
- DIAZ, M. R. et al. Comparative analysis of the intergenic spacer regions and population structure of the species complex of the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. **FEMS Yeast Research**, 2005.
- DOS SANTOS BENTES, A. et al. *Cryptococcus gattii* VGII isolated from native forest and river in Northern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 2, p. 495–500, 2019.
- DOS SANTOS, W. R. A. et al. Primary endemic Cryptococcosis *gattii* by molecular type VGII in the state of Pará, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 8, p. 813–818, 2008.
- DRAIN, P. K. et al. Validation of clinic-based cryptococcal antigen lateral flow assay screening in HIV-infected adults in South Africa. **Scientific Reports**, 2019.
- DUN, I. S.; BLATTNER, F. R. Charons 36 to 40: Multi enzyme, high capacity, recombination deficient replacement vectors with polylinkers and ploystuffers. **Nucleic Acids Research**, v. 15, n. 6, p. 2677–2698, 1987.
- ECEVIT, I. Z. et al. The Poor Prognosis of Central Nervous System Cryptococcosis among

- Nonimmunosuppressed Patients: A Call for Better Disease Recognition and Evaluation of Adjuncts to Antifungal Therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, n. 10, p. 1443–1447, 2006a.
- ECEVIT, I. Z. et al. The poor prognosis of central nervous system cryptococcosis among nonimmunosuppressed patients: a call for better disease recognition and evaluation of adjuncts to antifungal therapy. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, 2006b.
- EMMONS, C. W. Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with the pigeon (*Columba livia*). **American Journal of Epidemiology**, 1955.
- ENDEMAN, H. et al. The Fc γ receptor IIA-R/R131 genotype is associated with severe sepsis in community-acquired pneumonia. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 16, n. 7, p. 1087–1090, 2009.
- ENGELTHALER, D. M. et al. *Cryptococcus gattii* in North American Pacific Northwest: Whole-population genome analysis provides insights into species evolution and dispersal. **mBio**, v. 5, n. 4, p. 1–18, 2014.
- ESHWARA, V. et al. Fatal *Cryptococcus gattii* meningitis with negative cryptococcal antigen test in a HIV-non-infected patient. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 439–440, 2018.
- ESPINEL-INGROFF, A. Mechanisms of resistance to antifungal agents: Yeasts and filamentous fungi. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 25, p. 101–106, 2008.
- FAVALESSA, O. C. et al. Fatal *Cryptococcus gattii* genotype AFLP6/VGII infection in a HIV-negative patient: Case report and a literature review. **Mycoses**, v. 57, n. 10, p. 639–643, 2014.
- FERREIRA, G. F. et al. The role of oxidative and nitrosative bursts caused by azoles and amphotericin B against the fungal pathogen *Cryptococcus gattii*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 8, p. 1801–1811, 2013.
- FERRER, C. et al. Detection and identification of fungal pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S ribosomal DNA typing in ocular infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 8, p. 2873–2879, 2001.
- FORTES, S. T. et al. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from a native jungle tree in the Brazilian Amazon rainforest. **Mycoses**, v. 44, n. 5–6, p. 137–140, 2001.
- FRANCIS, P.; WALSH, T. J. Evolving role of flucytosine in immunocompromised patients: new insights into safety, pharmacokinetics, and antifungal therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 15, p. 1003–1018, 1992.
- FRANZOT, S. P.; SALKIN, I. F.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: Separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, 1999.
- FRASER, J. A. et al. Same-sex mating and the origin of the Vancouver Island *Cryptococcus gattii* outbreak. **Nature**, n. 437, p. 1360–1364, 2005.
- FRENCH, N. et al. Cryptococcal infection in a cohort of HIV-1-infected Ugandan adults. **AIDS**, 2002.
- GALLIS, H. A.; DREW, R. H.; PICKARD, W. W. Amphotericin B: 30 years of clinical experience. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 12, n. 2, p. 308–329, 1990.
- GARELNABI, M.; MAY, R. C. Variability in innate host immune responses to cryptococcosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 7, p. 5–9, 2018.
- GASSIEP, I. et al. Cryptococcal infections over a 15 year period at a tertiary facility & impact of guideline management. **Mycoses**, 2018.
- GEORGE, I. A. et al. Comparative Epidemiology and Outcomes of Human Immunodeficiency Virus (HIV), non-HIV non-transplant, and solid organ transplant associated cryptococcosis: A population-based study. **Clinical Infectious Diseases**, 2018.
- HANSEMANN, D. V. Ueber eine bisher nicht beobachtete Gehirnerkrankung durch Hefen. *Verh.*

- Dtsch. **Ges. Pathol**, v. 9, p. 21–24, 1905.
- HAMDAN, N. et al. Cryptococcal meningitis in an immunocompetent patient with obstructive hydrocephalus: A case report. **Neurochirurgie**, 2018.
- HEADLEY, S. A. et al. Pathologic, histochemical, and immunohistochemical findings in pulmonary and encephalitic cryptococcosis in a goat. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 31, n. 1, p. 69–73, 2019.
- HEVEY, M. A. et al. Presentation and Mortality of Cryptococcal Infection Varies by Predisposing Illness: A Retrospective Cohort Study. **American Journal of Medicine**, 2019.
- HOSHINO, T. et al. A case of disseminated cryptococcosis with necrotizing fasciitis in a non-HIV patient. **Acute Medicine & Surgery**, v. 4, n. 4, p. 454–457, 2017.
- HU, X. P. et al. Association of Fc γ receptor IIB polymorphism with cryptococcal meningitis in HIV-uninfected chinese patients. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. 1–6, 2012.
- HUFFNAGLE, G. B. et al. Down-regulation of the afferent phase of T cell-mediated pulmonary inflammation and immunity by a high melanin-producing strain of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Immunology**, 1995.
- INTERNATIONAL MYCOLOGICAL ASSOCIATION. Mycobank Database [Internet]. Disponível em: <<http://www.mycobank.org/BioMICS.aspx?Table=Mycobank&Rec=106784&Fields=All>>. Acesso em: 17 Out.2017.
- JACOBS, D. H. et al. Esophageal cryptococcosis in a patient with the hyperimmunoglobulin E-recurrent infection (Job's) syndrome. **Gastroenterology**, v. 87, n. 1, p. 201–203, 1984.
- JAIN, B. B. et al. Disseminated cryptococcosis in an immunocompetent child. **Turk Patoloji Dergisi**, v. 33, n. 1, p. 77–80, 2017.
- KATSU, M. et al. The internal transcribed spacers and 5.8S rRNA gene show extensive diversity among isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex. **FEMS Yeast Research**, 2004.
- KERRIGAN, A. M.; BROWN, G. D. C-type lectins and phagocytosis. **Immunobiology**, v. 214, n. 7, p. 562–575, 2009.
- KHELL DA SILVA, B. et al. Characterization of clinical isolates of the *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex from the Amazonas State in Brazil. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 29, n. 1, p. 40–43, 2012.
- KIDD, S. E. et al. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 49, p. 17258–17263, 2004.
- KINNECOM, K.; PACHTER, J. S. Selective capture of endothelial and perivascular cells from brain microvessels using laser capture microdissection. **Brain Research Protocols**, 2005.
- KITAURA, T. et al. *Cryptococcus gattii* genotype VGIIa infection imported from Vancouver Island to Japan. **Journal of Infection and Chemotherapy**, n. 2017, p. 12–14, 2018.
- KOZEL, T. R.; GOTSCHLICH, E. C. The capsule of *cryptococcus neoformans* passively inhibits phagocytosis of the yeast by macrophages. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, 1982.
- KROCKENBERGER, M. B. et al. Comparing immunochromatography with latex antigen agglutination testing for the diagnosis of cryptococcosis in cats, dogs and koalas. **Medical Mycology**, p. 1–8, 2019.
- KRONSTAD, J. W. et al. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 3, p. 193–203, 2011.
- KUMAR, S. et al. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547–1549, 2018.
- KWON-CHUNG, K.J. A New Genus, *Filobasidiella*, the Perfect State of *Cryptococcus neoformans*. **Mycologia**, v. 67, p. 1197–200, 1975.

- LACAZ, C. S. et al. Tratado de Micologia médica. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 2002.
- LAN, S.-H. Cerebral infarction in chronic meningitis: a comparison of tuberculous meningitis and cryptococcal meningitis. **Qjm**, v. 94, n. 5, p. 247–253, 2001.
- LARSEN, R. A. et al. Persistent cryptococcus neoformans infection of the prostate after successful treatment of meningitis. **Annals of Internal Medicine**, 1989.
- LAZERA, M. S. et al. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. **Medical Mycology**, v. 38, n. 5, p. 379–383, 2000.
- LEE, G. A. et al. Molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Western Australia and correlation with antifungal susceptibility. **Medical Mycology**, p. 1–7, 2019.
- LEE, Y. C. G.; CHEW, G. T.; ROBINSON, B. W. S. Pulmonary and meningeal cryptococcosis in pulmonary alveolar proteinosis [12]. **Australian and New Zealand Journal of Medicine**, v. 29, n. 6, p. 843–844, 1999.
- LIN, K. H. et al. Diabetes mellitus is associated with acquisition and increased mortality in HIV-uninfected patients with cryptococcosis: A population-based study. **Journal of Infection**, v. 72, n. 5, p. 608–614, 2016.
- LIN, X.; HEITMAN, J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. **Annu.Rev.Microbiol.**, 2006.
- LITVINTSEVA, A. P. et al. Multilocus sequence typing reveals three genetic subpopulations of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A), including a unique population in Botswana. **Genetics**, v. 172, n. 4, p. 2223–2238, 2006.
- LIU, T. B.; PERLIN, D. S.; XUE, C. Molecular mechanisms of cryptococcal meningitis. **Virulence**, v. 3, n. 2, p. 173-181, 2012.
- LOMES, N. R. et al. Cryptococcosis in non-HIV/non-transplant patients: A Brazilian case series. **Medical Mycology**, v. 54, n. 7, p. 669–676, 2016.
- LU, C. H. et al. The prognostic factors of cryptococcal meningitis in HIV-negative patients. **Journal of Hospital Infection**, v. 42, n. 4, p. 313–320, 1999.
- LUI, G. et al. Cryptococcosis in apparently immunocompetent patients. **QJM - Monthly Journal of the Association of Physicians**, v. 99, n. 3, p. 143–151, 2006.
- MACDOUGALL, L.; FYFE, M. Emergence of *Cryptococcus gattii* in a novel environment provides clues to its incubation period. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 1851–1852, 2006.
- MAIDEN, M. C. J. et al. Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, n. 95, v. 6, p. 3140-3145, 1998.
- MAZIARZ, E. K.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 1, p. 179–206, 2016.
- MEYER, W. et al. Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 9, p. 2274–2280, 1993.
- MEYER, W. et al. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 2, p. 189–195, 2003.
- MEYER, W. et al. Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **Medical Mycology**, v. 46, n.6, p. 561-570, 2009.
- MEYER, W.; TRILLES, L. Genotyping of the *Cryptococcus neoformans/C. gattii* species complex. **Australian Biochemist**, v. 41, n. 1, p. 11–15, 2010.
- MORE, A. et al. Acute vision loss in post-partum period as presenting symptom of HIV-associated cryptococcal meningitis—an unusual case report. **BMC Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, 2016.

- MÜLLER, U. et al. IL-13 Induces Disease-Promoting Type 2 Cytokines, Alternatively Activated Macrophages and Allergic Inflammation during Pulmonary Infection of Mice with *Cryptococcus neoformans*. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 8, p. 5367–5377, 2007.
- MURANDA, A. Z. et al. Cryptococcoma of a transplanted kidney in a patient presenting with recurrent urinary tract infection: A case report. **BMC Nephrology**, v. 19, n. 1, p. 1–5, 2018.
- NGAMSKULRUNGROJ, P. et al. Global VGIIa isolates are of comparable virulence to the major fatal *Cryptococcus gattii* Vancouver Island outbreak genotype. **Clinical Microbiology and Infection**, 2011.
- NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. MINIREVIEW Impact of Melanin on Microbial Virulence and Clinical Resistance to Antimicrobial Compounds. v. 50, n. 11, p. 3519–3528, 2006.
- O'HALLORAN, J. A.; POWDERLY, W. G.; SPEC, A. Cryptococcosis Today: It Is Not All About HIV Infection. **Current Clinical Microbiology Reports**, v. 4, n. 2, p. 88–95, 2017.
- OLSZEWSKI, M. A. et al. Urease Expression by *Cryptococcus neoformans* Promotes Microvascular Sequestration, Thereby Enhancing Central Nervous System Invasion. **American Journal of Pathology**, 2004.
- OU, X. T. et al. Genotypes coding for mannose-binding lectin deficiency correlated with cryptococcal meningitis in HIV-uninfected Chinese patients. **Journal of Infectious Diseases**, v. 203, n. 11, p. 1686–1691, 2011.
- OWUOR, O. H.; CHEGE, P. CRYPTOCOCCAL meningitis in a HIV negative newly diagnosed diabetic patient: A CASE report. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p. 5–9, 2019.
- P. PACHARN; P. WANATPREEYA; B. BOOCHAI;; KULKANYA, J. O. V. N. C. Disseminated cryptococcosis in two boys with novel mutation of CD40 Ligand-Associated X-linked hyper-IgM syndrome. **Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology**, v. 3, p. 1–4, 2019.
- PAIVA, A. L. C. et al. Cryptococcoma mimicking a brain tumor in an immunocompetent patient: Case report of an extremely rare presentation. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 136, n. 5, p. 492–496, 2018.
- PANEPINTO, J. C.; WILLIAMSON, P. R. Intersection of fungal fitness and virulence in *Cryptococcus neoformans*. n. August, p. 489–498, 2018.
- PAPPAS, P. G. et al. Cryptococcosis in Human Immunodeficiency Virus–Negative Patients in the Era of Effective Azole Therapy. **Clinical Infectious Diseases**, 2001.
- PAPPAS, P. G. Cryptococcal infections in non-HIV-infected patients. **Transactions of the American Clinical and Climatological Association**, v. 124, p. 61–79, 2013.
- PERFECT, J. R. et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of america. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 50, n. 3, p. 291–322, 2010.
- PFALLER, M. A. et al. Global Trends in the Antifungal Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* (1990 to 2004). v. 43, n. 5, p. 2163–2167, 2005.
- PFALLER, M. A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. **The American Journal of Medicine**, v. 125, n. 1, p. S3–S13, 2012.
- PHILLIPS, P. et al. Longitudinal clinical findings and outcome among patients with *cryptococcus gattii* infection in British Columbia. **Clinical Infectious Diseases**, v. 60, n. 9, p. 1368–1376, 2015.
- PLATONOV, A. E. et al. Association of Human FcγRIIa (CD32) Polymorphism with Susceptibility to and Severity of Meningococcal Disease. **Clinical Infectious Diseases**, v. 27, n. 4, p. 746–750, 1998.
- POLLOCK, H. et al. Perivascular spaces in the basal ganglia of the human brain: Their relationship to lacunes. **Journal of Anatomy**, v. 191, n. 3, p. 337–346, 1997.
- QUINTERO, O. et al. Risk factors of laryngeal cryptococcosis: A case report. **Medical Mycology Case Reports**, v. 24, n. January, p. 82–85, 2019.
- RAJASINGHAM, R. et al. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an

- updated analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 8, p. 873–881, 2017a.
- RAJASINGHAM, R. et al. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 8, p. 873–881, 2017b.
- ROCHA, D. F. S. et al. MLST reveals a clonal population structure for *Cryptococcus neoformans* molecular type VNI isolates from clinical sources in Amazonas, Northern-Brazil. **PLoS one**, v. 13, n. 6, p. e0197841, 2018.
- RODERO, L. et al. G484S Amino Acid Substitution in Lanosterol 14- α Demethylase (ERG11) Is Related to Fluconazole Resistance in a Recurrent *Cryptococcus neoformans* Clinical Isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 11, p. 3653–3656, 2003.
- RODRIGUES, M. L. et al. Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. **Eukaryotic Cell**, 2008.
- ROSEN, L. B. et al. Anti-GM-CSF Autoantibodies in Patients with Cryptococcal Meningitis. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 8, p. 3959–3966, 2013.
- RUIZ, A.; NEILSON, J. B.; BULMER, G. S. Control of *cryptococcus neoformans* in nature by biotic factors. **Medical Mycology**, 1982.
- SAIJO, T. et al. Anti-granulocyte-macrophage colony-stimulating factor autoantibodies are a risk factor for central nervous system infection by *Cryptococcus gattii* in otherwise immunocompetent patients. **mBio**, v. 5, n. 2, 2014.
- SAWAI, T. et al. Miliary tuberculosis with co-existing pulmonary cryptococcosis in non-HIV patient without underlying diseases: A case report. **BMC Pulmonary Medicine**, v. 18, n. 1, p. 1–5, 2018.
- SEATON, R. A. et al. Visual loss in immunocompetent patients with *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* meningitis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 1997.
- SHAUNAK, S.; SCHELL, W. A.; PERFECT, J. R. Cryptococcal meningitis with normal cerebrospinal fluid. **Journal of Infectious Diseases**, v. 160, n. 5, p. 912, 1989.
- SIAPAKAS, A. R. et al. Cell wall-linked cryptococcal phospholipase B1 is a source of secreted enzyme and a determinant of cell wall integrity. **Journal of Biological Chemistry**, 2007.
- SIONOV, E. et al. Identification of a *Cryptococcus neoformans* cytochrome P450 lanosterol 14 α -demethylase (Erg11) residue critical for differential susceptibility between fluconazole/voriconazole and itraconazole/posaconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, p. 1162–1169, 2012.
- SOUTO, A. C. P. et al. Population Genetic Analysis Reveals a High Genetic Diversity in the Brazilian *Cryptococcus gattii* VGII Population and Shifts the Global Origin from the Amazon Rainforest to the Semi-arid Desert in the Northeast of Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 8, p. 1–19, 2016.
- SPEC, A.; RAVAL, K.; POWDERLY, W. G. End-stage liver disease is a strong predictor of early mortality in cryptococcosis. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 3, n. 1, p. 1–5, 2016.
- SPINNER, M. A. et al. GATA2 deficiency: A protean disorder of hematopoiesis, lymphatics, and immunity. **Blood**, v. 123, n. 6, p. 809–821, 2014.
- ST-PIERRE, J. et al. Case Series: Report of the First Two Human Indigenous Cases of *Cryptococcus gattii* Infection in Eastern Canada. **Mycopathologia**, v. 183, n. 2, p. 399–406, 2018.
- STEENBERGEN, J. N.; SHUMAN, H. A.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2001.
- STEINER, I.; POLACHEK, I.; MELAMED, E. Dementia and Myoclonus in a Case of Cryptococcal Encephalitis. **Archives of Neurology**, 1984.
- TAJIMA, K. et al. Solubilized melanin suppresses macrophage function. **FEBS Open Bio**, v. 9, n. 4, p. 791–800, 2019.

- TANIWAKI, M. et al. Pulmonary cryptococcosis mimicking lung cancer. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 19, n. 9, p. 1033, 2019.
- TRILLES, L. et al. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 5, p. 455–462, 2008.
- TRILLES, L. et al. Correlation of antifungal susceptibility and molecular type within the *Cryptococcus neoformans*/*C. gattii* species complex. **Medical Mycology**, v. 50, n. 3, p. 328–332, 2012.
- URWIN, R.; MAIDEN, M. C. J. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. **Trends in Microbiology**, 2003.
- VAN DER HORST, C.M, SAAG, M.S, CLOUD, G.A, HAMILL, R.J, GRAYBILL, J.R, SOBEL, J. . TREATMENT OF CRYPTOCOCCAL MENINGITIS ASSOCIATED WITH THE ACQUIRED IMMUNODEFICIENCY SYNDROME. **N Engl J Med**, v. 337, p. 15–21, 1997.
- VAN TONGEREN, L.; SHAIPIANICH, T.; FLEETHAM, J. A. Coinfection with *Cryptococcus gattii* and *Mycobacterium tuberculosis* in an otherwise healthy 18-year-old woman. **Canadian Respiratory Journal**, v. 18, n. 4, p. 62–64, 2011.
- VANHOVE, M. et al. Genomic epidemiology of *Cryptococcus* yeasts identifies adaptation to environmental niches underpinning infection across an African HIV/AIDS cohort. **Molecular Ecology**, v. 26, n. 7, p. 1991–2005, 2017.
- VARMA, A.; KWON-CHUNG, K. J. Heteroresistance of *Cryptococcus gattii* to fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 6, p. 2303–2311, 2010.
- VARMA, A. DNA Probe for Strain Typing of *Cryptococcus neoformans*. v. 30, n. 11, p. 2960–2967, 1992.
- VIEIRA, M. A. DA C. S. et al. Potenciais evocados visuais mostram correlação positiva forte com a pressão intracraniana em pacientes com meningite criptocócica. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 73, n. 4, p. 309–313, 2015.
- VINCENT, B. M. et al. Fitness Trade-offs Restrict the Evolution of Resistance to Amphotericin B. **PLoS Biology**, 2013.
- VINH, D. C. et al. Autosomal dominant and sporadic monocytopenia with susceptibility to mycobacteria, fungi, papillomaviruses, and myelodysplasia. **Blood**, v. 115, n. 8, p. 1519–1529, 2010.
- VOS, P. et al. A new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. 21, p. 388–396, 1995.
- WENINK, M. H. et al. The Inhibitory FcγIIb Receptor Dampens TLR4-Mediated Immune Responses and Is Selectively Up-regulated on Dendritic Cells from Rheumatoid Arthritis Patients with Quiescent Disease. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 7, p. 4509–4520, 2009.
- WILLIAMSON, P. R. et al. Cryptococcal meningitis: Epidemiology, immunology, diagnosis and therapy. **Nature Reviews Neurology**, v. 13, n. 1, p. 13–24, 2016.
- WILSON, R. M. et al. Disseminated cryptococcosis in a HIV-negative patient: Case report of a newly diagnosed hypertensive adult presenting with hemiparesis. **Medical Mycology Case Reports**, v. 22, n. June, p. 4–7, 2018.
- WOZNIAK, K. L. et al. Insights into the mechanisms of protective immunity against *Cryptococcus neoformans* infection using a mouse model of pulmonary cryptococcosis. **PLoS ONE**, 2009.
- YAUCH, L. E.; LAM, J. S.; LEVITZ, S. M. Direct inhibition of T-cell responses by the *Cryptococcus* capsular polysaccharide glucuronoxylomannan. **PLoS Pathogens**, v. 2, n. 11, p. e120, 2006.
- YUCHONG, C. et al. Cryptococcosis in China (1985–2010): Review of Cases from Chinese Database. **Mycopathologia**, v. 173, n. 5–6, p. 329–335, 2012.
- ZARAGOZA, O. et al. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Advances in Applied Microbiology**, 2009.

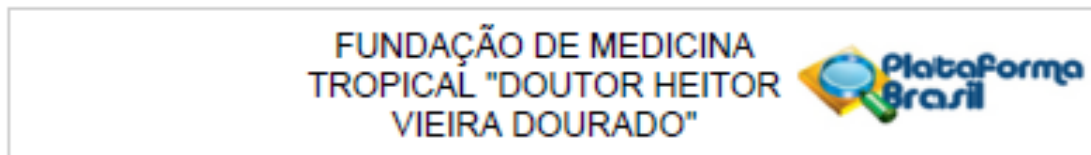
ZHOU, W. et al. Cryptococcal meningitis mimicking cerebral infarction: A case report. **Clinical Interventions in Aging**, v. 13, p. 1999–2002, 2018.

ZHU, L. P. et al. Cryptococcal meningitis in non-HIV-infected patients in a Chinese tertiary care hospital, 1997-2007. **Medical Mycology**, 2010.

ZHU, X.; WILLIAMSON, P. R. **Role of laccase in the biology and virulence of Cryptococcus neoformans**FEMS Yeast Research, 2004.

12. ANEXOS

ANEXO 1. PARECER DO CEP DA FMT-HVD



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização genotípica e sensibilidade a antifúngicos dos agentes causadores da criptococose no estado do Amazonas

Pesquisador: João Vicente Braga de Souza

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 90749718.3.0000.0005

Instituição Proponente: Fundação de Medicina Tropical do Amazonas - FMT/IMT/AM

Patrocinador Principal: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas - FAPEAM

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.779.469

Apresentação do Projeto:

Desenho do Estudo: Observacional

Tamanho da amostra será de 240 participantes.

Indivíduos abordados pessoalmente, recrutados ou sofrerão algum tipo de intervenção no centro de pesquisa. 90 Participantes.

Trata-se de um estudo de corte transversal que será realizado com uma população de pacientes diagnosticados com criptococose no período de Janeiro de 2014 a Dezembro de 2020 na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD). Os isolados serão obtidos das amostras biológicas (LCR e sangue) após visualização do fungo em exame direto com tinta nanquim ou pelo teste rápido CrAg. O recrutamento dos pacientes terá início após visualizarmos o seu prontuário no sistema de atendimento da FMT-HVD (Idoctor) se o mesmo atenderá aos critérios de inclusão. Em relação aos pacientes diagnosticados em 2018-2020, estas informações serão obtidas após os pacientes terem sido esclarecidos sobre o estudo e aprovado a sua participação e a utilização das cepas após a assinatura do TCLE ou se for menor de idade a assinatura do responsável no Termo de Assentimento. Em seguida será realizada uma entrevista, sendo aplicado um formulário próprio de investigação clínica, epidemiológica e laboratorial dos casos de criptococose.

A Criptococose é uma importante micose sistêmica adquirida por inalação de propágulos

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25
Bairro: D. Pedro I **CEP:** 69.040-000
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)2127-3572 **Fax:** (92)2127-3572 **E-mail:** cep@fmt.am.gov.br

ANEXO 2. TERMO DE CONCENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO
(FMT-HVD)

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Por meio deste documento, gostaríamos de lhe convidar para participar **VOLUNTARIAMENTE** de uma pesquisa chamada: Caracterização genotípica e sensibilidade a antifúngicos dos agentes causadores de criptococose no estado do Amazonas. Eu, Silviane Bezerra Pinheiro e a minha equipe de trabalho somos os pesquisadores responsáveis por este estudo.

Este termo foi elaborado para lhe ajudar a decidir se gostaria ou não de participar desta pesquisa, pois você poderá entender quais são os nossos objetivos e o quanto a sua participação é essencial. É preciso lembrar que você irá **PARTICIPAR VOLUNTARIAMENTE**, ou seja, terá o direito de se recusar ou de se retirar do estudo em qualquer momento e garantimos que o seu atendimento ou tratamento nesta Fundação **NÃO SERÃO PREJUDICADOS**.

Por que estou sendo convidado para participar deste estudo?

Dúvidas frequentes:

Observamos no resultado do seu exame laboratorial que você foi diagnosticado (a) com uma infecção grave causada por fungos que é chamada de Criptococose. Esta doença é conhecida popularmente como a "doença transmitida pelos pombos", ou seja, ela pode ocorrer após a inalação de micro-organismos que estão presentes nas fezes dos pombos, de pássaros criados em gaiolas, galinhas e até nas fezes de morcegos, mas esses micro-organismos também podem estar presentes na madeira e é importante que você saiba que esta doença não é transmitida de pessoa para pessoa. Após a inalação esses fungos podem permanecer por vários anos no nosso corpo sem causar nenhum sintoma, mas quando a nossa imunidade fica baixa a doença pode se manifestar, principalmente na forma de meningite.

Rubricas:
 Sujeito da Pesquisa e /ou responsável legal _____
 Pesquisador Responsável _____



FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO (FMT-HVD)

A Criptococose ocorre em todo mundo e aproximadamente duzentos e vinte e cinco mil (225.000) pessoas morrem a cada ano em virtude dessa infecção. E nos pesquisadores estamos interessados em estudar esta doença porque ela também é muito frequente aqui no Amazonas, é grave devido ao quadro de meningite e o tratamento pode ser demorado.

Quais são os objetivos desta pesquisa?

Pretendemos conhecer todas as condições que possam favorecer o desenvolvimento da doença, como as suas condições de moradia e trabalho, história de vida, atividades de risco e doenças anteriores que poderiam ter deixado seu organismo vulnerável. Também gostaríamos de descrever as principais características clínicas, como os sintomas, resultados dos exames laboratoriais e descobrir a característica única do DNA dos fungos que estão presentes no seu organismo e verificar se essa característica poderia provocar uma doença mais grave ou não.

Quem poderá ou não participar desta pesquisa?

Poderão participar pessoas de todas as idades, sendo portadoras ou não do vírus HIV, é preciso ser paciente e ter sido diagnosticado na FMT-HVD. Serão admitidos pacientes que nunca tiveram Criptococose anteriormente e também serão aceitos aqueles que decidirem participar VOLUNTARIAMENTE após terem lido e assinado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Serão excluídos os pacientes que desejaram abandonar o estudo mesmo tendo concordado inicialmente em participar, aqueles que forem transferidos para outros hospitais, já que não poderemos mais acompanhá-lo.

O que será feito se eu decidir participar deste estudo?

Você será entrevistado e nós iremos aplicar um questionário para coletar informações sobre os sintomas que você estava apresentando no momento em que chegou na FMT-HVD, sobre dados sociodemográficos (seu nome, idade, local de nascimento, condições de moradia, profissão)

Rubricas:
 Sujeito da Pesquisa e /ou responsável legal _____
 Pesquisador Responsável _____



FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO (FMT-HVD)

e possíveis atividades que representem risco para adquirir a Criptococose. Teremos acesso aos resultados dos seus exames laboratoriais, de raio x, tomografia computadorizada ou ressonância magnética, se estes forem solicitados por seu médico.

Durante o período em que estiver internado iremos coletar informações com a equipe médica que estiver lhe acompanhando sobre os medicamentos que serão utilizados para seu tratamento e também sobre a evolução do seu quadro clínico. Quando as suas amostras biológicas forem enviadas para diagnóstico no Laboratório de Micologia deste hospital, iremos utilizar os fungos que crescerem para que possamos definir a característica do DNA dos mesmos. E somente quando for necessário precisaremos tirar fotografias de possíveis lesões ou feridas que sejam características da doença que estamos estudando.

A participação neste estudo envolve riscos ou desconfortos?

Existe o risco de você se sentir desconfortável e constrangido durante a entrevista ao ser questionado sobre assuntos pessoais e se precisarmos tirar fotografias, mas todas as informações que iremos coletar serão conhecidas apenas pela nossa equipe de pesquisa e ao assinar este termo você terá a garantia de que nós manteremos o seu nome em sigilo. Em relação as fotografias garantimos que as fotos serão tratadas de forma que o seu rosto não seja identificado.

Quais são os meus direitos?

Mesmo que os riscos sejam mínimos você terá assegurado o direito a indenização no caso de quaisquer danos eventualmente produzidos por este estudo. Caso seja necessária a sua vinda até a FMT-HVD para fins exclusivos da pesquisa, terá direito a ser ressarcido dos gastos com transporte público ou privado a serem pagos pelo pesquisador responsável. E se você quiser, poderá ser informado no final deste estudo sobre os resultados obtidos.

Serei beneficiado de alguma forma?

Ao participar deste estudo você não será beneficiado de forma direta e não terá nenhum tipo de vantagem em relação aos demais pacientes, mas certamente irá

Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação
Av. Pedro Teixeira, 25 – Dom Pedro II

Tel: (92) 2127-3572 / E-mail: cep@fmt.am.gov.br / Coordenadora: Dra. Marilaine Martins

Rubricas:

Sujeito da Pesquisa e /ou responsável legal _____

Pesquisador Responsável _____



**FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO
(FMT-HVD)**

contribuir para aumentar o conhecimento médico e laboratorial a respeito dessa doença fúngica (Micose) que ainda é pouco estudada aqui na região amazônica.

Terei despesas?

As despesas necessárias para a realização da pesquisa não são de sua responsabilidade. Você não terá gastos para participar do estudo, pois o seu atendimento, diagnóstico, assistência médica e tratamento já são subsidiados pela FMT-HVD.

Receberei alguma remuneração?

Você não receberá dinheiro ou bem material para participar desta pesquisa.

Com quem poderei me comunicar se eu tiver outras dúvidas no decorrer da minha participação no estudo?

Você poderá entrar em contato com:

- Silviane Bezerra Pinheiro (pesquisadora que está executando a pesquisa)
Tel: (92) 99333-7680 / **E-mail:** silviane_pinheiro@hotmail.com / **Endereço profissional:** Av. André Araújo, 2936 - Petrópolis, Manaus – AM – procurar pelo Laboratório de Microbiologia no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) ou no laboratório de Micologia da FMT-HVD, localizada na Av. Pedro Teixeira, 25 - Dom Pedro, Manaus – AM. Horário disponível para atendimento: Segunda a Sexta-feira de 09:00-17:00 horas.
- Comitê de ética em Pesquisas (CEP) da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD). **E-mail:** cep@fmt.am.gov.br. **Tel:** (92) 2127-3572. **Endereço:** Av. Pedro Teixeira, nº 25, Bairro Dom Pedro, Manaus-Amazonas. **Horário de funcionamento:** Segunda a Sexta-feira de 08:00-12:00 horas.

Rubricas:
Sujeito da Pesquisa e /ou responsável legal _____
Pesquisador Responsável _____

Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado
Av. Pedro Teixeira, 25 – Dom Pedro – Manaus, Amazonas- CEP: 69040-000
Tel: (92) 2127-3572 / E-mail: cep@fmt.am.gov.br / Coordenadora: Dra. Marilaine Martins



**FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO
(FMT-HVD)**

Eu, _____ li esse termo de consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual autorizo a minha participação. A explicação que recebi tratou dos riscos e benefícios. Entendi que sou livre para retirar minha permissão a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta decisão afete o atendimento, acompanhamento ou tratamento na FMT-HVD. Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós. Sendo assim, eu concordo voluntariamente em participar deste estudo

(Assinatura do participante da pesquisa ou do responsável legal)

(Assinatura da Testemunha)

Em caso de analfabetos, semianalfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.



IMPRESSÃO DACTILOSCÓPICA

Manaus, _____ de _____ de _____

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste indivíduo ou de seu representante legal para a participação neste estudo

(Assinatura do pesquisado)

Manaus, _____ de _____ de _____

ANEXO 3. FORMULÁRIO APLICADO PARA ENTREVISTA E COLETA DE DADOS CLÍNICOS – EPIDEMIOLÓGICOS E LABORATORIAIS

Prontuário:	Código do paciente:	Entrada na FMT-HVD:	Veio de outro hospital?
INFORMAÇÕES SOCIODEMOGRÁFICAS			
Nome do paciente:		Nome da mãe:	
Idade:	Sexo: <input type="checkbox"/> Masculino <input type="checkbox"/> Feminino	Naturalidade:	Profissão atual:
Endereço atual:			CEP:
Tempo nesta moradia:		Tipo de residência: <input type="checkbox"/> Alvenaria <input type="checkbox"/> Madeira sem pintura <input type="checkbox"/> Madeira com pintura	
ATIVIDADES OU EXPOSIÇÕES DE RISCO			
<input type="checkbox"/> Construção civil <input type="checkbox"/> Visita a cavernas <input type="checkbox"/> Criação de aves em domicílio <input type="checkbox"/> Exposição a fezes de Pombo <input type="checkbox"/> Agricultura <input type="checkbox"/> Mineração <input type="checkbox"/> Morador de rua <input type="checkbox"/> Jardinagem <input type="checkbox"/> Carpintaria <input type="checkbox"/> Marcenaria <input type="checkbox"/> Nenhuma dessas condições <input type="checkbox"/> Trabalha em Demolições <input type="checkbox"/> Mora próximo o madeireiro <input type="checkbox"/> Contato com Galinheiro <input type="checkbox"/> Visita a Áreas Endêmicas (Austrália, Canadá, Costa do Pacífico EUA, Nordeste Brasileiro)			
Outros:			
FATORES DE RISCO PRÉ-EXISTENTES			
<input type="checkbox"/> Alcoolismo <input type="checkbox"/> Tabagismo <input type="checkbox"/> Uso de drogas ilícitas <input type="checkbox"/> Diabetes mellitus <input type="checkbox"/> Cirrose <input type="checkbox"/> HAS <input type="checkbox"/> Hepatite Qual: _____ Transplante <input type="checkbox"/> Qual: _____ <input type="checkbox"/> Gravidez <input type="checkbox"/> Neoplasia Qual: _____			
<input type="checkbox"/> Doença cardiovascular <input type="checkbox"/> Doença renal crônica <input type="checkbox"/> TB Qual: _____ Doença auto-imune Qual: _____			
<input type="checkbox"/> Leucemia <input type="checkbox"/> Linfoma <input type="checkbox"/> Cirrose Doença Pulmonar			
Uso de anti-TNF Qual: _____ Data Início __/__/__ Data Término __/__/__ Uso de corticosteroides <input type="checkbox"/>			
Qual: _____ Data Início / / Data Término / / Outro Imunossupressor <input type="checkbox"/> Qual: _____			
Outro fator de risco? Qual?		<input type="checkbox"/> Não apresentou nenhum fator de risco (imunocompetente)	

MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Cefaleia Febre Náuseas Vômitos Anisocoria Convulsão Desorientação Tosse Dispnéia
 Perda Ponderal >10% <10% Tontura Dor Torácica Déficit de memória Bradicardia Hipertensão
 Zumbido Fotofobia Estrabismo Amaurose Diplopia Déficit Focal Diminuição Acuidade Auditiva
 Diminuição Acuidade Visual Papiledema Descerebração (extensão de membros superiores e inferiores) Paralisia Facial
 Falta de Equilíbrio Desvio conjugado do olhar Rigidez de nuca Síndrome Cerebelar

Lesão pulmonar: Sim Não / Tipo: Infiltrado intersticial Nodular Cavitário Derrame pleural

TC Crânio Não Sim Data: __/__/__ Lesões no SNC: Não Sim Sinais Hipertensão Intracraniana
 Hidrocefalia Criptococomas Nodulos miliares Ventriculite Dilatação de EVR Pseudocistos gelatinosos ou mucinosos
 Rx Tórax Normal Alterado Infiltrado Alveolar Infiltrado Intersticial Infiltrado Misto Nódulo Infiltrado Hilar/Mediastinal
 Cavitação Derrame Pleural Microcistos

Lesões cutâneas: Sim Não Tipo: Maculopapular Nodulares Celulites Abscessos Úlceras Erupções acneiformes

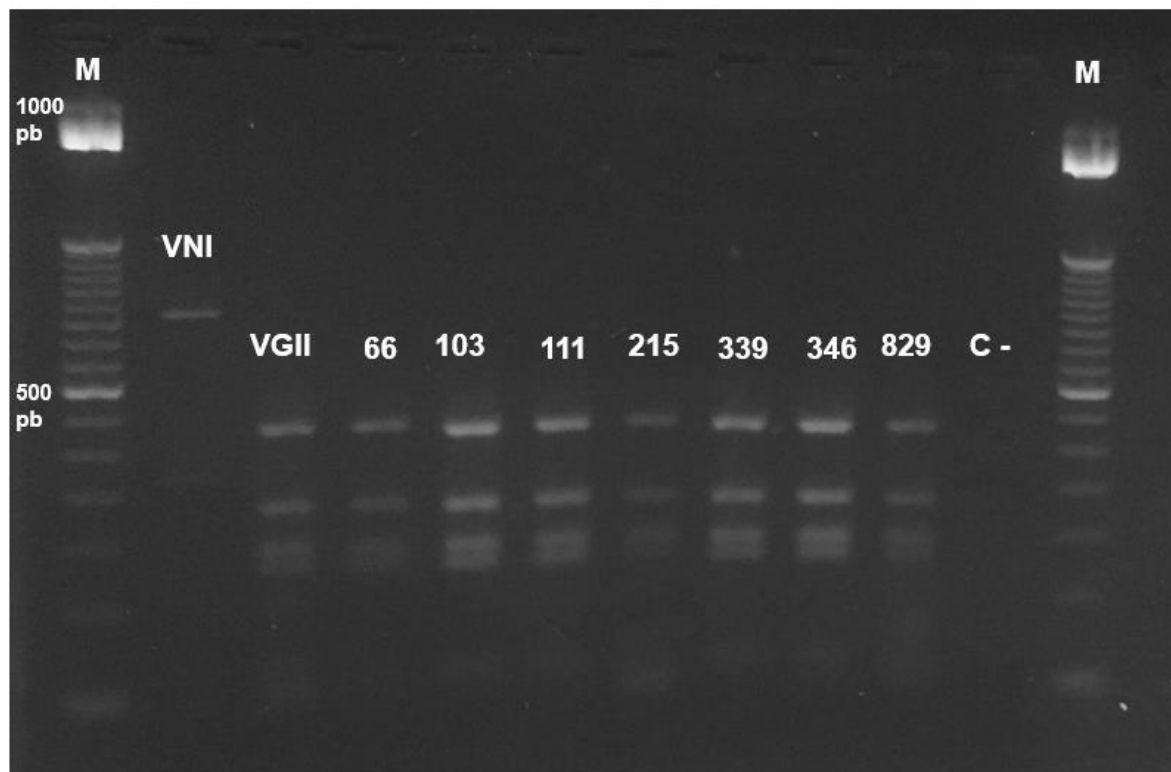
Foi internado: Sim Não / Qual enfermaria? _____ / Foi para a UTI: Sim Não / Data de entrada na UTI: _____ Saída: _____

EXAMES LABORATORIAIS					
ANÁLISE DA PRIMEIRA AMOSTRA DE LÍQUOR POSITIVA		TESTES SOROLÓGICOS			
Coleta: / / Requisição: _____					
Glicose: _____	Proteínas: _____	Lactato: _____	CrAg no LCR		
Cloretos: _____	Citometria global: _____		<input type="checkbox"/> Positivo	<input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/> Não realizado	
Citometria diferenciada: _____		CrAg no soro			
Resultado exame direto pelo Gram: _____					
Result. Ex. Direto p/ Ziehl-Neelsen: _____		<input type="checkbox"/> Positivo	<input type="checkbox"/> Negativo	<input type="checkbox"/> Não realizado	
Result. Ex. Direto nanquim: _____					
ANÁLISE PELO LABORATÓRIO DE MICOLOGIA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS SUCESSIVAS					
Tipo de Amostra: _____ Data de entrada: __/__/__ Nº da Requisição: _____ Nº de identificação da Amostra: _____					
Resultado do exame direto com tinta nanquim: <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/> Raros <input type="checkbox"/> Frequentes <input type="checkbox"/> Numerosos <input type="checkbox"/> Incontáveis					
Resul. da cultura em Ágar Níger: <input type="checkbox"/> Negativa <input type="checkbox"/> Positiva / Quant. De UFC's: _____ CGB: <input type="checkbox"/> <i>C. neoformans</i> <input type="checkbox"/> <i>C. gattii</i> <input type="checkbox"/> Não realizado					
Contag. de cels. em 10 µL de LCR não centrifugado (nanquim) – Gemulantes: _____ Não gemulantes: _____ Total: _____ Quant. Cels em 1 mL: _____					
SEQUELAS DESENVOLVIDAS DURANTE A INFECÇÃO		TRATAMENTO			
<input type="checkbox"/> Diminuição da capacidade mental <input type="checkbox"/> Hidrocefalia <input type="checkbox"/> Amaurose <input type="checkbox"/> Diminuição da acuidade visual <input type="checkbox"/> Paralisia de nervos cranianos <input type="checkbox"/> Surdez <input type="checkbox"/> Transtorno na linguagem		Fase de indução			
		Início	Antifúngico utilizado	Dose	Fim do trat
		/ /			/ /
		Fase de consolidação			
Início	Antifúngico utilizado	Dose	Fim do trat		
/ /			/ /		
DESFECHO CLÍNICO		Fase de manutenção			
<input type="checkbox"/> Transferido (Data: / /) <input type="checkbox"/> Óbito (Data: / /)		Início	Antifúngico utilizado	Dose	Fim do trat
<input type="checkbox"/> Alta hospitalar (Data: / /) <input type="checkbox"/> Em atendi (Data: / /)		/ /			/ /
Foram realizadas punções de alívio: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não / Quantas: _____ / Quantas amostras de LCR apresentaram cultivo positivo? _____					

ANEXO 4. PRIMERS E SUAS RESPECTIVAS TEMPERATURAS DE AMPLIFICAÇÃO

Locus (pb)	Produto gênico	Iniciadores	Condições de amplificação
<i>CAP59</i> (559)	Proteína capsular (fator de virulência)	CAP59 F 5' CTCTACGTCGAGCAAGTCAAG 3' CAP59 R 5' TCCGCTGCACAAGTGATACCC 3'	94°C por 3 min / 40 ciclos: 94 °C por 30 seg, 56 °C por 30 seg, 72 °C por 1 min / 72 °C por 6 min
<i>LAC1</i> (469)	Lacase (fator de virulência)	LAC1 F 5' AACATGTTCCCTGGGCCTGTG 3' LAC1 R 5' ATGAGAATTGAATCGCCTTGT 3'	94 °C por 3 min / 40 ciclos: 94 °C por 30 seg, 58 °C por 30 seg, 72 °C por 1 min / 72 °C por 6 min
<i>PLB1</i> (532)	Fosfolipase (fator de virulência)	PLB1 F 5' CTTCAGGCGGAGAGAGGTTT 3' PLB1 R 5' GATTGGCGTTGGTTTCAGT 3'	94°C por 3 min / 40 ciclos: 94°C por 45 seg, 61°C por 45 seg, 72°C por 1 min / 72 °C por 6 min
<i>URA5</i> (601)	Orotidina monofosfato pirofosforilase	URA5 F 5' ATGTCCTCCCAAGCCCTCGAC 3' URA5 R 5' TTAAGACCTCTGAACACCGTACTC 3'	94°C por 3 min / 40 ciclos: 94°C por 45 seg, 63°C por 1 min, 72°C por 2 min / 72 °C por 6 min
<i>GPD1</i> (543)	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	GPD1 F 5' CCACCGAACCTTCTAGGATA 3' GPD1 R 5' CTTCTTGGCACCTCCCTTGAG 3'	94°C por 3 min / 40 ciclos: 94°C por 45 seg, 63°C por 1 min, 72°C por 2 min / 72 °C por 6 min
<i>SOD1CN</i> (700)	Cu, Zn superóxido dismutase	Primers para <i>Cryptococcus neoformans</i> SOD1CN F 5'AAGCCTCTCATCCATATCTT 3' SOD1CN R 5'TTCAACCACGAATATGTA 3'	94°C por 3 min / 40 ciclos: 94°C por 30 seg, 52°C por 30 seg, 72°C por 1.5 min / 72 °C por 6 min
<i>SOD1CG</i> (700)		Primers para <i>Cryptococcus gattii</i> SOD1CG F 5' GATCCTCACGCCATTACG 3' SOD1CG R 5' GAATGATGCGCTTAGTTGGA 3'	
<i>IGS1</i> (723)	Espaço intergênico do RNAb ribossomal	IGS1 F 5' ATCCTTTGCAGACGACTTGA 3' IGS1 R 5' GTGATCAGTGCATTGCATGA 3'	94°C por 3 min / 40 ciclos: 94°C por 30 seg, 60°C por 30 seg, 72°C por 1 min / 72 °C por 6 min

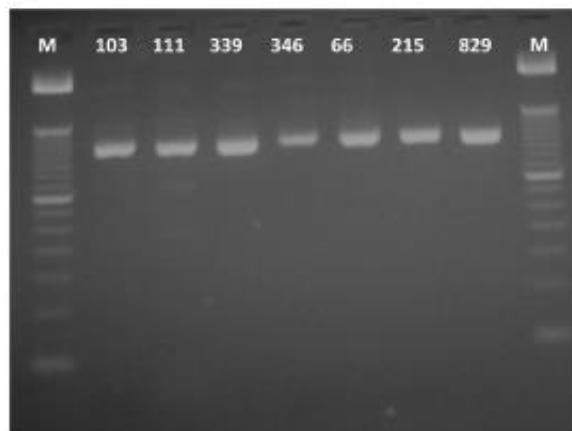
ANEXO 5. GENOTIPAGEM POR PCR-RFLP



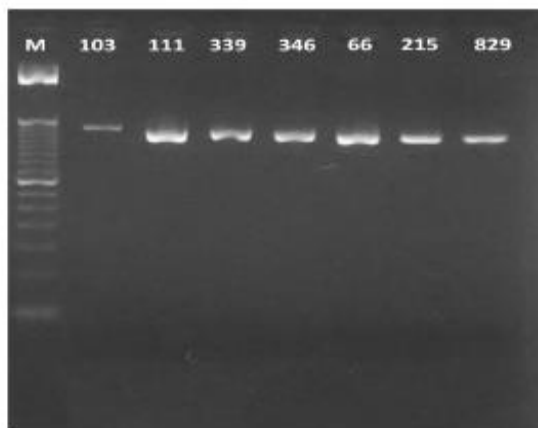
Gel de eletroforese da PCR do gene *Ura5* para genotipagem de *Cryptococcus gattii*. Nessa figura é possível verificar os controles positivos de cepas de referência VNI e VGII e o controle negativo. As 7 amostras clínicas estão na sequência do 66 ao 829. O perfil das bandas das amostras clínicas são compatíveis com o genótipo VGII.

ANEXO 6. PURIFICAÇÃO O DOS GENES DO MLST

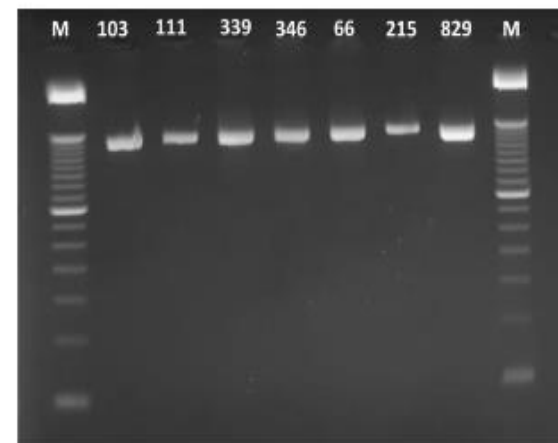
1) CAP59



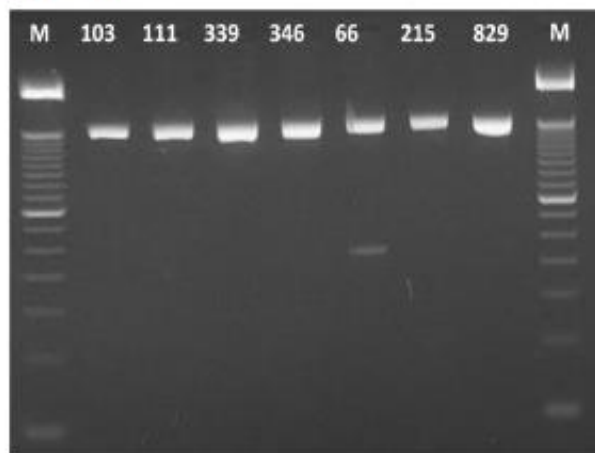
3) GPD1



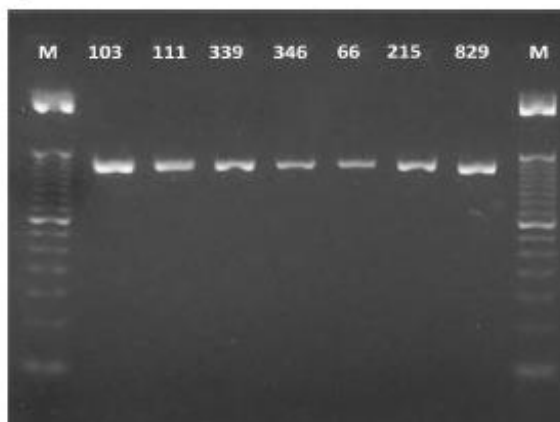
5) LAC1



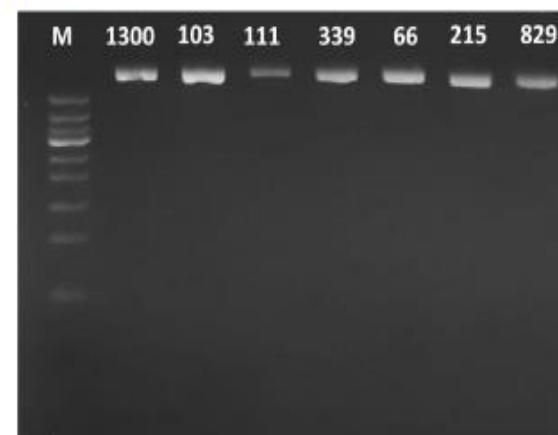
2) SOD1CG



4) PBL1



6) IGS1



7) URA5

