

ÉRICA OLIVEIRA DIAS BRITO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

SUSCEPTIBILIDADE FRENTE A DROGAS
ANTIFÚNGICAS DE AMOSTRAS DE *Cryptococcus*
neoformans DE ORIGEM AMBIENTAL E CLÍNICA,
ISOLADAS NO ESTADO DE MINAS GERAIS

UFMG
2006

ÉRICA OLIVEIRA DIAS BRITO

**Susceptibilidade frente a drogas antifúngicas de amostras de
Cryptococcus neoformans de origem ambiental e clínica, isoladas no
estado de Minas Gerais**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Microbiologia do Instituto de
Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Minas
Gerais, como requisito final
para obtenção do grau de
Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida de Resende Stoianoff

**Belo Horizonte
Instituto de Ciências Biológicas da UFMG
2006**

Dedico esta conquista à minha família...

*Meu marido Fabrício, pelo incentivo, apoio irrestrito, suporte emocional, mas
principalmente por seu amor...*

*Meus filhos Gustavo, Felipe e Lucas, por me encherem de entusiasmo e felicidade e por
darem, mesmo que inocentemente, o maior sentido à minha vida...*

*Meus pais, Osvaldo e Maria do Carmo, pelo exemplo de dedicação e humanismo e pelo
apoio incondicional em todos os momentos...*

*Geralda, que me foi presenteada por Deus, para fazer parte da família, através do seu
amor e dedicação, especialmente aos meus filhos...*

Que Deus esteja sempre com vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus, que está sempre ao meu lado, conduzindo meus caminhos e iluminando minha vida... Em Ti sempre depusitei todos os sentimentos... ansiedades, angústias, tristezas, dificuldades... Mas também as muitas alegrias, a enorme fé, a paz interior, a busca do equilíbrio, a serenidade, a compreensão, a compaixão, o amor... e hoje deposito mais esta conquista! Obrigada por me permitir este momento...

À Professora Doutora Maria Aparecida de Resende, a quem carinhosamente chamo Cida, minha grande orientadora! Agradeço, verdadeiramente, por tudo que você tem feito por mim! Obrigada pela oportunidade do ingresso ao laboratório e à Pós-Graduação, pela liberdade de escolha em vários momentos deste trabalho, pelo apoio, incentivo e condições de trabalho! Enfim, obrigada por me conduzir nesta conquista! Que Deus te abençoe!

Fabrizio, jamais poderia deixar de agradecer-lo por todo apoio e dedicação... Sem dúvida nenhuma, é aí que encontro meu porto seguro, em você e em nossa família. Por isto te agradeço! Tenha certeza que só estou conquistando meus objetivos, da forma que tem sido, por ter você ao meu lado... Te amo!

Gustavo, Felipe e Lucas, meus três filhos... Quem diria, em tão pouco tempo vocês entraram em minha vida, cada um com seu jeitinho... a energia do Gustavo, o carinho do Felipe a alegria do Lucas... hoje, não consigo imaginar minha vida antes de vocês... Obrigada por me trazerem a alegria e a força de vontade para vencer.

Pai e Mãe, obrigada por tudo aquilo que você sempre fizeram, fazem e sei que irão fazer em minha vida! Por toda base moral, por toda a estrutura humana, por todo amor dedicado aos filhos e netos. Obrigada pelo incentivo em todos os momentos da minha vida! Amo vocês!

Geralda, como é difícil agradecer tudo que você tem feito por mim... Mas vou tentar... Obrigada por sua tranquilidade e discernimento diante dos momentos difíceis, por sua presença nos momentos felizes, por sua atenção e bondade, por sua grande amizade, mas principalmente pelo amor dedicado aos afilhados Felipe, Gustavo, Lucas Fabrizio e Érica.

Meu irmão, André, a você, simplesmente pelo exemplo de inteligência! Amo você e sua família!

Marta Cabral, obrigada pelo exemplo de profissionalismo e força de vontade. Obrigada, ainda, por fazer parte da minha vida e compartilhar comigo momentos tão importantes.

Nilcéia, obrigada por fazer parte da minha vida e pelo seu grande carinho.

Aos amigos, Cris, Consola, Jana, Vavá, Margô e Paulinho, pela amizade.

Leandra, você não tem idéia o quanto foi importante conhecê-la neste momento da vida! Obrigada pelo incentivo, do início ao fim, pelo seu exemplo de dedicação, por sua meiguice e delicadeza, mas principalmente por seu grande carinho e amizade...Desejo, do fundo do meu coração, todo sucesso em sua vida...

Meus grandes amigos do laboratório:

Marcilene: “Tô doida!” “E os breguetes?” Que saudades das risadas! Obrigada por toda dedicação e desprendimento nos momentos que passamos juntas. Permita-me uma coisa, gostaria muito de dividir o mérito deste trabalho com você. Se não fosse sua ajuda não teria sido desta forma. Saiba que devo a você uma parte da tranquilidade e alegria que o Lucas tem. Eu explico! Você colaborou muitíssimo para minha tranquilidade, durante a gravidez; além de me ajudar muito, agiu como se fosse seu trabalho e sua responsabilidade. Obrigada! A conquista é nossa! Desejo a você toda felicidade, paz e sucesso!

Susana, obrigada por ter vindo de longe para fazer parte desta caminhada. Você, a quem fui aos poucos conhecendo, me trouxe muita alegria durante este período que convivemos. Obrigada por seu exemplo de dedicação; pela ajuda técnica e por todas as outras... nos inúmeros momentos que passamos; pelas aulas de natação; mas em especial, agradeço-te a grande amizade e o enorme carinho. Seja feliz!

Francis, não sei como posso te agradecer por tudo que passamos juntas... Os momentos que vivemos definem as pessoas que conhecemos e nos relacionamos. Fico muito feliz em pensar que Deus nos colocou juntas nesta etapa da vida. Este período foi muito importante para perceber que há em você uma maturidade e uma força de vontade que me enchem de orgulho... Não quero só te agradecer, gostaria também de parabenizá-la pela pessoa que é... Obrigada por todo seu apoio, moral e “braçal, aqui em Belo Horizonte e, de forma muito especial, pelo que fez por mim em Jiuz de Fora! Obrigada por sua amizade!”.

Juliana, quando penso em você lembro-me de uma frase que usei várias vezes para referi-la: A Jú é demais! Você é um exemplo de delicadeza, atenção, desprendimento, dedicação no trabalho, dedicação aos outros, inteligência, lealdade, idoneidade, e por aí vai... Você é uma gracinha! Obrigada por TUDO que você fez para mim!

Hyllo, as dificuldades tornam-se mais amenas quando estamos juntos de pessoas descontraídas e entusiasmadas como você. Obrigada pela convivência e pelos momentos de ajuda em meu trabalho. Que Deus te abençoe!

Verônica, Rodrigo, Leonardo, obrigada por toda a ajuda prestada e pelos muitos momentos de descontração. Muito sucesso para vocês!

Cleide, Gisele e Daniel, gostei muito de tê-las conhecido! Boa sorte na vida! (Dani, obrigada pelo inglês...).

Valda, obrigada pelas risadas e pelos momentos felizes que passamos juntas. De forma especial obrigada pelo que você fez por mim nestes últimos dias... Parabéns pelo seu desprendimento, dedicação e caráter. Muitas felicidades para você, Laura (minha norinha!) e Maurício...

Cristina, fiquei muito feliz em tê-la conhecido. Obrigada pelos momentos que compartilhamos!

Walkíria, obrigada por todo apoio e alegria que vivemos neste período!

Rosângela, você veio de Juiz de Fora só para que eu tivesse a oportunidade de conhecer um grande exemplo de evolução da alma humana! Obrigada por você existir.

Conceição e Sirley, obrigada pelo exemplo de trabalho e dedicação aos outros. Adorei conhecê-las!

Ao Professor Murilo e a equipe envolvida da Universidade Federal de Juiz de Fora, por terem cedido os isolados de *C. neoformans*, o que permitiu a execução deste trabalho.

Ao Marcos Gontijo e toda a equipe do laboratório de Microbiologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, por terem, gentilmente, cedido os isolados de *C. neoformans* o que permitiu a execução deste trabalho.

Á Professora Doutora Júnia Hamdan, obrigada por todo o apoio e conhecimento transmitido neste período.

Á Professora Doutora Erna Geessien Kroon, obrigada pelo exemplo de dedicação e caráter na condução da nossa Pós-Graduação e também pelas oportunidades concedidas.

Á Mbiolog Diagnósticos, obrigada por toda a ajuda prestada, direta ou indiretamente.

Rafael, Geraldo, Fábio, Raquel, Zé Antônio, Henrique, Bete, Daniel, Betânia, Lidiane, Eduardo, Bernardo obrigada pelos momentos de descontração e por todo a ajuda que vocês me deram!

Jaqueline agradeço muito por ter confiado em mim! Você tem grande responsabilidade por esta conquista. Seja feliz!

Aos Professores Doutores Sandra Carvalho (Departamento de Química da UFMG) e Tasso Moraes (Faculdade de Farmácia de UFMG), meus orientadores de Iniciação Científica, obrigada por terem sido os primeiros exemplos de profissionais “apaixonados” pela pesquisa científica e por terem me iniciado nesta vida.

Á Professora Doutora Raquel Vilela, por ter me apresentado os caminhos da Microbiologia e principalmente por ter me aberto as portas nesta caminhada.

Aos colegas do Mestrado em Microbiologia, por todos os momentos compartilhados! Vocês foram demais! Não vou citar nomes para não esquecer ninguém...

À Cristina, por toda atenção e delicadeza dispensada a mim e aos colegas da Pós-graduação em Microbiologia.

À Andréia, por todo apoio que você me prestou no laboratório da Pós-Graduação.

Aos professores da Pós- Graduação em Microbiologia, por todo conhecimento transmitido e pelos exemplos de profissionalismo.

À Professora Márcia Melhem, por ter sido tão gentil em transmitir informações, mesmo sem me conhecer, e por ter aceitado o convite para compor a bancada de avaliação deste trabalho.

Ao Dr. Geraldo Magela, por toda a atenção na avaliação do projeto inicial deste trabalho e por ter aceitado o convite para compor a bancada de avaliação deste trabalho.

Aos funcionários do ICB, por todos os serviços prestados.

Ao CNPQ que financiou este trabalho.

A todos, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Ninguém é capaz de realizar seus sonhos por si só...
Ninguém é capaz de viver sozinho!

Que Deus abençoe a todos!

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	18
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	21
2.1	Breve histórico.....	21
2.2	Taxonomia.....	22
2.3	Fisiologia.....	24
2.4	Ecologia e Epidemiologia.....	25
2.5	Patogênese e Fatores de Virulência.....	28
2.6	Manifestações clínicas.....	32
2.7	Diagnóstico laboratorial.....	34
2.8	Tratamento.....	37
2.9	Teste de susceptibilidade.....	42
3	OBJETIVOS.....	45
3.1	Objetivo geral.....	45
3.2	Objetivos específicos.....	45
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	46
4.1	Obtenção de isolados ambientais.....	46
4.1.1	Amostras ambientais.....	46
4.1.2	Isolamento.....	47
4.2	Obtenção de isolados clínicos.....	48
4.2.1	Aquisição.....	48

4.2.2	Critério de seleção.....	48
4.2.3	Análise do perfil dos pacientes.....	48
4.3	Identificação dos isolados ambientais e clínicos.....	49
4.4	Amostras padronizadas.....	50
4.5	Manutenção dos isolados.....	50
4.6	Determinação das espécies.....	51
4.7	Determinação da concentração inibitória mínima.....	52
4.7.1	Método do CLSI (2005), documento M27-A2.....	52
4.7.2	Método do E-teste (AB-Biodisk, Solna, Suécia)	55
4.8	Avaliação do perfil de susceptibilidade.....	56
4.9	Análise estatística.....	57
5	RESULTADOS.....	58
5.1	Isolados ambientais.....	58
5.2	Isolados clínicos.....	61
5.3	Descrição do perfil dos pacientes.....	63
5.4	Identificação das espécies.....	64
5.5	Determinação da concentração inibitória mínima.....	65
5.5.1	Método do CLSI (2005), documento M27-A2, 2002.....	65
5.5.2	Método do E-Test (AB-Biodisk)	65
5.5.3	Interpretação dos valores de CIMs.....	73
5.6	Análise estatística.....	79

6	DISCUSSÃO.....	83
7	CONCLUSÕES.....	92
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94
	ANEXOS.....	107
	Anexo 1.....	108
	Anexo 2.....	110

LISTA DE TABELAS

-  **Tabela 1:** Interpretação das CIM segundo CLSI (2005), documento M27-A2, 2002.
-  **Tabela 2:** Caracterização das amostras ambientais obtidas para isolamento de *C. neoformans*
-  **Tabela 3:** Caracterização dos isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans*
-  **Tabela 4:** Valores das CIMs ($\mu\text{g/mL}$) dos isolados clínicos e ambientais de *Cryptococcus neoformans* e amostras ATCC frente a anfotericina B pelas metodologias do CLSI e E-Test
-  **Tabela 5:** Valores das CIMs ($\mu\text{g/mL}$) dos isolados clínicos e ambientais de *Cryptococcus neoformans* e amostras ATCC frente a 5-flucitosina pelas metodologias do CLSI e E-Test
-  **Tabela 6:** Valores das CIMs ($\mu\text{g/mL}$) dos isolados clínicos e ambientais de *Cryptococcus neoformans* e amostras ATCC frente ao fluconazol pelas metodologias do CLSI e E-Test
-  **Tabela 7:** Valores das CIMs ($\mu\text{g/mL}$) dos isolados clínicos e ambientais de *Cryptococcus neoformans* e amostras ATCC frente ao itraconazol pelas metodologias do CLSI e E-Test
-  **Tabela 8:** Valores das CIMs ($\mu\text{g/mL}$) dos isolados clínicos e ambientais de *Cryptococcus neoformans* e amostras ATCC frente ao voriconazol pela metodologia do CLSI, documento M27-A2
-  **Tabela 9:** Valores das CIMs ($\mu\text{g/mL}$) dos isolados clínicos e ambientais de *Cryptococcus neoformans* e amostras ATCC frente a terbinafina pela metodologia do CLSI
-  **Tabela 10:** Interpretação da susceptibilidade *in vitro*, em quantidade e porcentagem, dos isolados ambientais e clínicos de *Cryptococcus neoformans* frente às drogas anfotericina B, 5-flucitosina e fluconazol, segundo as metodologias do CLSI e E-test
-  **Tabela 11:** Interpretação da susceptibilidade *in vitro*, em quantidade e porcentagem, dos isolados ambientais e clínicos de *Cryptococcus neoformans* frente às drogas itraconazol, voriconazol e terbinafina, segundo as metodologias do CLSI e E-test
-  **Tabela 12:** Valores das CIMs ($\mu\text{g/mL}$) capazes de inibir 50% e 90% do crescimento dos isolados ambientais e clínicos de *Cryptococcus neoformans*

frente às drogas antifúngicas anfotericina B, 5-flucitosina e fluconazol de acordo com as metodologias do CLSI e E-Test.

 **Tabela 13:** Valores das CIMs ($\mu\text{g/mL}$) capazes de inibir 50% e 90% dos crescimentos dos isolados ambientais e clínicos de *Cryptococcus neoformans* frente às drogas antifúngicas itraconazol, voriconazol e terbinafina de acordo com as metodologias do CLSI e E-Test

LISTA DE FIGURAS

-  **Figura 1:** Exame micológico direto de líquido, evidenciando a cápsula de *Cryptococcus neoformans*, utilizando tinta Nanquim (A) e branco de calcofluor (B)
-  **Figura 2:** Placa de microtitulação de acrílico com 96 poços
-  **Figura 3:** Halo de inibição do crescimento de *C. neoformans* com agente antifúngico
-  **Figura 4:** Locais de coletas das amostras ambientais no campus da UFMG, (A) Instituto de Ciências Biológicas, (B) Biblioteca Central, (C) madeira em decomposição, (D) oco de árvore
-  **Figura 5:** Ágar Níger: Plantio primário das amostras ambientais evidenciando colônias com pigmento marrom características de *Cryptococcus neoformans* (A e B)
-  **Figura 6:** Identificação dos isolados de *Cryptococcus neoformans*: evidência da levedura encapsulada pelo exame direto com tinta Nanquim (A) e prova de utilização da uréia em meio Christensen.
-  **Figura 7:** Placa de microtitulação com teste de susceptibilidade do *C. neoformans* frente ao itraconazol, após incubação de 72 horas a 35°C
-  **Figura 8:** Construção do gráfico *Boxplot*
-  **Figura 9:** *Boxplot* das CIMs dos isolados de *Cryptococcus neoformans*, comparando os intervalos de leitura 48 e 72 horas
-  **Figura 10:** *Boxplot* das CIMs dos isolados de *Cryptococcus neoformans*, comparando as metodologias CLSI e E-test

LISTA DE ABREVIATURAS

- + $\mu\text{g/mL}$ = microgramas por mililitro
- + μL = microlitro
- + AFST = Antifungal Susceptibility Testing
- + AIDS = Acquired Immunodeficiency Syndrome
- + ATCC = American Type Culture Collection
- + C. = *Candida*
- + C. = *Cryptococcus*
- + CAP = nome do gen que codifica formação da cápsula do *C. neoformans*
- + CGB = L-canavanina-glicina-azul de bromotimol
- + CIM = concentração inibitória mínima
- + CIM_{50} = concentração inibitória mínima capaz de inibir 50% do crescimneto
- + CIM_{90} = concentração inibitória mínima capaz de inibir 90% do crescimneto
- + CLSI = Clinical and Laboratory Standards Institute
- + cm = centímetro
- + E. = *Eucalyptus*
- + et. al. = e colaboradores
- + EUCAST = European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
- + g = grama
- + g/L = grama por litro
- + GXM = glucuronoxilomanana.
- + h = hora
- + HAART - Highly Active Anti-Retroviral Therapy
- + HCl = ácido clorídrico
- + HEM = hemocultura
- + HIV = Human Immunodeficiency Virus
- + I = resistência intermediária
- + IL = interleucina
- + LCR = líquido cefalo-raquidiano
- + M = concentração molar

- ✚ mg = miligrama
- ✚ min = minuto
- ✚ mL = mililitro
- ✚ MOPS = ácido morfolinopropanossulfônico
- ✚ Na = sódio
- ✚ NCCLS = National Commitee for Clinical Laboratory Standards
- ✚ Nm = nanômetros
- ✚ P = índice de significância
- ✚ P-450 = citocromo presente na célula fúngica
- ✚ PCR = reação de polimerase em cadeia
- ✚ pH = potencial hidrogeniônico
- ✚ R = resistente
- ✚ RPMI-1640 = Meio Roswell Park Memorial Institute – 1640
- ✚ S = sensível
- ✚ S-DD = sensível dose dependente
- ✚ SOD = superóxido desmutase
- ✚ SNC = sistema nervoso central
- ✚ TCD₄ = células de defesa imunológica
- ✚ TCD₈ = célula de defesa imunológica
- ✚ TNF α = fator de necrose tumoral α
- ✚ UFC = unidade formadora de colônia
- ✚ Var. = variedade

RESUMO

Foram obtidos 48 isolados de *Cryptococcus neoformans* a partir de amostras clínicas e ambientais coletadas em Minas Gerais. Os isolados clínicos foram obtidos a partir de amostras de material clínico provenientes de pacientes do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais e do Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora e os ambientais de amostras diversas de excretas de aves, ocos de árvores e madeira em decomposição. As amostras ambientais foram isoladas em meio de Staib e aquelas provenientes de material clínico em Agar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol. A identificação dos microrganismos foi confirmada pela avaliação microscópica de presença da cápsula de polissacáride, utilização de uréia em meio de Christensen, assimilação de nitrato e prova da termotolerância a 35° C. A confirmação da espécie foi realizada utilizando o meio de Canavanina-Glicina-Azul de Bromotimol (CGB). Foram realizados testes de susceptibilidade *in vitro* frente às drogas antifúngicas anfotericina B, 5-flucitosina, fluconazol, itraconazol, voriconazol e terbinafina, segundo a técnica da microdiluição em meio líquido descrita pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), documento M27-A2 e o método do E-test. Em relação a esta ultima metodologia não foram determinadas as susceptibilidades frente às drogas antifúngicas voriconazol e terbinafina. A grande maioria dos isolados apresentaram-se sensíveis ou sensíveis-dose-dependentes e apenas um pequeno número apresentou-se resistente ou com resistência intermediária frente a todas as drogas antifúngicas estudadas. As leituras da concentração inibitória mínima (CIM) foram realizadas após 48 e 72 horas de incubação e não foram encontradas diferenças significativas entre estes intervalos, considerando as duas metodologias. Não houve diferenças significativas entre as duas metodologias utilizadas, podendo, ambas, serem empregadas na prática laboratorial com o objetivo de determinar a concentração inibitória mínima de *Cryptococcus neoformans*. Entretanto, deve-se considerar a relação custo-benefício, já que no método do E-test as tiras impregnadas com concentrações em gradientes de drogas antifúngicas possuem custo oneroso e no método da microdiluição em meio líquido, segundo o CLSI, existem os limites de aferição visual de cada indivíduo.

“ SUMMARY ”

For the accomplishment of this work, forty eight isolated of *Cryptococcus neoformans* were obtained starting from clinical and environmental samples collected in Minas Gerais. The clinical isolateds were obtained starting from patients of the Hospital das Clínicas of Federal University of Minas Gerais samples and of the Hospital Universitário of the Federal University of Juiz de Fora by the cultivation in Sabouraud agar. The environmental samples, starting, were obtained from several samples of you excrete of birds, hollow of trees and wood in decomposition. For the isolation, through the environmental samples, cultivation was accomplished in Staib media and in Sabouraud agar, for the clinical samples. The identification of the microorganisms was confirmed by the microscopic analysis of presence of the polysaccharide capsule, urea use in Christensen media, nitrate assimilation and thermotolerance test to 35° C. The variety determination was accomplished using the Canavanina-Glicina-Bromotimol blue (CGB) media. Susceptibility tests of *in vitro* using antifungal drugs amphotericin B, 5-flucitosine, fluconazole, itraconazole, voriconazole and terbinafine according to the methodology of the microdilution in liquid media of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2005), document M27-A2 and the method of the E-test (AB-Biodisk, Solna, Sweden). The susceptibility with to antifungal drugs voriconazole and terbinafine was not tested using this last methodology. The great majority of the isolated samples showed sensitive or sensitive dose dependent and just a small number was resistant or with intermediary resistance with all the antifungal drugs studied. The readings were accomplished after 48 and 72 hours of incubation and was not found significant differences among these intervals, considering the two methodologies. This study allowed to evidence that there were not significant differences among the two used methodologies, being able to, both, be used in laboratorial practice with the objective to determine the minimum inhibitory concentration of *Cryptococcus neoformans*. However, should be considered the relationship cost-benefit, since in the method of agar diffusion, the band impregnated with gradient concentrations of antifungal drugs possess onerous cost and in the method of the microdilution in liquid media, according to CLSI, there are limits of each individual visual interpretation.

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A criptococose é uma infecção oportunista causada por fungo leveduriforme capsulado pertencente ao gênero *Cryptococcus*, principalmente pelas espécies *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*. A criptococose é uma infecção subaguda ou crônica que pode envolver os pulmões, pele e outras partes do organismo, mas tem predileção pelo cérebro e meninges. A doença ocorre com maior frequência em pacientes imunocomprometidos como transplantados ou portadores de “doença de base” como neoplasias, diabetes, hemopatia grave e portadores de AIDS. Portanto, a criptococose é, fundamentalmente, uma micose oportunista. A via de entrada do patógeno no organismo hospedeiro se dá pela inalação de propágulos infecciosos e o microrganismo possui grande propensão à disseminação pela via hematogênica, com tropismo para cérebro e meninges. Sabe-se que, após a era dos transplantes e, no momento, com a epidemia de AIDS, sua frequência tem aumentado significativamente em todo o mundo e, de forma não menos alarmante, no Brasil.

Cryptococcus spp., agente da criptococose, apresenta duas espécies *C. neoformans* e *C. gattii*. Cada uma delas é classificada em sorotipos, a partir das diferenças na estrutura química do polissacarídeo capsular, que refletem diferenças antigênicas. O *C. neoformans* inclui os sorotipos AD e D que correspondem à variedade *grubii* e o sorotipo A, à var. *neoformans*. À espécie *C. gattii* corresponde os sorotipos B e C. As duas espécies também diferem quanto a sua fisiologia, epidemiologia, ecologia e genética. *C. neoformans* é considerado espécie cosmopolita, da mesma forma que a micose causada por esse fungo. Esta espécie relaciona-se a habitats de pombos em ambientes urbanos, bem como de outras aves, principalmente aquelas criadas em cativeiro em ambiente doméstico e há ainda relatos da sua ocorrência em ocos de árvores vivas. A espécie *C. gattii* tem seu habitat limitado a certas regiões tropicais e foi associada, inicialmente, a *Eucalyptus camaldulensis* e, posteriormente, a outras espécies de eucaliptos. Recentemente descobriu-se sua existência em madeira em decomposição e ocos de árvores tropicais. Apesar de serem encontrados em diversas fontes ambientais, são poucos os registros sobre sua ecologia no estado de Minas Gerais, onde há relatos da ocorrência de casos humanos da micose.

O *C. neoformans*, por ser ubíquo, é responsável por infecções e reinfecções exógenas com grande frequência, atingindo grande parte da população que vive nos centros urbanos. Entretanto, os casos clínicos são raros, demonstrando que esta espécie é principalmente oportunista. A criptococose ocasionada pelo *C. gatti*, em geral, está associada a indivíduos sem evidências de imunossupressão e esta espécie comporta-se, portanto, como patógeno primário relacionando-se a uma forma da doença de ocorrência endêmica e focal.

O tratamento clássico da criptococose é feito utilizando-se uma droga poliênica macrolídea, a anfotericina-B, associada ou não a outro antifúngico, como o derivado pirimidínico 5-flucitosina ou a algum medicamento da classe dos azólicos. Em geral a resistência às drogas poliênicas se dá por alterações na membrana plasmática que dificultam ou impedem a devida ligação destas às proteínas de ligação na superfície do microrganismo ocasionando, assim, diminuição de seu efeito. No caso dos derivados pirimidínicos, a resistência do fungo se dá pela perda ou mutação de enzimas associadas à conversão e incorporação de RNA. Já em relação aos azólicos, os principais mecanismos de aquisição de resistência ocorrem pelas alterações da parede celular, por redução da afinidade de ligação da enzima 14 α -demetilase ou uma inerente impermeabilidade da mesma, bem como o aumento do conteúdo de ergosterol. Associado à questão da resistência, outros fatores como toxicidade, teratogenicidade e interação medicamentosa interferem dificultando o tratamento da criptococose.

Tendo em vista a presença de leveduras do gênero *Cryptococcus* nas mais diversas fontes ambientais, a possibilidade de ampla disseminação, a exposição humana cotidiana e a escassez de dados a respeito do seu habitat em Minas Gerais, considera-se relevante a proposta de estudos epidemiológicos das espécies neste estado. Em consideração à gravidade da criptococose, o aumento significativo de sua ocorrência, as dificuldades inerentes ao tratamento, que em geral é empírico, o pouco conhecimento a respeito do perfil de resistência do *Cryptococcus* spp. aos agentes antifúngicos disponíveis até o momento, e que tais fatores foram raramente objeto de pesquisa em pacientes portadores da doença nos hospitais de Minas Gerais, percebe-se de grande

importância a determinação do perfil de sensibilidade a essas drogas. Baseado nas informações relatadas, espera-se que os resultados obtidos neste trabalho provenham informações importantes para futuros estudos e para proposições terapêuticas adequadas e exequíveis para o tratamento de pacientes com criptococose em nosso meio.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 BREVE HISTÓRICO

Cryptococcus neoformans foi primeiramente isolado de suco de pêssgo por Sanfelice (1894) na Itália. A partir de sua inoculação em animais e comprovação de sua patogenicidade, a levedura foi denominada de *Saccharomyces neoformans* em 1895. Paralelamente, na Alemanha, Busse e Buschke (1894), patologista e clínico, respectivamente, acompanharam, simultaneamente, o mesmo paciente que era portador de periosteíte crônica da tíbia. O agente foi isolado por Busse e inicialmente chamado de *Saccharomyces* sp., enquanto Buschke avaliou o mesmo caso e pensou se tratar de um coccidio (LACAZ et al., 2002).

Curtis (1896) isolou o fungo de lesão tumoral em humano e o denominou *Saccharomyces subcutaneus tumefaciens*. Vuillemin (1901) considerou mais adequado enquadrar esta levedura no gênero *Cryptococcus*, estabelecido anteriormente por Kützing (1833), já que não observou fermentação nem formação de ascósporos como estruturas de reprodução (LACAZ et al., 2002 e LAZÉRA et al., 2004).

Hansemann (1905) descreveu o primeiro caso humano de meningoencefalite, caracterizada pela presença de lesões císticas gelatinosas, nas quais era visualizada a levedura. A partir de então, vários casos semelhantes foram descritos e Stoddard e Cutler (1916), nos Estados Unidos, denominaram o agente de *Torula histolytica*, gerando, portanto, grande confusão taxonômica (KWON-CHUNG e BENNETT, 1992).

Benham (1935), revisando os gêneros *Saccharomyces*, *Cryptococcus* e *Torula*, concluiu que se tratava de um único gênero. Em 1950, esta autora propôs a designação *Cryptococcus neoformans* para o agente e o termo criptococose para a denominação da doença, iniciando nova fase de estudos em relação a este fungo (LAZÉRA et al., 2004).

Evans (1949) encontrou diferenças sorológicas entre isolados clínicos de *C. neoformans* e identificou os sorotipos A, B e C. Mais tarde, Vogel (1966) descreveu o sorotipo D em um isolado (KWON-CHUNG e BENNETT, 1992).

Emmons (1955) demonstrou a relação saprobiótica do *C. neoformans* com matéria orgânica rica em excretas de aves, principalmente fezes secas de pombos, ninhos e solos contaminados, constituindo habitat natural do fungo (LAZÉRA et al., 2004).

Staib (1962), utilizando extrato de fezes de aves em meios de cultura, observou que *C. neoformans* produzia colônias de coloração marrom com produção de melanina que, provavelmente, ocorria devido à presença das sementes de *Guizotia abyssinica* que estes pássaros utilizavam em sua alimentação (KWON-CHUNG e BENNETT, 1992).

O ciclo de vida completo do *C. neoformans* foi descrito por Kwon-Chung (1975). Esta autora observou que o fungo apresentava dois *mating types*, α e a, e que quando cruzados reproduziam a fase teleomorfa basidiomicética. Nesta fase o fungo foi classificado como sendo pertencente ao gênero *Filobasidiella* (KWON-CHUNG e BENNETT, 1992).

2.2 TAXONOMIA

Cryptococcus spp. é uma levedura basidiomicética encapsulada e a doença causada por tais leveduras é denominada criptococose. A infecção é causada comumente pelas duas espécies, *C. neoformans* e *C. gattii*. *C. neoformans* apresenta duas variedades, var. *neoformans* e var. *grubii*.

De acordo com Lacaz et al. (2002), *C. neoformans* está classificado segundo sua fase assexuada ou anamorfa e sexuada ou teleomorfa, conforme tabelas 1 e 2, respectivamente.

Quadro 1: Designação das categorias taxonômicas da fase assexuada do *Cryptococcus* spp.

CATEGORIA	DESIGNAÇÃO
Divisão	<i>Eumycota</i>
Filo	<i>Deuteromycotina</i>
Classe	<i>Blastomycetes</i>
Família	<i>Cryptococcaceae</i>
Gênero	<i>Cryptococcus</i>
Espécie	<i>Cryptococcus neoformans</i> e <i>Cryptococcus gattii</i>

*Extraído de : Lacaz et al., 2002

Quadro 2: Designação das categorias taxonômicas da fase sexuada do *Cryptococcus* spp.

CATEGORIA	DESIGNAÇÃO
Divisão	<i>Eumycota</i>
Filo	<i>Basidiomycotina</i>
Classe	<i>Teliomycetes</i>
Família	<i>Filobasidiaceae</i>
Gênero	<i>Filobasidiella</i>
Espécie	<i>Filobasidiella neoformans</i>

*Extraído de : Lacaz et al., 2002

Similaridades bioquímicas, morfológicas, epidemiológicas e genéticas classificavam *Cryptococcus neoformans* em quatro sorotipos e dois sorogrupos – A e D (variedade *neoformans*) e B e C (variedade *gattii*) (KWON-CHUNG e BENNETT, 1992 e MITCHELL et al., 1995). Estudos têm considerado incerta a relação entre a variedade e os sorotipos. Recentemente foi proposta a separação do sorotipo A como uma variedade diferente, a *grubii* que se apresentaria com características genéticas diferentes do sorotipo D (LACAZ, 2001; PAPPALARDO e MELHEM, 2003).

De acordo com Kwon-Chung et al. (2002), através de análise filogenética e molecular de isolados, tanto clínicos quanto ambientais de *C. neoformans*, as variedades se comportam como espécies distintas e diferenciadas, se caracterizando a variedade *neoformans* como espécie *C. neoformans* e a variedade *gattii* como espécie *C. gattii*.

Cryptococcus gatti foi aceito taxonomicamente e classificado como espécie somente em 2004 (SORREL, 2001; OLIVEIRA et al., 2004). Essa afirmação é

corroborada através da diversidade fenotípica, habitat natural do agente, eco-epidemiologia, manifestações clínicas, além da resposta à terapia antifúngica diferenciada (SORREL, 2001; OLIVEIRA et al., 2004).

2.3 – FISILOGIA

Cryptococcus neoformans é um fungo capsulado que causa a micose criptococose em pacientes imunossuprimidos, mas também pode acometer pacientes imunocompetentes. É um fungo basidiomicético encontrado em todo o mundo e pode fazer parte da microbiota normal humana em caráter transitório (BUCHANAN e MURPHY, 1998).

Segundo Kwon-Chung e Bennett (1992) *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* apresentam diferenças sorológicas, sendo identificados os sorotipos A, B, C, D e AD. Estes sorotipos se diferenciam através da composição antigênica da cápsula visualizada através da técnica de aglutinação em lâmina utilizando kits especiais (MITCHELL e PERFECT, 1995).

Kwon-Chung (1984) observou que as duas espécies apresentam características metabólicas, fisiológicas e epidemiológicas diferenciadas. A variedade *gattii* foi proposta em 1970, com base na morfologia atípica de uma amostra de *C. neoformans* isolada a partir de líquido cefalorraquidiano de um menino africano com meningite (CASADEVALL e PERFECT, 1998). Os basidiospóros da espécie *C. neoformans*, da forma teleomórfica, são esféricos, alongados ou cilíndricos, apresentando a parede ligeiramente rugosa, enquanto os da variedade *gattii* são baciliformes com parede lisa (KWON-CHUNG e BENNETT, 1992; LAZÉRA et al., 2004).

Mais de 90% das células leveduriformes possuem envoltório capsular de polissacarídeo constituído de carboidrato e uma glicuronoxilomanana, que pode ser produzido *in vivo* ou *in vitro*. As diferenças na estrutura da glicuronoxilomanana seriam responsáveis pelas diferenças antigênicas dos isolados de *C. neoformans* que resultam

na diferenciação dos sorotipos descritos anteriormente. (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992 e MITCHELL et al., 1995).

2.4 - ECOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA

A aquisição de fungo *C. neoformans* ocorre mediante a inalação de propágulos infecciosos que se encontram espalhados de forma cosmopolita e de acordo com a variedade do fungo. Esses propágulos infecciosos podem permanecer no trato respiratório ou na pele, de forma transitória ou, ocasionalmente, podem colonizar o hospedeiro. *C. neoformans* encontrado em habitats variados tem como fontes principais as fezes de aves, especialmente de pombos, bem como solo contaminado. É encontrado, ainda, em árvores, como eucaliptos e madeira em decomposição (KWON-CHUNG e BENNETT, 1992).

Cryptococcus neoformans apresenta reprodução sexuada e assexuada no seu ciclo de vida. Na reprodução sexuada ou forma teleomórfica é chamado *Filobasidiella neoformans*. Este tipo de reprodução se dá por heterotalismo, pelo sistema de *locus* e dois alelos a e α . Nos isolados heterotáticos a fase dicariótica ocorre por conjugação de duas células haplóides de sexualidade distinta (*mating-type*). Após plasmogamia, hifas dicarióticas apresentam caráter hialino e ramificações regulares com ligações em ansa a partir de conjugantes. Os basídios desenvolvem-se na porção terminal ou em ramificação lateral da hifa e são longos, delgados, hialinos e sem septos, com dilatação no ápice em forma de clava onde ocorre cariogamia. O núcleo zigótico origina, após meiose, quatro núcleos haplóides que, localizados em quatro sítios no ápice do basídio dividem-se mitoticamente e de maneira repetida para formarem, por brotamento, os basidiospóros ovalados, elípticos ou globosos, com parede levemente rugosa ou lisa, unicelulares, gerando quatro cadeias de até 20 basidiospóros cada, completando assim o ciclo sexual. Na fase assexuada ou anamorfa, quando é chamado de *C. neoformans*, apresenta-se como levedura haplóide, globosa ou ovalada, com 3 a 8 μ m de diâmetro, capsulado e reproduz-se por brotamento único ou múltiplo a partir de qualquer ponto da parede celular. Os blastoconídios podem permanecer unidos à célula-mãe por um colo

estrito. Em meios de cultivo apropriados apresentam-se como colônia de cor branca a creme, brilhante, de textura mucóide, margem lisa e inteira, com ausência de pseudo-hifa ou micélio, a temperatura de 25 ou 35° C (LAZÉRA et al., 2004).

C. neoformans tem sido isolado de várias fontes ambientais e sua presença está associada, em ambientes urbanos, com fezes acumuladas de aves, principalmente pombos. Outros relatos demonstram sua presença em ocos de árvores vivas. Isolados têm sido obtidos a partir de diversos tipos de solo, poeira domiciliar, outros animais e como colonizadores em seres humanos. A levedura encontra-se em baixas concentrações, em amostras oriundas de bico, pés e em swab retal de aves, em geral. É importante levar em consideração que a elevada temperatura interna destas aves, em torno de 42°C e a alta concentração de amônia em suas excretas são fatores inibitórios ao crescimento do fungo (SORRELL e ELLIS, 1997). Na década de noventa, no Brasil, estudos demonstraram a presença desta variedade em ocos de árvores (*Syzygium jambolana*, *Cassia grandis*, *Senna multijuga* e *Ficus microcarpa*) sugerindo sua relação com madeira em decomposição. Outros estudos buscaram o isolamento em ambientes domésticos e arredores habitados por pacientes portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), acometidos ou não por criptococose e observou-se que pacientes vivendo em ambientes contaminados pelo fungo estavam mais susceptíveis à aquisição da doença (PASSONI et al., 1998 e LAZERA et al., 2000).

C. gattii é relatado como próprio de habitats em regiões tropicais e subtropicais e tem sido estudado como patógeno emergente em criptococose humana e animal em regiões de clima temperado (KOHL et al., 1985 e BARTLETT et al., 2003). Este biótipo foi primeiramente isolado no sul da Austrália em amostras provenientes da espécie *Eucalyptus camaldulensis*. Posteriormente, foi também isolada a partir de demais espécies de eucaliptos, como *E. tereticornis*, *E. rudis*, *E. gomphocephala*. Recentemente descobriu-se, também, sua existência em madeira em decomposição e ocos de árvores tropicais. Associação entre a ocorrência desta espécie e o período de florescência do *E. camaldulensis* foi evidenciada nos países: Austrália, Brasil, Estados Unidos, México e Itália (SORREL e ELLIS, 1997; LAZERA et al., 2000).

Diferenças epidemiológicas entre as espécies *C. neoformans* e *C. gattii* foram demonstradas em 628 isolados clínicos provenientes de 97 laboratórios em todo o mundo. Neste estudo, 100% dos isolados da Áustria, Bélgica, Dinamarca, França, Alemanha, Holanda, Itália, Suécia e Japão pertenciam a antes denominada var *neoformans* hoje, *C. neoformans*. Mais de 85% dos isolados da Argentina, Canadá, Reino Unido e dos Estados Unidos (exceto o sul da Califórnia) pertenciam à espécie *C. neoformans* e o restante à *C. gattii*. No Brasil, Austrália, Cambódja, Hawaii, sul da Califórnia, México, Paraguai, Tailândia, Vietnã, Nepal e em países da África Central a prevalência de *C. gattii* variou entre 35 a 100%. Dentre todos os isolados estudados, 70% pertenciam ao sorotipo A. O sorotipo D foi encontrado na Europa numa porcentagem de 9% do total, sendo mais infrequente em outras regiões do mundo. Dentre os isolados pertencentes aos dois sorotipos da espécie *C. gattii*, o sorotipo B foi cinco vezes mais prevalente que o sorotipo C. A maioria dos isolados pertencentes ao sorotipo C eram provenientes do sul da Califórnia (KWON-CHUNG e BENNETT, 2002).

Em uma análise conjunta de 467 isolados clínicos de *C. neoformans* de diferentes regiões brasileiras observou-se que 78% pertenciam ao sorotipo A, 18% ao sorotipo B, 1,3% ao sorotipo AD, 1,5% ao sorotipo D, 0,2% ao sorotipo C e 1,5% se apresentaram como não-tipáveis. O sorotipo A predominou em indivíduos masculinos com AIDS em todo o Brasil, ficando concentrados nas Regiões Sul e Sudeste, enquanto o sorotipo B ocorreu com maior frequência no Nordeste e predominou em hospedeiros aparentemente normais, de maneira semelhante em ambos os sexos. Os sorotipos AD e D, que também foram associados à AIDS, ocorreram principalmente nas Regiões Sul e Sudeste. O sorotipo C foi identificado no Rio de Janeiro em paciente HIV-negativo com doença pulmonar obstrutiva crônica (NISHIKAWA et al., 2003).

As duas principais revisões brasileiras sobre criptococose foram publicadas entre os anos de 1941 e 1992 (OLIVEIRA NETTO et al., 1993) e outra entre 1960 a 1989, a primeira com 308 casos e a segunda com 171 (ROZEMBAUM e GONÇALVES, 1994). Esses autores analisaram principalmente aqueles casos descritos nas regiões Sul e Sudeste e observaram que nas duas últimas décadas predominou a associação da

criptococose com AIDS, em homens, com prevalência da espécie *C. neoformans*. A prevalência da doença chega a ser de 8 a 12% nos centros de referência da Região Sudeste. Já nas Regiões Norte e Nordeste o perfil epidemiológico da doença se modifica, pois a micose atinge principalmente nativos destas regiões, especialmente crianças e indivíduos jovens e as taxas de mortalidade e letalidade são relativamente elevadas (50 a 80% e 25 a 50%, respectivamente). Cavalcanti (1995), em estudo realizado no Meio Norte do país (Maranhão-Piauí), no período entre 1986 a 1995, observou que mais de 90% dos casos de criptococose em indivíduos aparentemente normais do ponto de vista imunológico são causados pela espécie *C. gattii* que é endêmica na região (LAZÉRA et al., 2004).

2.5 – PATOGÊNESE E FATORES DE VIRULÊNCIA

A patogênese do *C. neoformans* é determinada por três fatores: as defesas do hospedeiro, a virulência do microrganismo e o tamanho do inóculo. Considerando a grande exposição humana, devido à ubiquidade deste fungo na natureza, pode-se comprovar que o fator defesa do hospedeiro é determinante, já que é baixa a prevalência de infecções sintomáticas. Entretanto, pacientes aparentemente saudáveis podem vir a ter a criptococose dependendo da carga parasitária que inalarem. Tal situação poderá ocorrer também quando houver diferenças em relação à virulência do fungo. O *C. gattii* tem sido estudado com grande frequência, em relação aos seus fatores de virulência, já que esta é a espécie mais incidente em pacientes imunocompetentes (MITCHELL e PERFECT, 1995). Taylor et al. (2002) relataram o primeiro caso de criptococose por *C. gattii* em Singapura, ocorrida em paciente imunocompetente.

Baker et al. (1950), através do estudo de autopsias, relataram a existência de infecção primária pulmonar em indivíduos com e sem história de criptococose. Neste estudo, os autores estabeleceram similaridade entre a patogênese do *Cryptococcus* spp. e *Mycobacterium tuberculosis* em seu estágio inicial de infecção pulmonar devido à presença de infiltrado inflamatório neste órgão. *Cryptococcus* spp. é inicialmente inalado e chega aos pulmões atingindo o espaço alveolar e, em seguida, é englobado por

macrófagos. Evidências demonstram que o foco pulmonar pode permanecer latente e a implantação ou não da infecção dependerá inicialmente das defesas celulares do hospedeiro, bem como do número e virulência das partículas infectantes. A cápsula de manoproteína e outros componentes da levedura são capazes de modular a resposta do hospedeiro (MITCHELL e PERFECT, 1995; PERFECT e CASADEVALL, 2002).

Da mesma forma como ocorre em infecções fúngicas causadas por *Paracoccidioides brasiliensis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, no *C. neoformans* a adesão célula fúngica/célula hospedeira e célula fúngica/matriz extracelular exerce papel decisivo na infecção. A adesão ocorre devido à presença de moléculas como glicoesfingolipídeos contidas na parede celular ou cápsula da célula fúngica. Em células patogênicas, a lactosilceramida é a provável responsável pela adesão da célula leveduriforme à célula do hospedeiro (KUROKAWA et al, 1998; PERFECT e CASADEVAL, 2002).

Estudos sorológicos realizados em indivíduos com história de exposição ao fungo e com ou sem evidências de criptococose têm evidenciado que a prevalência da infecção causada por *Cryptococcus* spp. é relativamente alta, entretanto a doença pode ser considerada rara (PERFECT e CASADEVALL, 2002).

Cryptococcus spp. possui um polissacarídeo capsular de alto peso molecular constituído de manoproteína, galactosilomanana e glucuronoxilomanana (GXM). O GXM é o principal e maior polissacarídeo capsular sendo constituído por 1,3-D-manopironose, que é acetilada em sua porção terminal (6-o-acetil), β -D-xilopiranosil e por β -D-glucuronopiranosil (BHATTACHARJEE et al., 1992). A quantidade de o-acetilação do GXM é que definirá o sorotipo específico deste fungo (STEENBERGEN e CASADEVALL, 2003).

A cápsula tem sido demonstrada como um fator crítico para a virulência do *Cryptococcus* spp. por meio de estudos genéticos. Até o momento, quatro genes capsulares foram caracterizados: *CAP64*, *CAP60*, *CAP59* e *CAP10*. Diferenças significativas foram notadas em infecções pulmonares quando mutante acapsular foi

complementado com gene *CAP64*. Os isolados encapsulados produziram infecções que disseminaram para o cérebro mais rapidamente e induziram a uma resposta celular mais significativa como aumento de infiltrado de macrófagos e neutrófilos nos pulmões (STEENBERGEN e CASADEVALL, 2003).

Outra função da cápsula seria a inibição da ingestão de células leveduriformes por fagócitos. Para fagocitar, a célula fagocitária necessitaria reconhecer a parede celular do fungo pelas opsoninas. No caso do *Cryptococcus* spp., a cápsula teria a função de mascarar o reconhecimento pelos fagócitos. Neste ponto, outra questão deve ser considerada, o tamanho da cápsula. Leveduras contendo cápsulas maiores (4µm) serão mais dificilmente fagocitadas do que as que tiverem essas estruturas menores (2µm) ou forem acapsuladas (STEENBERGEN e CASADEVALL, 2003). Outras evidências demonstram que após a fagocitose, o polissacarídeo capsular se acumularia dentro de vesículas nos macrófagos promovendo efeitos citotóxicos, levando à morte destas células. Isto explicaria também a diminuição da migração leucocitária nos sítios inflamatórios, bem como nos pulmões (STEENBERGEN e CASADEVALL, 2003).

Uma característica, que diferencia isolados patogênicos de *Cryptococcus* spp. de outras espécies de *Cryptococcus* não-patogênicos, é a habilidade, em meios de culturas especiais como o meio de Staib, em produzir colônia com pigmentação marrom a negra (LACAZ et al. 2002) . Esta pigmentação, primeiramente descrita por Staib (1962), é consequência de um composto melanínico produzido por *Cryptococcus* spp. devido à presença da enzima lacase, a difenoloxidase, que é capaz de polimerizar compostos difenólicos (BUCHANAN e MURPHY, 1998). Hernández et al. (2003), em Cuba, estudando 86 isolados de *C. neoformans*, quanto à tonalidade das colônias devido à produção de melanina em meio extrato de semente de girassol, observaram que 54,7 % dos isolados apresentaram colônias com pigmento marrom intenso, 5,8% com pigmentação marrom clara e 37,2% coloração intermediária entre as duas descritas. Apenas dois isolados apresentaram colônias com coloração esverdeada. Este é um importante critério para comparar a atividade da enzima fenoloxidase neste microrganismo.

A melanina encontra-se na parede celular do *Cryptococcus* spp. e contribui para sobrevivência do fungo por manter a integridade deste envoltório. Em geral, são macromoléculas formadas por polimerização oxidativa de compostos indólicos ou fenólicos, são hidrofóbicas e carregadas negativamente. No *C. neoformans* vários tipos de melaninas fúngicas têm sido identificadas e as duas mais importantes, a DHN-melanina e a DOPA-melanina, vêm sendo correlacionadas diretamente à patogênese da doença (LANGFELDER et al., 2003). Este composto é um radical livre, estável, insolúvel em solventes fisiológicos e resistente à degradação ácida. A levedura do gênero *Cryptococcus* é capaz de sintetizar melanina a partir de catecolaminas como L-DOPA, dopamina, norepinefrina e epinefrina, o que comprova sua virulência para hospedeiros humanos (STEENBERGEN e CASADEVALL, 2003). A produção de melanina é uma característica importante para a sobrevivência do *Cryptococcus* spp. no ambiente, pois estes fungos são também capazes de utilizar compostos difenólicos na natureza para conversão em compostos intermediários e subsequentemente produzir esta substância. Todavia, estes microrganismos não produzem melanina a partir de catecolaminas do solo, sugerindo não ser esta a via preferencial para produção deste composto (BUCHANAN e MURPHY, 1998).

A capacidade de produzir manitol pelo *Cryptococcus* spp. contribui para a sobrevivência deste no hospedeiro. Experiências têm demonstrado que altas concentrações de manitol no sistema nervoso central contribuiriam para formação de edema cerebral e este é um precursor para radicais hidroxila, o que levaria a proteção dos microrganismos contra descargas oxidativas e, com isto, aumentaria a resistência ao estresse do hospedeiro (BUCHANAN e MURPHY, 1998).

A produção de superóxido desmutase (SOD) pelo *Cryptococcus* spp. a 37° C é capaz de compensar possíveis decréscimos de produção de melanina a esta temperatura. Estudos têm demonstrado que as fosfolipases produzidas por fungos seriam capazes de romper a membrana das células de mamíferos. Proteases, por sua vez, digeririam proteínas plasmáticas humanas como caseína. Este fator seria importante para o mecanismo de iniciação da invasão tecidual deste microrganismo no hospedeiro (BUCHANAN e MURPHY, 1998).

A urease hidrolisa uréia em amônia e carbamato, resultando em elevação do pH. Esta capacidade, além de ser utilizada como característica importante, que auxilia na identificação de *Cryptococcus* spp., já que a maioria dos isolados são capazes de produzir esta enzima, pode ser também considerada como fator de virulência (STEENBERGEN e CASADEVALL, 2003).

Proteinases têm sido demonstradas como importante fator de virulência, tanto em fungos quanto em bactérias. Tanto isolados ambientais quanto clínicos de *Cryptococcus* spp. demonstraram atividade de proteinases. Esta atividade demonstra capacidade em degradar colágeno, elastina, fibrinogênio, imunoglobulinas e fatores do complemento. Proteinases criptocócicas podem provocar lesão tecidual, a qual fornece nutrientes para o patógeno e proteção contra a resposta imune do hospedeiro (STEENBERGEN e CASADEVALL, 2003).

2.6 – MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A criptococose é uma doença grave que acomete primordialmente pacientes imunocomprometidos, especialmente pacientes com AIDS. Portanto, trata-se de uma doença basicamente oportunista, de distribuição mundial, assim como o patógenos *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*, seus agentes. Importante agente de infecção fatal, microrganismos do gênero *Cryptococcus* ocorrem em 5 a 10 % dos pacientes com AIDS no mundo todo e causa meningoencefalite fatal em hospedeiros normais nas áreas tropicais e subtropicais, sendo considerado o mais importante agente etiológico de meningite fúngica em pacientes imunossuprimidos (AMANUEL e JEMANEH, 2002; CASALI et al., 2003).

Cryptococcus spp. infecta os pulmões mas pode se disseminar para a pele, próstata e ossos; entretanto, possui predileção pelo sistema nervoso central (MITCHELL e PERFECT, 1995). As manifestações clínicas da criptococose apresentam aspectos variados podendo ocorrer lesões tegumentares de tipos dermatológicos diferentes e lesões viscerais, sendo as meningoencefálicas as mais comuns. As lesões pulmonares podem ser secundárias ou primárias e, neste caso, o

quadro clínico pode se assemelhar a um quadro gripal ou até mesmo ao de tuberculose. Nos casos em que ocorrem lesões mistas, um grande número de órgãos fica comprometido como pele, mucosas, gânglios, meninges, articulações, pulmões e órgãos genitais (LACAZ et al., 2002).

A criptococose pode ser classificada em três formas clínicas: pulmonar regressiva, pulmonar progressiva e disseminada. A forma pulmonar regressiva é de difícil diagnóstico, pois as lesões pulmonares primárias, por vezes, passam despercebidas. A criptococose pulmonar progressiva corresponde a cerca de 10% dos casos clínicos. Esta forma apresenta lesões císticas pulmonares contendo densa massa de células fúngicas, além de pouca reação inflamatória do parênquima, com sintomatologia inespecífica e escassa, podendo ocorrer tosse, escarro mucóide e dor torácica pleurítica. O achado radiológico indica nódulo, em geral de mais de 3 cm de diâmetro, periférico e, na maioria das vezes, único, ocorrendo nos lóbulos inferiores. Esses nódulos raramente calcificam. Na criptococose disseminada, que corresponde a cerca de 90% dos casos clínicos, ocorre disseminação hematogênica do agente que atinge qualquer órgão ou sistema, porém com particular tropismo pelo sistema nervoso central. A manifestação mais frequente de disseminação é a meningoencefalite subaguda ou crônica. Lesões hematogênicas osteoarticulares ocorrem em cerca de 5% dos casos. Podem ser acometidos os rins, supra-renais e próstata e lesões cutâneas são observadas em 10% dos casos (SILVA et al. 2003; LAZÉRA et al., 2004).

Após a era dos transplantes e, no momento, com a epidemia de AIDS, a frequência de criptococose tem aumentado de maneira significativa. Alguns aspectos da criptococose foram drasticamente alterados com o início da AIDS e, mais recentemente, também pelo tratamento dos pacientes com o coquetel antiretroviral, ou seja a HAART (Highly Active Anti-Retroviral Therapy) (LACAZ et al., 2002; PAPPALARDO e MELHEM, 2003).

Isolados de *Cryptococcus* spp. provenientes de pacientes com AIDS apresentaram envoltório capsular pequeno, apesar destes indivíduos possuírem altos títulos de antígenos capsulares em seu soro. Tal observação daria suporte à afirmação

sobre a teoria de que, em grupos de pacientes com AIDS este fungo se apresentaria de forma diferente do que em outros grupos (MITCHELL e PERFECT, 1995).

As manifestações clínicas da criptococose em pacientes com AIDS geralmente se dão por febre e cefaléia, mal-estar e vômitos, podendo ocorrer em 7 a 8 % dos pacientes lesões cutâneas, simulando molusco contagioso (LACAZ et al., 2002). Podem ocorrer também náuseas e dispnéia sendo que os sintomas pulmonares se devem a outras manifestações clínicas, como por exemplo, pneumonia por *Pneumocystis carinii*. Apenas uma pequena porcentagem chega a apresentar sintomas de meningite como pescoço rígido, fotofobia ou visão dupla. Usualmente podem ocorrer sintomas orais, linfadenopatia difusa e perda de peso. Em 12 a 18% observa-se sonolência e confusão (KOWN-CHUN e BENNETT, 1992).

Em indivíduos imunocompetentes as células TCD₄ e TCD₈ são responsáveis pela restrição da disseminação do *C. neoformans*, o que não ocorre em pacientes com AIDS. Nestes pacientes os níveis de CD₄ estão em níveis baixos e, quando abaixo de 200 mm³ ocorre diminuição da capacidade de barrar possíveis disseminações. Estes monócitos são considerados marcadores de imunidade nestes pacientes (KWON-CHUNG e BENNETT, 1992; MITCHELL e PERFECT, 1995).

2.7 - DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

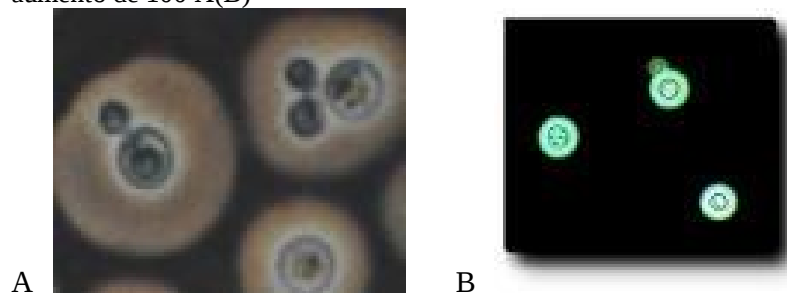
O diagnóstico é imediato mediante o exame microscópico direto do líquido céfalo-raquidiano com tinta Nanquim em 80% dos pacientes infectados com AIDS e em 50% de pacientes não-portadores de AIDS, devido à visualização de cápsula. Em materiais nobres como líquido, o achado das células leveduriformes capsuladas define o diagnóstico de criptococose. Materiais a partir de biópsias também podem ser analisados por anatomia patológica, com colorações específicas como mucicarmim de Meyer, que evidencia a cápsula em vermelho ou pelo PAS ou, ainda, impregnação pela prata, pelo método de Gomori-Grocott, que evidencia a parede celular das leveduras, apesar de não demonstrar a cápsula. A coloração de Fontana Masson pode ser utilizada

para evidenciar o depósito de melanina na parede do fungo, enquanto a hematoxilina-eosina pode ser útil em rotina para avaliação do padrão das lesões e evidenciar a cápsula do fungo (LACAZ et al., 2002; LAZÉRA et al., 2004; PERFECT e CASADEVALL, 2002).

Após realização de exame microscópico do líquido deve ser realizado o cultivo para o *Cryptococcus* spp. em ágar Sabouraud dextrose, que deve estar isento de actidione (cicloheximida), já que este gênero é inibido por esta substância. O isolamento do fungo pode ser realizado também no ágar extrato de malte. Em ambos os meios a levedura cresce e produz colônias de coloração creme com aspecto brilhante, viscoso e úmido, após cerca de três a sete dias de incubação. Após cerca de um mês as colônias mucosas fluem na superfície e, quando cultivadas em tubo, acumulam-se no fundo. A temperatura de incubação deste fungo poderá variar entre 25 a 37° C sendo esta característica muito importante, uma vez que outras espécies do gênero *Cryptococcus* não crescem a 37°C (FISHER e COOK, 2001; LAZÉRA et al., 2004).

O uso de preparações com tinta Nanquim (tinta da China) em exames diretos para visualização das células leveduriformes, com evidência da cápsula e a realização de cultura do fungo são, hoje, as metodologias mais empregadas para o diagnóstico de infecção criptocócica (LACAZ et al., 2002).

Figura 1: Exame micológico direto de líquido, evidenciando a cápsula de *Cryptococcus neoformans*, utilizando tinta Nanquim, aumento de 400 X (A) e branco de calcofluor, aumento de 100 X(B)



*Extraído de : Lacaz et al., 2002

Todas as espécies de *Cryptococcus* são não-fermentadoras e produzem a enzima urease. Entretanto, *C. neoformans* e *C. gatii* são dos poucos capazes de crescer a 37°C e

produzir uma fenoloxidase. Um meio de cultura contendo extrato aquoso de sementes de níger (*Guizotia abyssinica*), também chamado ágar níger ou meio de Staib (STAIB, 1962) permite o crescimento de colônias com coloração marrom devido à presença da fenoloxidase, enquanto outras leveduras crescem mas não apresentam esta coloração (LACAZ et al., 2002). Este meio é preparado utilizando em sua composição, além do extrato de sementes de níger e glicose, o cloranfenicol e a gentamicina para inibição de bactérias e solução de difenil, que funcionará como indicador (MUSSA et al., 2000; PERFECT e CASADEVALL, 2002).

Para distinção entre as espécies *C. neoformans* e *C. gattii*, pode-se utilizar o meio de CGB, constituído por canavanina, glicina e o indicador azul de bromotimol. Neste meio, *C. gattii* cresce normalmente, já que é resistente à canavanina e é capaz de utilizar a glicina como única fonte de nitrogênio e carbono e, desta forma, produz amônia, elevando o pH, o que modifica a coloração do meio para azul-cobalto, devido à presença do azul de bromotimol. *C. neoformans* não cresce neste meio, pois é naturalmente sensível à canavanina. A assimilação de D-prolina também poderá ser utilizada, com o mesmo objetivo, apesar de sua menor sensibilidade, conforme observado por Nishikawa (1995), ao analisar 37 isolados de *C. gattii* e 193 de *C. neoformans* e comparar estes dois testes. Dentre os isolados de *C. gattii*, 1% deles correspondeu a resultado falso-negativo (LACAZ et al., 2002; LAZÉRA et al., 2004).

Os testes sorológicos utilizados para detecção de polissacarídeo capsular e no diagnóstico de infecções criptocócicas invasivas são bastante específicos e sensíveis ($\geq 90\%$). O método mais comumente usado para detecção do antígeno é o teste de aglutinação em látex, e, ocasionalmente, métodos imunoenzimáticos também são utilizados. Resultados falso-positivos podem ser encontrados devido a reação cruzada em decorrência de polissacarídeo capsular de *Trichosporon beigelii* ou de fator reumatóide. Este último interferente poderá ser bastante reduzido por meio de tratamento adequado do espécime clínico. Resultados falso-negativos poderão ocorrer também, raramente devido à presença de imunocomplexos, efeito prozona ou altos títulos, ou ainda por isolados com pequeno diâmetro capsular. Antígenos de *Cryptococcus* spp. podem não ser detectados durante a infecção ativa,

devido a seus baixos níveis, porém com a melhora clínica, os níveis antigênicos vão se tornando detectáveis. Desta forma, não são utilizados para fins diagnósticos ou para decisão terapêutica (PERFECT e CASADEVALL, 2002).

2.8 - TRATAMENTO

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

A emergência maciça de doenças fúngicas associadas com a AIDS, na década de oitenta, e a frequência aumentada de micoses fatais associada com o uso aumentado de terapias médicas imunossupressivas, desde 1970, estimularam os estudos dirigidos para a descoberta de novos agentes antifúngicos. Os resultados podem ser vistos em seis novos agentes, representantes de duas classes antifúngicas, as quais foram recentemente licenciadas para uso ou estão na fase três dos testes clínicos (ODDS et al., 2003).

Dentre os seis novos agentes antifúngicos, o posaconazol, o ravuconazol e o voriconazol pertencem à classe dos azóis e a subdivisão dos triazólicos que corresponde a classe mais bem-sucedida em relação à terapia antifúngica desde 1960. Os outros três, anidulafungina, caspofungina e micafungina são equinocandinas e sucessoras da ciclofungina, cujo uso terapêutico foi abandonado em 1980. O ritmo da descoberta e desenvolvimento de antifúngicos é excessivamente lento e os novos antifúngicos citados anteriormente começaram seus caminhos na clínica em 1980. Desde esta época há uma carência por novos agentes antifúngicos de uso terapêutico (ODDS et al., 2003).

Existe uma diversidade de alvos para agentes antifúngicos. Contudo, em termos de números de classes de agentes que podem ser usados para o tratamento de micoses, os alvos estão focados direta ou indiretamente no envelope celular (parede ou membrana plasmática) e, particularmente, no esterol da membrana fúngica, o ergosterol, e na sua biossíntese. Alvos em outra parte da célula são uma inovação para bioavaliação sistemática de agentes antifúngicos (ODDS et al., 2003).

Os antifúngicos poliênicos incluem três compostos principais: natamicina, nistatina e anfotericina B. Apesar de sua toxicidade, a anfotericina B continua sendo a droga de escolha no tratamento de infecções fúngicas sistêmicas, incluindo aquelas devido a patógenos emergentes e resistentes aos azóis. A anfotericina B atua aumentando a permeabilidade da membrana celular fúngica, ligando-se ao ergosterol presente na membrana. Ela também interage com o colesterol na membrana celular humana, o que provavelmente confere seus efeitos tóxicos que freqüentemente obrigam a interrupção do tratamento. Entretanto, esta droga apresenta um amplo espectro de atividade. Resistência primária e desenvolvimento de resistência a anfotericina B são bem documentadas em microrganismos como *Candida lusitanae* (PAUW, 2000).

A 5-flucitosina, um análogo da droga antineoplásica 5-fluorouracil, inibe a síntese de ácidos nucleicos da maioria das espécies de *Candida* e *C. neoformans*. A penetração da droga dentro das cavidades do corpo, incluindo o fluido cerebrospinal é boa, mas seu uso clínico é limitado pela ocorrência comum de resistência primária, bem como de resistência adquirida, particularmente quando utilizada isoladamente. Altas doses de 5-flucitosina podem suprimir a hematopoiese (PAUW, 2000).

Os azóis estão divididos em imidazóis como, miconazol e cetoconazol e os triazóis como fluconazol e itraconazol. Os últimos têm superado completamente os compostos antigos para o tratamento de infecções invasivas em doenças críticas devido a sua maior eficácia e baixa toxicidade. Os triazóis não afetam a formação de andrógenos adrenais, mas a interação com o citocromo P-450 pode causar distúrbios em enzimas hepáticas. O uso prévio ou concomitante de rifampicina, fenitoína, carbamazepina e fenobarbital deverão ser evitados e, pacientes recebendo ciclosporina,

deverão ter uma imediata redução da dose desta droga quando estão para ser tratados com um triazol. É necessário o monitoramento freqüente dos níveis séricos. Além disso, os azóis podem aumentar os níveis intracelulares de drogas citotóxicas como a vincristina e antraciclinas (PAUW, 2000).

As equinocandinas atuam inibindo a síntese de β -1,3-glucana da parede fúngica e esta representa o primeiro alvo novo, em vinte anos de descoberta de antifúngicos, em termos de drogas de uso clínico (ODDS et al., 2003).

Quando tratados com drogas antifúngicas, patógenos fúngicos têm, em princípio, a capacidade de superar sua ação inibitória pelos mecanismos de resistência específicos. A resposta biológica tem freqüentemente sido usada para identificar alvos celulares de drogas antifúngicas pela realização de testes *in vitro* capazes de avaliar a habilidade de mutantes resistentes a drogas antifúngicas. Clinicamente, sempre que agentes antifúngicos são usados para combater infecções, a exposição dos patógenos fúngicos a estes agentes pode causar o aumento de isolados resistentes. O aumento no número de infecções fúngicas documentadas em diversas áreas hospitalares, em todo o mundo, pode potencialmente favorecer a ocorrência deste fenômeno, assim como o número de tratamentos com doses elevadas de antifúngicos. A ocorrência de resistência será dependente do tipo de patógeno fúngico a ser tratado e do tipo de agente antifúngico aplicado. A resistência às drogas antifúngicas é medida pelo aumento na concentração inibitória mínima (CIM) quando comparada a valores de susceptibilidade de microrganismos de referência. Têm sido reportadas três classes de drogas antifúngicas com resistência documentada: os poliênicos, os análogos de pirimidina e os azóis (SANGLARD, 2002).

A anfotericina-B deoxicolato tem sido considerada o padrão ouro para o tratamento das infecções fúngicas mais graves. O desenvolvimento de novas formulações de anfotericina-B, as quais usam lipossomas ou complexos lipídicos como sistema de liberação e a introdução dos compostos azólicos depois de 1980 e antes de 1990, representaram um avanço importante no tratamento de infecções fúngicas, devido aos seus perfis de segurança favoráveis e farmacocinética. A introdução destes novos agentes antifúngicos facilitou um método mais agressivo para a profilaxia e tratamento

de infecções fúngicas no passar das décadas, levando à preocupação com a emergência de microrganismos resistentes (CANUTO e RODERO, 2002).

Diversos agentes antifúngicos como as equinocandinas e os novos triazóis estão agora sendo avaliados ou em fase de desenvolvimento clínico avançado. Entretanto, a combinação sinérgica de antifúngicos tem diversas vantagens, incluindo o potencial para diminuição do desenvolvimento de resistência às drogas, um amplo espectro antifúngico e uma redução potencial na dose e toxicidade de cada medicamento. Um exemplo de combinação que tem sido usada no tratamento, com sucesso, é a administração de anfotericina-B e 5-flucitosina para o tratamento de meningite criptocócica. Outra combinação de drogas é a associação anfotericina-B e fluconazol, apesar de que teoricamente poderia ser antagonista, pois os azóis induzem a depleção de ergosterol, o alvo celular da anfotericina B, entretanto, tem sido utilizada na clínica (LUPETTI et al., 2003).

Os medicamentos mais usados para o tratamento da criptococose são anfotericina B, 5-flucitosina e fluconazol. O tratamento da criptococose meníngea associada à AIDS é feito em duas fases: a primeira, ou fase aguda, que duraria em torno de 6 a 10 meses e a segunda, chamada de fase de manutenção, por período indefinido. Geralmente os autores consideram dois resultados negativos como critério para determinar a mudança entre estas duas fases. Usualmente, pacientes com AIDS são tratados na fase inicial com anfotericina B, acompanhada ou não por 5-flucitosina, mas relatos de recidivas são muito comuns, em torno de 50 a 75%, se a terapia for descontinuada. Campos et al. (1992) relataram menores efeitos colaterais, menor recidiva e prolongamento de vida nos casos em que foram associados estes dois medicamentos. Durante a fase de manutenção têm-se utilizado fluconazol por período indefinido, já que este triazol possui excelente atividade antifúngica e atinge boa concentração no sistema nervoso central. De acordo com Saag et al. (2000), nos Estados Unidos, este esquema terapêutico foi capaz de reduzir a mortalidade em pacientes com AIDS de 14 a 25 % para 6 % (PAPPALARDO e MELHEM, 2003).

Para tratamento das formas pulmonares progressiva e disseminada, tanto em pacientes imunocompetentes como em imunossuprimidos existe indicação de tratamento com antifúngico específico. Para formas exclusivamente pulmonares, pode-se utilizar itraconazol por seis meses ou mais, de acordo com a evolução da doença (LAZÉRA et al., 2004).

As associações entre anfotericina B e azóis ou 5-flucitosina têm sido usadas em pacientes imunocomprometidos para formas disseminadas da criptococose. Entretanto, o uso isolado de 5-fluocitosina não é recomendado, pois cerca de 5% dos isolados de *C. neoformans* são primariamente resistentes a esta droga podendo ocorrer seleção e surgimento de resistência secundária (LAZÉRA et al., 2004).

O itraconazol, que também possui excelente atividade antifúngica tem demonstrado bons resultados no tratamento específico da criptococose, porém não representa uma droga de escolha para o tratamento inicial das formas meningeas. Apesar desta droga não atravessar a barreira hematoencefálica, os resultados observados no tratamento de meningoencefalite criptocócica podem estar relacionados à grande concentração da droga no tecido cerebral, já que possui caráter lipofílico. Sua biodisponibilidade variável e falta de formulação venosa promove limitações quanto ao seu uso (LAZÉRA et al, 2004).

Ellis et al. (1999) avaliaram a atividade *in vitro* da terbinafina comparada ao fluconazol frente a 205 isolados de *Cryptococcus neoformans* obtidos de amostras clínicas e ambientais. Foram realizados testes de susceptibilidade segundo metodologia de microdiluição, de acordo com padronização do CLSI (2005), documento M27-A. Os resultados obtidos demonstraram que a terbinafina pode ser usada para tratamento de criptococose, já que efeito sinérgico entre esta droga e fluconazol foi claramente demonstrado.

O repetido e prolongado uso de azóis em tratamentos de pacientes HIV positivos com infecções fúngicas de mucosas no período precedente à introdução da terapia antiretroviral, altamente ativa, tem favorecido a aquisição de resistência a essas drogas

em diversos patógenos fúngicos. Entre estes patógenos estão espécies de *Candida*, na maioria, incluindo *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* e *C. neoformans*. Resistência aos azóis em infecções fúngicas sistêmicas de pacientes gravemente imunocomprometidos é muito mais freqüente e tem sido descrita principalmente para as espécies *C. albicans* e *Aspergillus fumigatus*. Mecanismos de resistência aos azóis têm sido mais extensivamente investigados nos últimos anos, nos quais um grande número de isolados de leveduras foram avaliados por trabalhos laboratoriais (SANGLARD, 2002).

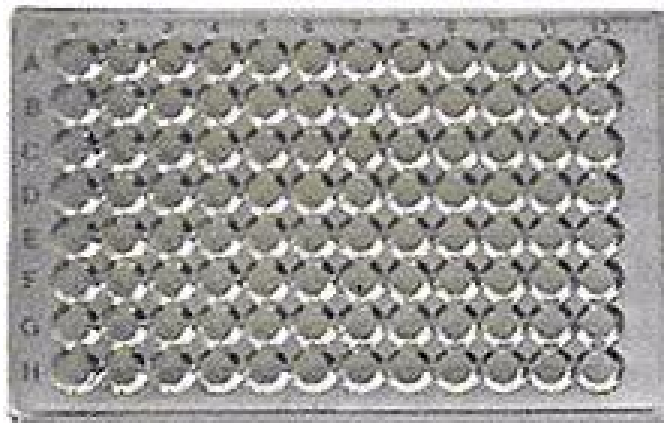
2.9 – TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE

Baseado na existência de fenótipos cada vez mais resistentes às drogas antifúngicas, o que tem ocasionado, cada vez mais, falhas na terapia medicamentosa antifúngica, tornou-se de grande importância o desenvolvimento de métodos que pudessem direcionar uma melhor conduta terapêutica. Dentre os métodos atualmente existentes, a diluição em meio líquido e em ágar e a difusão em ágar são as alternativas que se encontram disponíveis para realização de teste *in vitro*. A validação destes testes é feita pela comparação entre os mesmos. Nestes métodos, a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) da droga contra o microrganismo será correlacionada à susceptibilidade do mesmo microrganismo (COLOMBO e ALVES, 2004).

Na década de 80, grupos de pesquisadores norte-americanos e europeus se dedicaram em desenvolver metodologias de referência e então criaram, respectivamente e separadamente o National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) denominado, a partir do ano de 2005, como Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) e o European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) por meio do Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST). Para realização de testes de susceptibilidades em fungos leveduriformes, o NCCLS elaborou, em 1997, o documento M27-A que, no ano de 2002, sofreu alterações e passou a ser denominado como M27-A2. Entretanto, para o *C. neoformans*, que é uma levedura não-

fermentadora de glicose, o documento apresenta limitações que estão relacionadas a seu crescimento (PAPPALARDO e MELHEM, 2003).

Figura 2: Placa de microtitulação de acrílico com 96 poços



Extraído de:

http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo5/image/figura2.jpg

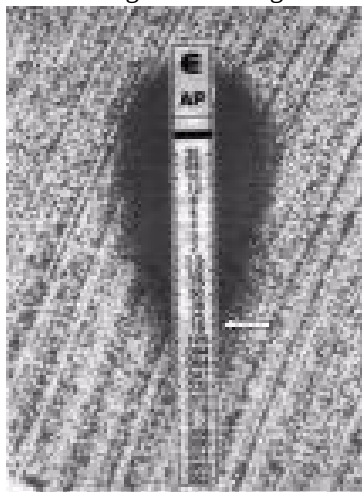
Anteriormente ao documento M27-A (1997), o NCCLS, atualmente CLSI, padronizou a execução de testes de susceptibilidade pela metodologia de macrodiluição em meio líquido relatada no documento M27-P. As duas metodologias apresentam-se de forma semelhante, todavia na metodologia de macrodiluição o volume do meio de cultura sintético RPMI-1640 requerido é maior e os testes são realizados em tubos de ensaio. O método mais recentemente padronizado pelo CLSI, o documento M27-A2, é realizado pela microdiluição em meio líquido. Utiliza-se um inóculo final na ordem de 10^3 células/mL e para cada droga são testadas 10 diluições. A droga mais o inóculo são incubados conjuntamente em placas de microtitulação. As leituras das concentrações inibitórias mínimas são realizadas por meio de método visual (ESPINEL-INGROFF et al., 1998; NCCLS, 2002; COLOMBO e ALVES, 2004).

O método padronizado pelo EUCAST é bastante semelhante ao do CLSI, no entanto, neste documento algumas modificações são propostas e podem melhorar os resultados para *C. neoformans*. Neste método, o meio líquido utilizado para o desenvolvimento dos testes é acrescido de 2% de glicose, o inóculo é maior e a leitura das placas é realizada pelo método espectrofotométrico (COLOMBO e ALVES, 2004).

Dentre os métodos baseados em ágar-difusão para realização de testes com *Cryptococcus* spp. o mais recomendado atualmente é o do E-test (AB-Biodisk, Solna, Suécia) que consiste em uma fita plástica contendo droga em diferentes concentrações expressas no reverso da tira. Quando colocada na superfície do meio solidificado, a droga contida na fita se difundirá rapidamente para o meio, mantendo por longos períodos um gradiente fixo de concentração em torno da fita. A difusão da droga a partir da fita para o ágar causa inibição do microrganismo em caso de sensibilidade à droga, gerando uma área de não crescimento em formato de elipse. A concentração inibitória mínima é lida exatamente no ponto onde a tira intercepta a elipse de inibição de crescimento (AB BIODISK, 1998; LAZÉRA et al., 2004).

Numerosos trabalhos no Brasil e no mundo têm sido publicados para auxiliar na validação das metodologias atualmente empregadas para determinação de susceptibilidade fúngica frente a drogas antifúngicas. Tais trabalhos têm auxiliado no sucesso da terapêutica medicamentosa já que estabelece correlação entre a CIM e a susceptibilidade do fungo à droga antifúngica (PAPPALARDO e MELHEM, 2003).

Figura 3: Halo de inibição do crescimento de *C. neoformans* com agente antifúngico



Extraído de : <http://www.scielo.br/img/revistas/spmj/v112n4/a2fig2.gif>

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Isolar *Cryptococcus* spp. a partir de fontes ambientais e de espécimes clínicos provenientes de pacientes portadores de criptococose no estado de Minas Gerais, determinar as espécies e avaliar o perfil de susceptibilidade, *in vitro*, dos isolados obtidos frente a agentes antifúngicos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✚ Isolar *Cryptococcus* spp. de fontes ambientais como fezes de pombos, ocos de árvores e madeira em decomposição;
- ✚ Isolar *Cryptococcus* spp. a partir de espécimes clínicos de pacientes hospitalizados, portadores de criptococose;
- ✚ Determinar a espécie de todos os isolados obtidos;
- ✚ Avaliar o perfil de susceptibilidade dos isolados clínicos e ambientais de *Cryptococcus* spp. frente aos antifúngicos anfotericina-B, 5-flucitosina, fluconazol, itraconazol, voriconazol e terbinafina, pelo método do CLSI;
- ✚ Avaliar o perfil de susceptibilidade dos isolados clínicos e ambientais de *C. neoformans* frente aos antifúngicos anfotericina-B, 5-flucitosina, fluconazol e itraconazol pelo método do E-test;
- ✚ Comparar os resultados obtidos entre as duas metodologias utilizadas;
- ✚ Comparar os resultados obtidos das concentrações inibitórias mínimas (CIM) das amostras ambientais com as de origem clínica;
- ✚ Caracterizar os pacientes segundo alguns aspectos como sexo, idade, condições clínicas, fatores predisponentes e usos de agentes antifúngicos e antibacterianos.

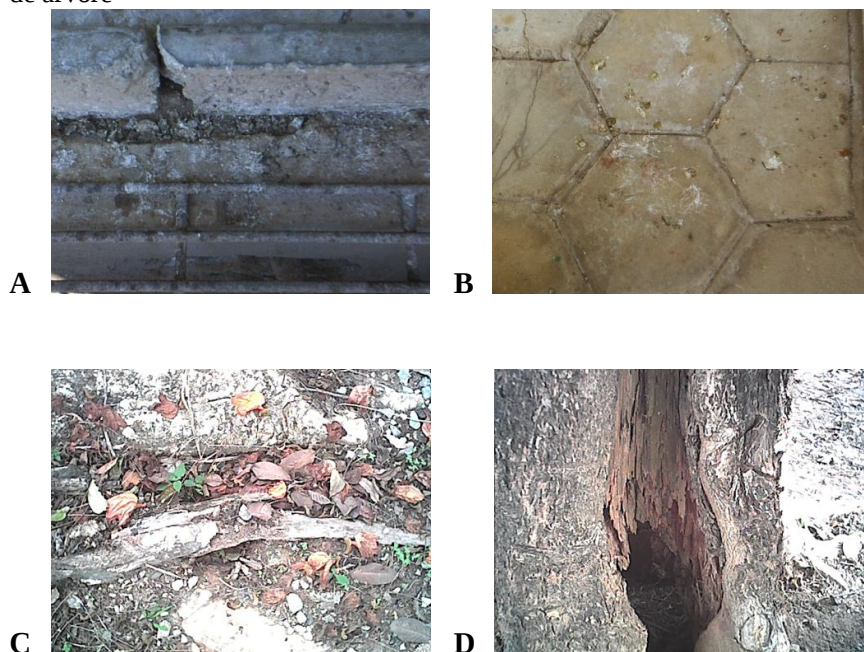
4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS AMBIENTAIS

4.1.1 Amostras ambientais

Foram colhidas amostras ambientais de fezes de aves, ocos de árvores e madeira em decomposição provenientes do Campus da Pampulha da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e de fezes de aves de criadouros e ambientes diversos em Belo Horizonte, Minas Gerais. Para coleta dos materiais biológicos, foram utilizadas placas de Petri de vidro esterilizadas em autoclave para coleta dos materiais biológicos. Foram coletados cerca de 1 a 10 g dos materiais biológicos para realização dos procedimentos de isolamento.

Figura 4: Locais de coletas das amostras ambientais no campus da UFMG, (A) Instituto de Ciências Biológicas, (B) Biblioteca Central, (C) madeira em decomposição, (E) oco de árvore



Extraído de: Fotos autor

4.1.2 Isolamento

As amostras ambientais foram diluídas ou homogeneizadas na proporção de 1:10 em solução esterilizada de cloreto de sódio 0,85% acrescida de 0,05 mg/mL de cloranfenicol e mantidas sob agitação durante 30 minutos. Após este período permaneceram estáticas por cerca de uma hora e, em seguida, alíquotas de 100 µL foram semeadas em triplicata em placas de Petri de 90 mm contendo meio de Staib (meio acrescido de solução aquosa de sementes de Níger - *Guizotia abyssinica*). As placas foram incubadas por sete dias a 25 °C. As colônias de coloração marrom características de *C. neoformans* foram repicadas em ágar Sabouraud dextrose (DIFCO).

Solução de salina esterilizada com Cloranfenicol a 0,05 mg/mL

Cloreto de sódio.....0,85 g
Cloranfenicol.....0,005 g
Água destilada.....100,0 mL

A solução foi esterilizado em autoclave por 15 min a 121° C.

Meio de Staib (Com Cloranfenicol e Gentamicina)

Extrato de semente de níger *.....200,0 mL
Glicose.....1,0 g
Cloranfenicol.....400,0 mg
Gentamicina.....25,0 mL
Solução difenil**.....10,0 mL
Ágar.....20,0 g
Água destilada.....800,0 mL

* Preparo do extrato de semente de níger (*Guizotia abyssinica*): 70 g de semente de níger pulverizada acrescida de 350,0 mL de água destilada. Autoclavado por 10 min a 121° C. Foi filtrado utilizando gaze.

** Solução difenil: 0,01 g de difenil em 10 mL de álcool etílico.

O meio foi esterilizado em autoclave por 15 min a 121° C.

4.2 OBTENÇÃO DE ISOLADOS CLÍNICOS

4.2.1 Aquisição

Os isolados clínicos de *C. neoformans* foram cedidos pelos Laboratórios de Microbiologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e do Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) em placas contendo meio de ágar Sabouraud dextrose (DIFCO).

Ágar Sabouraud dextrose (LACAZ et al., 2002)

Glicose.....	20,0 g
Peptona.....	10,0 g
Extrato de levedura.....	5,0 g
Ágar.....	20,0 g
Água destilada.....	1000,0mL
Esterilizado em autoclave por 15 min a 121° C.	

4.2.2 Critério de seleção

Foram incluídos todos isolados clínicos encaminhados pelos laboratórios hospitalares que não apresentavam, no ato do recebimento, qualquer tipo de contaminação por outro microrganismo.

4.2.3 Análise do perfil dos pacientes

Foram coletados dados referentes aos pacientes, além da sua história clínica e medicamentosa com o objetivo de conhecer o grupo de portadores de criptococose e, se possível, estabelecer correlação entre os resultados dos testes e perfil do paciente. Para isto, foi utilizado questionário para coleta de dados do prontuário médico (Anexo 1).

4.3 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS AMBIENTAIS E CLÍNICOS

Os isolados ambientais e clínicos foram submetidos a exame microscópico direto com tinta Nanquim para visualização de cápsula e testadas quanto à utilização de uréia em meio de Christensen, assimilação de nitrato e termotolerância a 35°C para confirmação de sua identificação.

Meio de Christensen – Uréia

Glicose.....	1,0 g
Peptona.....	1,0 g
Cloreto de sódio.....	5,0 g
Fosfato dihidrogenado de potássio.....	2,0 g
Vermelho de fenol.....	0,012 g
Água destilada.....	1000 mL
Ágar.....	20 g
Solução de uréia 20% (20 g em 100 mL de água destilada).....	100 mL

Os constituintes foram dissolvidos em água destilada, exceto o ágar e a solução de uréia. O pH ajustado para 6,8. Foi acrescentado o ágar, dissolvido completamente através de aquecimento e distribuído 4,5 mL em tubos de ensaio. O meio foi esterilizado em autoclave por 15 min a 121° C e quando em temperatura atingida era suportável pelas mãos foi distribuído 0,5 mL da solução de uréia em cada tubo.

Meio para Assimilação de Nitrato

Yeast Carbon Base	12 g
Ágar bacteriológico.....	20 g
Água destilada.....	1000 mL

O meio foi esterilizado em autoclave por 15 min a 121° C.

4.4 AMOSTRAS PADRONIZADAS

Foram realizados testes de susceptibilidade com amostras padronizadas da American Type Culture Collection (ATCC) de *Cryptococcus neoformans* (ATCC 32608), *Candida albicans* (ATCC 18804), *Candida tropicalis* (ATCC 22019) *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), *Candida glabrata* (ATCC 2001) e *Candida krusei* (ATCC 20298).

4.5 MANUTENÇÃO DOS ISOLADOS

Os isolados foram mantidos a uma temperatura de 20° C negativos em meio de Skin Milk a 15% e em Caldo BHI – Glicerol a 20%, ambos em duplicata e foram repicados semestralmente. Foram mantidas réplicas dos isolados em ágar Sabouraud dextrose (DIFCO) a uma temperatura de 4 ° C.

Skin Milk – 15%

Leite em pó desnatado.....15 g

Água destilada.....100mL

O meio foi esterilizado em autoclave por 10 min a 121° C.

Caldo Brain Heart Infusion (BHI) + Glicerol - 20%

BHI.....37,0 g

Glicerol.....200 mL

Água destilada.....800 mL

O meio foi esterilizado em autoclave por 15 min a 121° C.

4.6 DETERMINAÇÃO DAS ESPÉCIES

Os isolados ambientais e clínicos foram semeados em meio de Canavanina Glicina Azul de Bromotimol, meio de CGB (KWON-CHUNG et al., 1982) para diferenciação das espécies *C. neoformans* e *C.gattii*.

Meio de Canavanina Glicina Azul de Bromotimol (CGB, Kwon-Chung et al., 1982)

Solução A

Glicina.....	10 g
Fosfato biácido de potássio.....	1 g
Sulfato de magnésio.....	1 g
Tiamina – HCl.....	1 mg
Sulfato de L-Canavanina.....	30mg
Água destilada.....	100 mL

A solução foi esterilizada por filtração à vácuo, utilizando membrana de nitrocelulose (0,22 Milipore).

Solução B

Azul de Bromotimol.....	0,4 g
Água destilada.....	100 mL

Meio propriamente dito

Solução B.....	20 mL
Ágar.....	20 g
Água destilada.....	880 mL

O meio foi esterilizado em autoclave por 15 min a 121° C e resfriado até que uma temperatura suportável pelo dorso das mãos. Antes da solidificação do meio foram acrescentados 100mL de Solução A.

4.7 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

4.7.1 Método do CLSI (2005), documento M27-A2, 2002

Inóculo

Foi realizado de acordo com Pfaller et al. (1988) a partir de amostras puras de *C. neoformans* cultivadas em ágar Sabouraud dextrose (DIFCO) e incubadas a 35°C por 48 e 72 horas. Foi coletada uma abundante massa de levedura e suspendida em 5mL de solução de cloreto de sódio esterilizada (0,85%). A suspensão foi homogeneizada em vortex por cerca de quinze segundos e a densidade celular ajustada em espectrofotômetro (520nm) entre 0,8 a 1. A suspensão inicial foi diluída na proporção de 1:50 e, posteriormente, 1:10 em meio Roswell Park Memorial Institute - 1640 (RPMI – 1640, GIBCO BRO).

Solução de cloreto de sódio esterilizada 0,85%

Cloreto de sódio.....0,85 g

Água destilada.....100,0 mL

A solução foi esterilizada em autoclave por 15 min a 121° C.

Meio de RPMI-1640 (com glutamina e vermelho de fenol e sem bicarbonato)

L-Arginina (base livre).....0,200 g/L

L-Asparagina (anidra).....0,050 g/L

L-Ácido aspártico.....0,020 g/L

L-Cistina - 2HCl.....0,0652 g/L

L-Ácido glutâmico.....0,020 g/L

L-Glutamina.....0,300 g/L

Glicina.....0,010 g/L

L-Histidina (base livre)0,015 g/L

L-Hidroxiprolina.....0,020 g/L

L-Isoleucina.....0,050 g/L

L-Leucina.....	0,050 g/L
L-Lisina - HCl.....	0,040 g/L
L-Metionina.....	0,015 g/L
L-Fenilalanina.....	0,015 g/L
L-Prolina.....	0,020 g/L
L-Serina.....	0,030 g/L
L-Treonina.....	0,020 g/L
L-Triptofano.....	0,005 g/L
L-Tirosina - Na.....	0,02883 g/L
L-Valina.....	0,020 g/L
Biotina.....	0,0002 g/L
D-Pantotênico.....	0,00025 g/L
Cloreto de colina.....	0,003 g/L
Ácido fólico.....	0,001 g/L
Mioinositol.....	0,035 g/L
Niacinamida.....	0,001 g/L
PABA.....	0,001 g/L
Piridoxina – HCl.....	0,001 g/L
Riboflavina.....	0,0002 g/L
Tiamina – HCl.....	0,001 g/L
Vitamina B12.....	0,000005 g/L
Nitrato de cálcio x H ₂ O.....	0,100 g/L
Cloreto de potássio.....	0,400 g/L
Sulfato anidro de magnésio.....	0,04884 g/L
Cloreto de sódio.....	6,000 g/L
Fosfato bibásico de sódio anidro.....	0,800 g/L
D-Glicose.....	2,000 g/L
Glutation (reduzido)	0,001 g/L
Vermelho de fenol.....	0,0053 g/L

O meio RPMI – 1640 foi obtido comercialmente (GIBCO BRO). Para utilização em fase líquida foi adicionado ao conteúdo de uma embalagem (10,4g de liofilizado do meio de cultura), 34,54 g/L de

solução de tampão MOPS 0,165 M (Ácido morfolinopropanosulfônico) e água destilada, quantidade suficiente para 1L. Adicionou-se 2% de glicose ao meio com objetivo de facilitar o crescimento dos isolados de *C. neoformans*. O meio foi esterilizado por filtração à vácuo em membrana de nitrocelulose (0,22 Milipore).

Drogas antifúngicas

Os isolados foram testados quanto a sua susceptibilidade frente às seguintes drogas, com seus respectivos fornecedores: anfotericina B (Sigma), 5-flucitosina (Sigma), fluconazol (Pfizer Ltda.), itraconazol (Janssen-Cilag Farmacêutica), voriconazol (Pfizer Ltda.) e terbinafina (Novartis Biociências S.A.). Estas drogas foram diluídas em meio RPMI – 1640 (GIBCO – BRO) e as diluições consideradas de acordo com as drogas foram 16, 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,12, 0,06 e 0,03 µg/mL para anfotericina B, itraconazol, voriconazol e terbinafina 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125µg/mL para 5-fluocitosina e 250, 125, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5µg/mL para fluconazol. Para auxiliar na diluição das drogas anfotericina B, itraconazol, voriconazol e terbinafina foi utilizado Dimetilsulfóxido (DMSO) na proporção de 1% do volume final da solução estoque da droga.

Realização do Teste

Os testes de susceptibilidade foram realizados em placas estéreis de microtitulação de fundo chato, com tampa individual. A primeira coluna foi utilizada para controle negativo onde foram acrescentados 200 µL de meio RPMI – 1640 e a última coluna foi utilizada para controle positivo, onde foram acrescentados 100 µL de meio RPMI –1640 mais 100 µL de inóculo. Nas colunas centrais, da direita para a esquerda, foram acrescentadas as diluições das drogas, sucessivamente, da menor para a maior diluição em um volume de 100 µL e no momento da inoculação foram acrescentados mais 100 µL do inóculo final. As placas foram incubadas por 72 horas a 35° C (± 2). Os testes foram realizados em duplicata.

As leituras foram realizadas em 48 e 72 horas mediante a avaliação visual. Para a Anfotericina B foi considerada a diluição em que houve ausência completa de

crescimento. Para os azóis (fluconazol, itraconazol e voriconazol) e para a 5-flucitosina foi considerada a diluição que promoveu 80% de inibição do crescimento. Para a terbinafina o documento M27-A2 (2002) não estabelece critérios para a leitura e foi considerada então a diluição que promoveu 80% do crescimento (REYDER et al., 1998).

4.7.2 Método do E-teste (AB-Biodisk, Solna, Suécia)

Inóculo

O preparo do inóculo foi realizado a partir de amostras puras subcultivadas em ágar Sabouraud dextrose incubadas a 35°C por 48 horas. Uma massa de leveduras foi coletada e suspendida em 5mL de solução de cloreto de sódio esterilizado (0,85%). A suspensão resultante foi homogeneizada em vortex por cerca de quinze segundos e a densidade celular foi ajustada para turbidez correspondente a 1,0 na escala MacFarland (PFALLER et al., 1988, ESPINEL-INGROFF, 1991)

Antifúngicos (Tiras E-test)

Tiras de E-test da marca AB-Biodisk foram obtidas comercialmente. O agente antifúngico é adsorvido em diferentes concentrações no reverso da tira. Todas as amostras foram testadas quanto a sua susceptibilidade frente a anfotericina B, 5-flucitosina, fuconazol e itraconazol.

Realização do teste

O preparo do inoculo seguiu o mesmo procedimento do método do CLSI. As amostras foram distribuídas homogeneamente em placas de Petri contendo meio de RPMI – 1640 (RPMI-1640 incorporado a 1,5% de ágar), com auxílio de “swab” de algodão esterilizado, conforme o método de KIRBY-BAUER, segundo recomendações do fabricante (AB BIODISK). O swab foi imerso na suspensão do inóculo com o cuidado de se retirar o excesso nas bordas do tubo de ensaio. Em seguida, empregando pinça previamente flambada, foram depositadas as fitas de E-test (AB BIODISK) no centro da placa, sendo colocadas 2 fitas por placa, em posições invertidas, de forma que a zona de maior concentração das fitas dos antifúngicos estivessem em posição contrária

para que não dificultasse ou mesmo impedisse a leitura dos valores de CIM. Foram utilizadas placas de 150 mm de diâmetro. As placas foram incubadas a 35 °C por 48 horas. Os testes foram realizados em duplicata. As leituras das CIMs foram realizadas no ponto que corresponde às interseções formadas entre o halo de inibição da elipse e as tiras de E-test.

4.8 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SUCCEPTIBILIDADE

Os pontos de corte (*breakpoints*) foram interpretados de acordo com os resultados das CIMs obtidas e de acordo com o antifúngico testado, (Tabela 1)

Tabela 1: Interpretação das CIM (µmL) segundo CLSI (2005), documento M27-A2, 2002

Antifúngico	Perfil de Susceptibilidade *			
	S	SDD	I	R
Anfotericina-B	≤1	-	-	>1
5-Flucitosina	≤4	-	8-16	≥32
Fluconazol	≤8	16-32	-	≥64
Itraconazol	≤0,125	0,25-0,5	-	≥1

Legenda: S – sensível
SDD – sensível dose dependente
I – resistência intermediária
R – resistente
* - unidade considerada: µg/mL

Para a interpretação do resultado dos testes com os novos azólicos, como o voriconazol foi considerada a variação nas CIMs entre 0,03 e 16 µg/mL (CLSI, documento M27-A2, 2002).

Para a terbinafina o CLSI não estabelece critérios para interpretação dos resultados, por tanto, foram considerados, para efeitos interpretativos, os dados encontrados em literatura a respeito de sua atuação contra leveduras.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

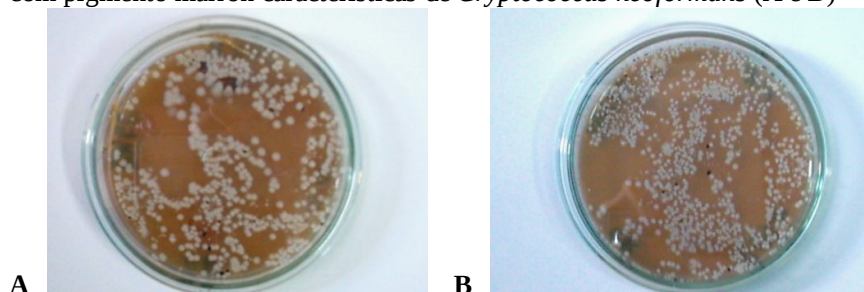
Com o objetivo de avaliar a concordância entre as metodologias utilizadas (CLSI e E-test), de acordo com as leituras das CIMs nos intervalos de 48 e 72 horas e a comparação dos resultados dos isolados clínicos e ambientais, foi realizado o teste não paramétrico de Wilcoxon. Para avaliar se existem diferenças entre os seis tipos de agentes antifúngicos nas medidas realizadas com 48 e 72 horas, para cada metodologia e para os tipos de amostras, clínicas e ambientais, foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Quando detectadas diferenças estatisticamente significativas, foi utilizado o teste de Mann-Whitney. A análise foi realizada pela estatística Fabíola Adriane Cardoso Santos.

5 RESULTADOS

5.1 ISOLADOS AMBIENTAIS

Foram coletadas 162 amostras ambientais de fezes de aves, árvores e madeira em decomposição no campus da UFMG e de fezes de aves de um criadouro em Belo Horizonte. Foram obtidos 09 isolados de *Cryptococcus neoformans* a partir das amostras ambientais que correspondem a um índice de positividade de 5,55% (Tabela 2). Todos os isolados obtidos foram provenientes de fezes de pombos coletadas nas dependências da UFMG (Tabela 2). Considerando apenas as amostras obtidas a partir de fezes de pombos, o índice de positividade foi de 25% .

Figura 5: Agar Niger: Plantio primário das amostras ambientais evidenciando colônias com pigmento marron características de *Cryptococcus neoformans* (A e B)



Extraído de : Fotos autor

Tabela 2: Caracterização das amostras ambientais obtidas para isolamento de *C. neoformans*

Identificação	Material biológico	Procedência	Nº	Nº
100 -107	Pombos	ICB/UFMG	08	04
200 - 206	Ave desconhecida	ICB/UFMG	07	00
207 -209	Pombos	BC/UFMG*	06	04
210 – 214	Pombos	BC/UFMG	10	01
215 - 220	Pombos	Reitoria/UFMG	12	00
221 - 232	Ave desconhecida	Campus UFMG	24	00
300	Casca “Mulungú”	Campus UFMG	02	00
301	Oco “Mulungú”	Campus UFMG	02	00
302	Casca “Araribá”	Campus UFMG	02	00
303	Oco “Araribá”	Campus UFMG	02	00
304	Casca “Faveira”	Campus UFMG	02	00
305	Oco “Faveira”	Campus UFMG	02	00
306	Casca “Indaiçu”	Campus UFMG	02	00
307	Oco “Indaiçu”	Campus UFMG	02	00
308	Casca “Cinamomo”	Campus UFMG	02	00
309	Oco “Cinamomo”	Campus UFMG	02	00
310	Casca “Flamboian”	Campus UFMG	02	00
311	Oco “Flamboian”	Campus UFMG	02	00
312	Casca “Enterolóbio”	Campus UFMG	02	00
313	Oco “Enterolóbio”	Campus UFMG	02	00
314	Casca “Eucalipto”	Campus UFMG	02	00
315	Oco “Eucalipto”	Campus UFMG	02	00
316	T.D. “Eucalipto”	Campus UFMG	04	00
400	Galinha de Granja	Criadouro em BH	02	00
401	Codorna	Criadouro em BH	02	00
402	Periquito	Criadouro em BH	02	00
403	Pintinhos	Criadouro em BH	02	00
404	“Diamante Gold”	Criadouro em B H	02	00
405	Garnizé	Criadouro em BH	02	00
406	Patos	Criadouro em BH	02	00
407	Aves –“Argaponé”	Criadouro em BH	02	00
408	Pombos	Criadouro em BH	03	00
409	Pombos	Criadouro em BH	03	00
410	Marrecos	Criadouro em BH	02	00
411	Pombos	Criadouro em BH	03	00
412	Faizão	Criadouro em BH	02	00
413	Patos	Criadouro em BH	02	00
414	Galinha Caipira	Criadouro em BH	02	00
415	Ave “Red Ramp”	Criadouro em BH	02	00
416	Ave “Calafate”	Criadouro em BH	02	00
417	Ave “Calopsita”	Criadouro em BH	02	00
418	Pavão	Criadouro em BH	02	00

419	Galinha Japonesa	Criadouro em BH	02	00
420	Pavão Branco	Criadouro em BH	02	00
421	Galinha Caipira	Criadouro em BH	02	00
422	Fezes de Canário	Criadouro em BH	02	00
423	Galinha Guiné	Criadouro em BH	02	00
424	Galinha Caipira	Criadouro em BH	02	00
425	Pombos	Criadouro em BH	03	00
426	Pombos	Criadouro em BH	03	00
TOTAL			162	09

Legenda: Materiais biológicos: 100 – 232 e 400-426 = fezes de aves

300-315 = materiais diversos provenientes de árvores

316 = Tronco de árvore em decomposição

Procedência: * BC/UFMG = Biblioteca Central /UFMG

5.2 ISOLADOS CLÍNICOS

Foram recebidos 09 isolados de *Cryptococcus neoformans* provenientes de pacientes atendidos no Hospital das Clínicas da UFMG e 30 no Hospital Universitário da UFJF (Tabela 3). Nenhuma amostra recebida estava contaminada por outros microrganismos. Dentre os isolados quatro (10,3%) foram cultivados a partir de amostras de hemocultura e 35 (89,7%) de LCR (líquido cefalo-raquidiano).

Tabela 3: Caracterização dos isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans*

Identificação dos isolados	Procedência
01-A	HC/UFMG
02-A	HC/UFMG
03-A	HC/UFMG
04-A	HC/UFMG
05-B	HU/UFJF
06-B	HU/UFJF
07-B	HU/UFJF
08-B	HU/UFJF
10-B	HU/UFJF
11-B	HU/UFJF
13-B	HU/UFJF
14-B	HU/UFJF
15-B	HU/UFJF
16-B	HU/UFJF
17-B	HU/UFJF
18-B	HU/UFJF
19-B	HU/UFJF
20-B	HU/UFJF
21-B	HU/UFJF
22-B	HU/UFJF
23-B	HU/UFJF
24-B	HU/UFJF
25-B	HU/UFJF
26-B	HU/UFJF
27-B	HU/UFJF
28-B	HU/UFJF
29-B	HU/UFJF
30-B	HU/UFJF
31-B	HU/UFJF
32-B	HU/UFJF
33-B	HU/UFJF
34-B	HU/UFJF
35-B	HU/UFJF
39-B	HU/UFJF
40-A	HC/UFMG
41-A	HC/UFMG
42-A	HC/UFMG
43-A	HC/UFMG
45-A	HC/UFMG
TOTAL DE ISOLADOS: 38	

Legenda: HC/UFMG: Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais
HU/UFMG: Hital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora

5.3 DESCRIÇÃO DO PERFIL DOS PACIENTES

Foram obtidos isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans* de 39 pacientes. Dentre estes, seis (15,4%) foram atendidos em ambulatório e 33 (84,6%) estavam sob internação hospitalar; cinco (19,2%) eram do sexo feminino e 21 (80,8%) do sexo masculino; todos os pacientes (100%) possuíam idade superior a 25 anos.

Foram avaliados 26 (66,7%) prontuários médicos dos pacientes com o objetivo de caracterizá-los quanto a alguns parâmetros. Vinte pacientes (76,9%) eram portadores de Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), dois (7,8%) haviam sido submetidos a transplante, um (3,8%) era portador de doença hepática (Hepatite B e C) e três prontuários (11,5%) não forneceram dados a respeito da ocorrência de outras doenças.

Em relação ao quadro clínico, havia relatos de outras doenças ou condições subjacentes diversas como meningite criptocócica e meningocócica, criptococose generalizada, pneumonia, insuficiência respiratória, candidíase orofaríngea, doença de Van Willebrand, sífilis, citomegalovirose, encefalite herpética, sarcoma de Kaposi, discrasia sanguínea, neutrofilia, neutropenia, insuficiência renal, molusco contagioso disseminado, psoríase disseminada, tuberculose pulmonar, hepatomegalia, hemorragia digestiva, pancitopenia, choque séptico, cefaléia intensa, dor abdominal, vômito e náusea. Em um dos pacientes foi diagnosticada infecção fúngica múltipla, por *Cryptococcus neoformans* e por *Histoplasma capsulatum*.

Quanto ao relato do uso de drogas antifúngicas pelos pacientes foram citadas nistatina, cetoconazol, fluconazol e anfotericina B. A administração das drogas antifúngicas relatadas teve como objetivo o tratamento de criptococose e de outras infecções fúngicas concomitantes. Em um dos prontuários cujo paciente tinha como doença de base a AIDS, foi relatada a substituição da anfotericina B por fluconazol, por motivo de pancitopenia no tratamento de criptococose.

Entre os antimicrobianos usados pelos pacientes estão a amicacina, azitromicina, ceftriaxona, ciprofloxacina, clindamicina, imipenem, meropenem, sulfametoxazol trimetoprim, vancomicina, rifampicina, izoniazida e pirazinamida.

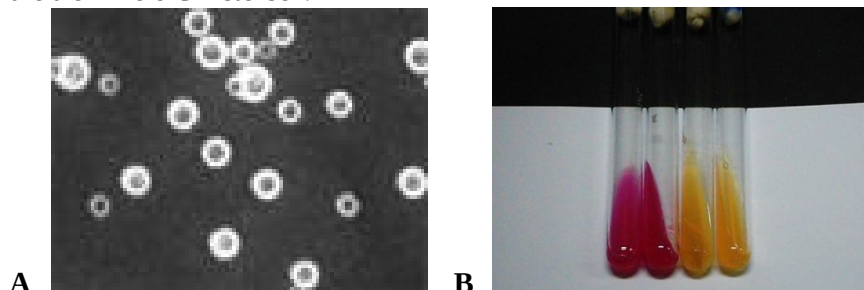
Foi relatado, ainda, o uso de corticosteróides como dexametasona, hidrocortisona e prednisona; os medicamentos antiviróticos aciclovir e o coquetel antiretroviral e quimioterápicos anti-neoplásicos.

5.4 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES

Todos os isolados obtidos, ambientais e clínicos, foram devidamente identificados como sendo *Cryptococcus* spp. pela visualização de cápsula, através do exame microscópico direto com tinta Nanquim, utilização de uréia em meio de Christensen e assimilação de nitrato.

Todos os isolados apresentaram termotolerância a 35°C. Todos os isolados foram identificados como *Cryptococcus neoformans* já que não foram capazes de crescer em meio de CGB (canavanina-glicina-azul de bromotimol). Realizou-se comprovação da eficiência do meio pela inoculação e posterior crescimento de isolado de *Cryptococcus gattii*.

Figura 6: Identificação dos isolados de *Cryptococcus neoformans*: evidenciação da levedura encapsulada pelo exame direto com tinta Nanquim (A) e prova de utilização da uréia em meio Christensen.



Extraído de : A) Lacaz, 2002 B) Fotos autor

5.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

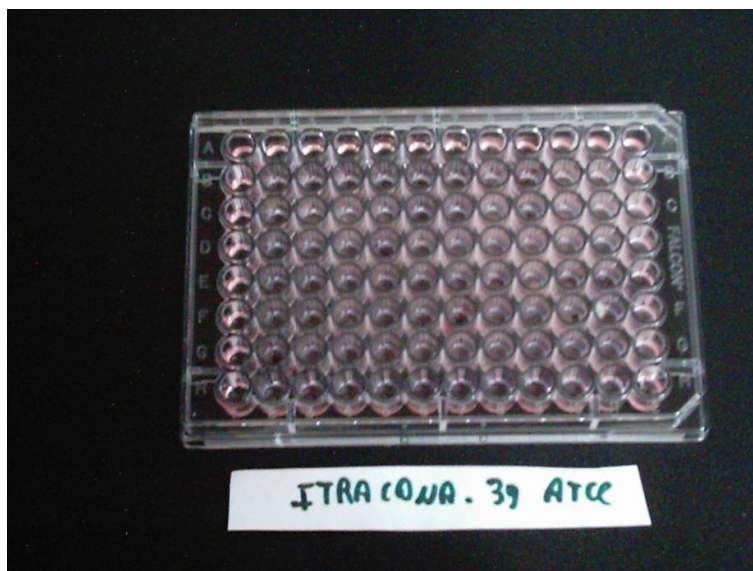
Foram determinadas as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) de 48 isolados de *Cryptococcus neoformans*, sendo 09 de origem ambiental (18,8%) e 39 provenientes de material clínico (81,2%) frente às drogas anfotericina B, 5-flucitosina, fluconazol, itraconazol, voriconazol e terbinafina e pelo método propostas pelo CLSI (2005), documento M27 – A2, 2002. O método do E-test (AB-Biodisk) foi testado frente a anfotericina B, 5-flucitosina, fluconazol e itraconazol.

5.5.1 Método do CLSI (2005), documento M27–A2, 2002

Após leitura de 48 horas, os valores das CIMs dos isolados de *Cryptococcus neoformans* ambientais variaram entre 0,03 a 0,25 µg/mL para a anfotericina B, 0,5 a 8 µg/mL para 5-flucitosina, 1 a 64 µg/mL para fluconazol, 0,03 a 16 µg/mL para itraconazol, 0,03 a 1 µg/mL para voriconazol e 0,25 a 16 µg/mL para terbinafina. Para os isolados clínicos, neste mesmo período leitura os valores das CIMs variaram entre 0,03 a 0,5 µg/mL para a anfotericina B, 0,5 a 16 µg/mL para 5-flucitosina, 0,125 a 16 µg/mL para fluconazol, 0,03 a 0,5 µg/mL para itraconazol, 0,03 a 1 µg/mL para voriconazol e 0,03 a 2 µg/mL para terbinafina (Tabelas 4 a 9).

Em relação às leituras realizadas após 72 horas, os valores das CIMs dos isolados de *C. neoformans* ambientais variaram de 0,03 a 0,25 µg/mL para a anfotericina B, 1 a 16 µg/mL para 5-flucitosina, 2 a 64 µg/mL para fluconazol, 0,03 a 16 µg/mL para itraconazol, 0,03 a 2 µg/mL para voriconazol e 0,5 a 16 µg/mL para terbinafina. Para os isolados clínicos, neste mesmo período, as variações das CIMs foram de 0,06 a 0,5 µg/mL para a anfotericina B, 0,5 a 16 µg/mL para 5-flucitosina, 0,5 a 32 µg/mL para fluconazol, 0,03 a 0,5 µg/mL para itraconazol, 0,03 a 2 µg/mL para voriconazol e 0,25 a 2 µg/mL para terbinafina (Tabelas 4 a 9).

Figura 7: Placa de microtitulação com teste de susceptibilidade do *C. neoformans* frente ao itraconazol, após incubação de 72 horas a 35°C.



Extraído de : Fotos autor

5.5.2 Método do E-Test (AB-BIODISK)

Foram realizadas leituras após 48 e 72 horas de incubação, entretanto os valores das CIMs dos isolados de *Cryptococcus neoformans* obtidos por meio desta metodologia nos dois períodos não sofreram alteração (Tabelas 4 a 9).

Os valores das CIMs dos isolados de *Cryptococcus neoformans* ambientais variaram de 0,006 a 0,094 µg/mL para a anfotericina B; 0,064 a 2 µg/mL para 5-flucitosina; 0,38 a 3 µg/mL para fluconazol e 0,125 a 8 µg/mL para itraconazol. Para os isolados clínicos, as variações das CIMs foram de 0,008 a 0,125 µg/mL para a anfotericina B, 0,047 a 105 µg/mL para 5-flucitosina, 0,016 a >256 µg/mL para fluconazol e 0,003 a 2 µg/mL para itraconazol (Tabelas 4 a 9).

Tabela 4: Valores das CIM's dos isolados clínicos e ambientais de *Cryptococcus neoformans* e amostras ATCC frente à anfotericina B pelas metodologias do CLSI e E-Test

ANFOTERICINA B					
Amostra	Tipo de amostra	CLSI		E-Test	
		48 horas	72 horas	48 horas	72 horas
01-A	C	0,03	0,12	0,125	0,125
02-A	C	0,06	0,12	0,016	0,016
03-A	C	0,12	0,12	0,016	0,016
04-A	C	0,06	0,12	0,023	0,023
05-B	C	0,03	0,06	0,008	0,008
06-B	C	0,06	0,25	0,064	0,064
07-B	C	0,25	0,25	0,064	0,064
08-B	C	0,25	0,25	0,032	0,032
10-B	C	0,25	0,5	0,047	0,047
11-B	C	0,06	0,12	0,032	0,032
13-B	C	0,12	0,25	0,012	0,012
14-B	C	0,12	0,12	0,016	0,016
15-B	C	0,12	0,12	0,012	0,012
16-B	C	0,06	0,12	0,016	0,016
17-B	C	0,25	0,25	0,012	0,012
18-B	C	0,12	0,12	0,023	0,023
19-B	C	0,12	0,12	0,047	0,047
20-B	C	0,03	0,06	0,047	0,047
21-B	C	0,03	0,12	0,047	0,047
22-B	C	0,03	0,12	0,016	0,016
23-B	C	0,06	0,06	0,094	0,094
24-B	C	0,06	0,12	0,023	0,023
25-B	C	0,12	0,25	0,125	0,125
26-B	C	0,12	0,25	0,045	0,045
27-B	C	0,12	0,25	0,032	0,032
28-B	C	0,25	0,25	0,047	0,047
29-B	C	0,12	0,25	0,064	0,064
30-B	C	0,25	0,25	0,032	0,032
31-B	C	0,12	0,25	0,016	0,016
32-B	C	0,25	0,25	0,032	0,032
33-B	C	0,25	0,25	0,094	0,094
34-B	C	0,25	0,25	0,094	0,094
35-B	C	0,25	0,25	0,047	0,047
39-B	C	0,25	0,5	0,047	0,047
40-A	C	0,25	0,5	0,047	0,047
41-A	C	0,25	0,25	0,047	0,047
42-A	C	0,25	0,25	0,047	0,047
43-A	C	0,5	0,5	0,064	0,064
45-A	C	0,12	0,5	0,047	0,047
100	A	0,25	0,25	0,094	0,094
101	A	0,03	0,03	0,094	0,094
102	A	0,25	0,25	0,006	0,006
103	A	0,25	0,25	0,047	0,047
207-a	A	0,06	0,12	0,064	0,064
207-b	A	0,12	0,12	0,032	0,032
207-c	A	0,06	0,25	0,047	0,047
207-d	A	0,12	0,12	0,023	0,023
210	A	0,25	0,25	0,047	0,047
<i>Cryptococcus neoformans</i>	ATCC	0,03	0,06	0,032	0,032
<i>Cândida albicans*</i>	ATCC	0,03	0,06	1,5	1,5
<i>C. tropicalis*</i>	ATCC	0,12	0,25	4	4
<i>C. parapsilosis*</i>	ATCC	0,12	0,12	4	4
<i>C. glabrata*</i>	ATCC	0,06	0,12	0,38	0,38
<i>C. krusei*</i>	ATCC	0,12	0,12	1,5	1,5

Legenda: C - amostra clínica

A - amostra ambiental

ATCC - amostras padronizadas do American Type Culture Collection

* - leituras realizadas após 24 e 48 horas conforme recomendações do CLSI, documento M27-A2, 2002, para isolados de *Candida spp.*

Tabela 5: Valores das CIM's dos isolados clínicos e ambientais de *Cryptococcus neoformans* e amostras ATCC frente à 5-flucitosina pelas metodologias do CLSI e E-Test

5-FLUCITOSINA					
Amostra	Tipo de amostra	CLSI		E-Test	
		48 horas	72 horas	48 horas	72 horas
01-A	C	2	2	1,5	1,5
02-A	C	1	2	0,5	0,5
03-A	C	2	2	0,25	0,25
04-A	C	2	4	0,75	0,75
05-B	C	2	4	0,064	0,064
06-B	C	2	4	2	2
07-B	C	2	4	6	6
08-B	C	1	2	0,19	0,19
10-B	C	4	4	2	2
11-B	C	4	8	0,125	0,125
13-B	C	4	4	0,19	0,19
14-B	C	4	4	0,38	0,38
15-B	C	4	4	0,064	0,064
16-B	C	4	4	0,50	0,50
17-B	C	16	16	0,047	0,047
18-B	C	2	2	0,064	0,064
19-B	C	4	4	6	6
20-B	C	4	4	1	1
21-B	C	4	4	1	1
22-B	C	0,5	2	0,094	0,094
23-B	C	2	2	4	4
24-B	C	4	4	1,5	1,5
25-B	C	4	4	24	24
26-B	C	2	2	6	6
27-B	C	0,5	0,5	0,25	0,25
28-B	C	1	2	105	105
29-B	C	0,5	1	2	2
30-B	C	2	2	0,75	0,75
31-B	C	1	2	0,5	0,5
32-B	C	2	2	3	3
33-B	C	0,5	2	3	3
34-B	C	0,5	2	1,5	1,5
35-B	C	1	2	0,19	0,19
39-B	C	8	8	1,5	1,5
40-A	C	4	4	0,38	0,38
41-A	C	4	4	0,38	0,38
42-A	C	8	8	0,5	0,5
43-A	C	4	4	0,25	0,25
45-A	C	1	1	1,5	1,5
100	A	1	1	1	1
101	A	0,5	1	1	1
102	A	2	2	0,094	0,094
103	A	1	1	0,094	0,094
207-a	A	1	2	0,19	0,19
207-b	A	2	2	0,19	0,19
207-c	A	1	1	0,064	0,064
207-d	A	1	2	0,38	0,38
210	A	8	16	2	2
<i>Cryptococcus neoformans</i>	ATCC	1	2	0,064	0,064
<i>Cândida albicans*</i>	ATCC	0,25	0,5	3	3
<i>C. tropicalis*</i>	ATCC	0,5	0,5	>32	>32
<i>C. parapsilosis*</i>	ATCC	0,25	0,5	>32	>32
<i>C. glabrata*</i>	ATCC	0,5	0,5	>32	>32
<i>C. krusei*</i>	ATCC	0,5	0,5	3	3

Legenda: C - amostra clínica

A - amostra ambiental

ATCC - amostras padronizadas do American Type Culture Collection

* - leituras realizadas após 24 e 48 horas conforme recomendações do CLSI, documento M27-A2, 2002, para isolados de *Candida spp.*

Tabela 6: Valores das CIM's dos isolados clínicos e ambientais de *Cryptococcus neoformans* e amostras ATCC frente ao fluconazol pelas metodologias do CLSI e E-Test

FLUCONAZOL					
Amostra	Tipo de amostra	CLSI		E-Test	
		48 horas	72 horas	48 horas	72 horas
01-A	C	4	4	4	4
02-A	C	2	4	0,25	0,25
03-A	C	2	4	0,016	0,016
04-A	C	2	4	4	4
05-B	C	4	4	0,75	0,75
06-B	C	2	4	3	3
07-B	C	2	4	4	4
08-B	C	2	4	3	3
10-B	C	4	4	6	6
11-B	C	4	4	3	3
13-B	C	4	4	1	1
14-B	C	4	4	0,5	0,5
15-B	C	4	4	1	1
16-B	C	2	2	1	1
17-B	C	8	8	0,5	0,5
18-B	C	1	1	0,125	0,125
19-B	C	4	8	3	3
20-B	C	4	4	3	3
21-B	C	2	4	0,75	0,75
22-B	C	0,125	0,5	0,094	0,094
23-B	C	4	4	6	6
24-B	C	4	4	1	1
25-B	C	1	2	0,38	0,38
26-B	C	1	2	12	12
27-B	C	2	2	6	6
28-B	C	2	2	1,5	1,5
29-B	C	4	4	1,5	1,5
30-B	C	2	2	1	1
31-B	C	1	4	0,5	0,5
32-B	C	0,5	1	2	2
33-B	C	1	2	1,5	1,5
34-B	C	2	2	2	2
35-B	C	4	4	1	1
39-B	C	8	8	2	2
40-A	C	1	2	>256	>256
41-A	C	4	8	3	3
42-A	C	8	16	6	6
43-A	C	16	32	3	3
45-A	C	0,25	0,25	4	4
100	A	64	64	2	2
101	A	4	16	1	1
102	A	8	16	1,5	1,5
103	A	64	64	1,5	1,5
207-a	A	4	8	3	3
207-b	A	4	8	0,38	0,38
207-c	A	1	2	0,38	0,38
207-d	A	1	2	0,38	0,38
210	A	8	8	3	3
<i>Cryptococcus neoformans</i>	ATCC	1	1	0,5	0,5
<i>Candida albicans</i> *	ATCC	0,25	0,25	16	16
<i>C. tropicalis</i> *	ATCC	0,5	1	128	128
<i>C. parapsilosis</i> *	ATCC	2	4	>256	>256
<i>C. glabrata</i> *	ATCC	4	4	>256	>256
<i>C. krusei</i> *	ATCC	4	4	8	16

Legenda: C - amostra clínica

A - amostra ambiental

ATCC - amostras padronizadas do American Type Culture Collection

* - leituras realizadas após 24 e 48 horas conforme recomendações do CLSI, documento M27-A2, 2002, para isolados de *Candida spp*

Tabela 7: Valores das CIM's dos isolados clínicos e ambientais de *Cryptococcus neoformans* e amostras ATCC frente ao itraconazol pelas metodologias do CLSI e E-Test

ITRACONAZOL					
Amostra	Tipo de amostra	CLSI		E-Test	
		48 horas	72 horas	48 horas	72 horas
01-A	C	0,12	0,12	0,38	0,38
02-A	C	0,12	0,12	0,023	0,023
03-A	C	0,12	0,12	0,003	0,003
04-A	C	0,06	0,12	0,5	0,5
05-B	C	0,03	0,03	0,047	0,047
06-B	C	0,12	0,12	0,75	0,75
07-B	C	0,06	0,06	0,75	0,75
08-B	C	0,12	0,12	1	1
10-B	C	0,25	0,25	0,38	0,38
11-B	C	0,25	0,25	0,38	0,38
13-B	C	0,5	0,5	0,94	0,94
14-B	C	0,12	0,12	0,19	0,19
15-B	C	0,06	0,5	0,064	0,064
16-B	C	0,5	0,06	0,012	0,012
17-B	C	0,5	0,5	0,035	0,035
18-B	C	0,12	0,12	0,006	0,006
19-B	C	0,12	0,25	0,38	0,38
20-B	C	0,03	0,06	0,25	0,25
21-B	C	0,06	0,06	0,125	0,125
22-B	C	0,03	0,03	0,008	0,008
23-B	C	0,03	0,06	0,38	0,38
24-B	C	0,03	0,06	0,064	0,064
25-B	C	0,03	0,03	0,008	0,008
26-B	C	0,03	0,03	0,5	0,5
27-B	C	0,03	0,06	0,75	0,75
28-B	C	0,12	0,12	0,75	0,75
29-B	C	0,06	0,12	0,25	0,25
30-B	C	0,12	0,12	0,064	0,064
31-B	C	0,12	0,12	0,032	0,032
32-B	C	0,06	0,06	0,25	0,25
33-B	C	0,06	0,06	0,25	0,25
34-B	C	0,12	0,12	0,25	0,25
35-B	C	0,012	0,12	0,064	0,064
39-B	C	0,12	0,12	1	1
40-A	C	0,12	0,12	0,047	0,047
41-A	C	0,12	0,12	2	2
42-A	C	0,12	0,12	1	1
43-A	C	0,12	0,12	0,25	0,25
45-A	C	0,06	0,06	1,5	1,5
100	A	0,25	0,5	0,125	0,125
101	A	0,03	0,03	0,75	0,75
102	A	0,25	0,5	0,75	0,75
103	A	16	16	0,125	0,125
207-a	A	0,03	0,03	1,5	1,5
207-b	A	0,06	0,06	0,5	0,5
207-c	A	0,12	0,12	8	8
207-d	A	0,12	0,12	0,75	0,75
210	A	0,12	0,12	0,125	0,125
<i>C. neoformans</i>	ATCC	0,03	0,06	0,125	0,125
<i>Cândida albicans*</i>	ATCC	0,03	0,03	0,047	0,047
<i>C. tropicalis*</i>	ATCC	0,03	0,03	1	1
<i>C. parapsilosis*</i>	ATCC	0,03	0,03	1,5	1,5
<i>C. glabrata*</i>	ATCC	0,03	0,03	1	1
<i>C. krusei*</i>	ATCC	0,03	0,03	>32	>32

Legenda: C - amostra clínica

A - amostra ambiental

ATCC - amostras padronizadas do American Type Culture Collection

* - leituras realizadas após 24 e 48 horas conforme recomendações do CLSI, documento M27-A2, 2002, para isolados de *Candida spp*

Tabela 8: Valores das CIM's dos isolados clínicos e ambientais de *Cryptococcus neoformans* e amostras ATCC frente ao voriconazol pela metodologia do CLSI, documento M27-A2

VORICONAZOL			
Amostra	Tipo de amostra	CLSI	
		48 horas	72 horas
01-A	C	0,25	0,25
02-A	C	0,12	0,12
03-A	C	0,03	0,25
04-A	C	0,03	0,12
05-B	C	0,03	0,03
06-B	C	0,12	0,12
07-B	C	0,06	0,12
08-B	C	0,12	0,12
10-B	C	0,06	0,06
11-B	C	0,03	0,03
13-B	C	0,12	0,12
14-B	C	0,12	0,12
15-B	C	0,12	0,12
16-B	C	0,06	0,06
17-B	C	0,25	0,25
18-B	C	0,03	0,03
19-B	C	0,12	0,12
21-B	C	0,03	0,06
20-B	C	0,06	0,06
22-B	C	0,03	0,03
23-B	C	0,12	0,12
24-B	C	0,12	0,12
25-B	C	0,03	0,03
26-B	C	0,03	0,06
27-B	C	0,03	0,03
28-B	C	0,06	0,06
29-B	C	0,06	0,12
30-B	C	0,06	0,06
31-B	C	0,03	0,12
32-B	C	0,03	0,06
33-B	C	0,03	0,06
34-B	C	0,03	0,06
35-B	C	0,12	0,12
39-B	C	0,06	0,25
40-A	C	0,03	0,06
41-A	C	0,12	0,25
42-A	C	1	1
43-A	C	1	2
45-A	C	0,12	0,12
100	A	0,25	0,5
101	A	0,03	0,03
102	A	1	1
103	A	0,03	0,12
207-a	A	0,5	2
207-b	A	0,5	2
207-c	A	1	1
207-d	A	1	1
210	A	1	2
<i>Cryptococcus neoformans</i>	ATCC	1	2
<i>Cândida albicans*</i>	ATCC	0,06	0,12
<i>Cândida tropicalis*</i>	ATCC	1	2
<i>Cândida parapsilosis*</i>	ATCC	0,25	0,25
<i>Cândida glabrata*</i>	ATCC	1	1
<i>Cândida krusei*</i>	ATCC	0,25	0,25

Legenda: C - amostra clínica

A - amostra ambiental

ATCC - amostras padronizadas do American Type Culture Collection

* - leituras realizadas após 24 e 48 horas conforme recomendações do CLSI, documento M27-A2, 2002, para isolados de *Candida spp.*

Tabela 9: Valores das CIM's dos isolados clínicos e ambientais de *Cryptococcus neoformans* e amostras ATCC frente à terbinafina pela metodologia do CLSI

Amostra	Tipo de amostra	TERBINAFINA	
		CLSI	
		48 horas	72 horas
01-A	C	1	1
02-A	C	1	1
03-A	C	1	1
04-A	C	0,5	1
05-B	C	0,25	0,25
06-B	C	0,5	0,5
07-B	C	0,25	0,5
08-B	C	0,5	1
10-B	C	1	1
11-B	C	0,5	1
13-B	C	2	2
14-B	C	1	1
15-B	C	1	1
16-B	C	1	1
17-B	C	2	2
18-B	C	1	1
19-B	C	0,5	0,5
20-B	C	0,5	1
21-B	C	0,25	0,5
22-B	C	0,03	0,25
23-B	C	0,5	1
24-B	C	0,5	1
25-B	C	0,25	0,5
26-B	C	0,03	0,5
27-B	C	0,5	0,5
28-B	C	0,5	1
29-B	C	0,5	1
30-B	C	1	1
31-B	C	2	2
32-B	C	1	1
33-B	C	0,5	1
34-B	C	1	1
35-B	C	1	1
39-B	C	1	1
40-A	C	0,5	1
41-A	C	0,5	1
42-A	C	1	1
43-A	C	2	2
45-A	C	1	2
100	A	16	16
101	A	16	16
102	A	16	16
103	A	16	16
207-a	A	0,25	0,5
207-b	A	1	1
207-c	A	4	4
207-d	A	4	8
210	A	1	1
<i>Cryptococcus</i>	ATCC	1	1
<i>Cândida albicans*</i>	ATCC	4	8
<i>Cândida tropicalis*</i>	ATCC	8	16
<i>Candida</i>	ATCC	4	4
<i>M nkCandida</i>	ATCC	8	16
<i>Cândida krusei*</i>	ATCC	4	4

Legenda: C - amostra clínica

A - amostra ambiental

ATCC - amostras padronizadas do American Type Culture Collection

* - leituras realizadas após 24 e 48 horas conforme recomendações do CLSI, documento M27-A2, 2002, para isolados de *Candida spp*

5.5.3 Interpretação dos valores das CIMs

De acordo com os critérios interpretativos do CLSI, documento M27-A2 (2002), todos os isolados analisados (100%), ambientais e clínicos, foram sensíveis à anfotericina B (Tabela 10).

Para a metodologia da microdiluição estabelecida pelo CLSI, documento M27-A2, 2002, dentre os isolados ambientais de *Cryptococcus neoformans* frente a 5-flucitosina, uma amostra (11,1%) apresentou valor de resistência intermediária e 8 (88,9%) foram sensíveis. Quatro isolados clínicos (10,3%) apresentaram resistência intermediária e 35 (89,7%) foram sensíveis a essa droga. Em relação ao método de E-test (AB-Biodisk), todos os isolados ambientais (100%) foram sensíveis e dois (5,1%) daqueles de origem clínica foram resistentes a 5-flucitosina (Tabela 10).

Para o fluconazol, de acordo com a metodologia da microdiluição utilizada neste trabalho, entre os isolados ambientais, dois (22,2%) apresentaram sensibilidade dose-dependente, dois (22,2%) resistência e cinco (55,6%) sensibilidade. Entre os isolados clínicos, dois (5,1%) apresentaram susceptibilidade de acordo com a dose e 37 (94,9%) apresentaram-se sensíveis. Pelo método do E-Test, todos os nove (100%) isolados ambientais foram sensíveis a este antifúngico; já em relação aos isolados clínicos um (2,6%) deles apresentou resistência e 38 (97,4%) apresentaram-se sensíveis (Tabela 10).

De acordo com os valores obtidos de CIMs para os isolados ambientais frente ao itraconazol pelo método da microdiluição, dois (22,2%) foram sensíveis dose dependente e sete (78,8%) sensíveis. Segundo os resultados obtidos pelo método do E-Test, dentre os isolados ambientais, três (33,3%) apresentaram sensibilidade dose dependente, um (11,1%) foi resistente e cinco (55,6%) foram sensíveis. Dentre os isolados clínicos, 18 (46,2%) foram susceptíveis dose-dependente, quatro (10,3%) foram resistentes e 17 (43,5%) sensíveis (Tabela 11).

No presente trabalho, tanto os isolados ambientais, quanto os isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans*, apresentaram valores de CIMs, frente ao

voriconazol entre 0,03 e 16 µg/mL, que correspondem a variação estimada pelo CLSI, documento M27-A2 (2002) (Tabela 11).

Em relação à terbinafina todos os isolados ambientais e clínicos (100%) apresentaram valores de CIMs menores ou iguais a 2 µg/mL, sendo que 25 isolados (87,2%) apresentaram CIMs menores ou iguais a 1 µg/mL e o valor médio obtido foi de 1 µg/mL. Em relação aos isolados ATCC de *Candida* spp. incluídas na análise para efeitos comparativos, o valor médio de CIM obtido foi 9,6 µg/mL, ou seja, 9,6 vezes maior que o valor médio da CIM para os isolados de *Cryptococcus neoformans* em questão (Tabela 11).

Os valores das concentrações inibitórias mínimas capazes de inibir 50% e 90%, respectivamente CIM₅₀ e CIM₉₀, dos isolados ambientais e clínicos de *Cryptococcus neoformans* frente às drogas antifúngicas anfotericina B, 5-flucitosina, fluconazol, itraconazol, voriconazol e terbinafina, de acordo com as metodologias do CLSI e E-Test, estão nas tabelas 12 e 13.

Tabela 10: Interpretação da susceptibilidade *in vitro*, em quantidade e porcentagem, dos isolados ambientais e clínicos de *Cryptococcus neoformans* frente às drogas anfotericina B, 5-flucitosina e fluconazol, segundo as metodologias do CLSI e E-test.

METODOLOGIA	TIPO DE ISOLADO	INTERVALO DE LEITURA	DROGA ANTIFÚNGICA						
			ANFOTERICINA B	5-FLUOCITOSINA			FLUCONAZOL		
			PERFIL SUSCEPTIBILIDADE	PERFIL SUSCEPTIBILIDADE			PERFIL SUSCEPTIBILIDADE		
			S ≤1*	S ≤4	I 8-16	R ≥32	S ≤8	SDD 16-32	R ≥64
CLSI	AMBIENTAL	48 H	9(100%)	8(88,9%)	1(11,1%)	0	7(77,8%)	0	2(22,2%)
		72 H	9(100%)	8(88,9%)	1(11,1%)	0	5(55,6%)	2(22,2%)	2(22,2%)
	CLÍNICO	48H	39(100%)	36(92,3%)	3(7,7%)	0	38(97,4%)	1(2,6%)	0
		72 H	39(100%)	35(89,7%)	4(10,3%)	0	37(94,9%)	2(5,1%)	0
	AMBIENTAL	48 H	9(100%)	9(100%)	0	0	9(100%)	0	0
		72 H	9(100%)	9(100%)	0	0	9(100%)	0	0
E-TEST	CLÍNICO	48H	39(100%)	37(94,9%)	0	2(5,1%)	38(97,4%)	0	5(2,6%)
		72 H	39(100%)	37(94,9%)	0	2(5,1%)	38(97,4%)	0	5(2,6%)

Legenda:

- H - Horas
- S - Sensível
- SDD - Sensível Dose Dependente
- I - Intermediário
- R - Resistente
- * - Valores de referência em µg/mL

Tabela 11: Interpretação da susceptibilidade *in vitro*, em quantidade e porcentagem, dos isolados ambientais e clínicos de *Cryptococcus neoformans* frente às drogas itraconazol, voriconazol e terbinafina, segundo as metodologias do CLSI e E-test

METODOLOGIA	TIPO DE ISOLADO	INTERVALO DE LEITURA	DROGA ANTIFÚNGICA					
			ITRACONAZOL			VORICONAZOL		TERBINAFINA
			PERFIL			PERFIL		PERFIL
			SUSCEPTIBILIDADE			SUSCEPTIBILIDADE		SUSCEPTIBILIDADE
			S ≤0,125*	SDD 0,25 – 0,5	R ≥1	S ≤16	S <8	R ≥8
CLSI	AMBIENTAL	48 H	6(66,7%)	2(22,2%)	1(11,1%)	9(100%)	5(55,6%)	4(44,4%)
		72 H	6(66,7%)	2(22,2%)	1(11,1%)	9(100%)	4(44,4%)	5(55,6%)
	CLÍNICO	48H	34(87,2%)	5(55,6%)	0	39(100%)	39(100%)	0
		72 H	32(82,1%)	7(77,8%)	0	39(100%)	39(100%)	0
	AMBIENTAL	48 H	3(32,3%)	4(44,4%)	2(22,2%)	**	**	**
		72 H	3(32,3%)	4(44,4%)	2(22,2%)	**	**	**
	CLÍNICO	48 H	15(38,5%)	19(48,7%)	5(12,8%)	**	**	**
		72 H	15(38,5%)	19(48,7%)	5(12,8%)	**	**	**

Legenda:

- H - Horas
- S - Sensível
- SDD – Sensível Dose Dependente
- I – Intermediário
- * - Valores de referência em µg/mL
- ** - Não foram realizadas as determinações das CIM pela metodologia do E-test para voriconazol e terbinafina.

Tabela 12: Valores das concentrações inibitórias mínimas capazes de inibir 50% e 90% do crescimento dos isolados ambientais e clínicos de *Cryptococcus neoformans* frente às drogas antifúngicas anfotericina B, 5-fluocitosina e fluconazol de acordo com as metodologias do CLSI e E-Test.

METODOLOGIA	TIPO DE ISOLADO	DROGA ANTIFÚNGICA											
		ANFOTERICINA B				5-FLUOCITOSINA				FLUCONAZOL			
		48 H		72 H		48 H		72 H		48 H		72 H	
		CIM ₅₀	CIM ₉₀	CIM ₅₀	CIM ₉₀	CIM ₅₀	CIM ₉₀	CIM ₅₀	CIM ₉₀	CIM ₅₀	CIM ₉₀	CIM ₅₀	CIM ₉₀
CLSI	AMBIENTAL	0,12	0,12	0,25	0,25	1	2	2	2	4	≥64	8	≥64
	CLÍNICO	0,12	0,25	0,25	0,5	2	4	4	8	2	8	4	8
E-TEST	AMBIENTAL	0,047	0,094	0,047	0,094	0,19	1	0,19	1	1,5	3	1,5	3
	CLÍNICO	0,047	0,094	0,047	0,094	0,75	6	0,75	6	3	6	3	6

Legenda: H - Horas
 CIM₅₀ - Concentração inibitória mínima capaz de inibir 50% do crescimento
 CIM₉₀ - Concentração inibitória mínima capaz de inibir 90% do crescimento
 ** - Não foram realizadas as determinações das CIM pela metodologia do E-test para voriconazol e terbinafina.

Tabela 13: Valores das concentrações inibitórias mínimas capazes de inibir 50% e 90% dos crescimentos dos isolados ambientais e clínicos de *Cryptococcus neoformans* frente às drogas antifúngicas itraconazol, voriconazol e terbinafina de acordo com as metodologias do CLSI e E-Test

METODOLOGIA	TIPO DE ISOLADO	DROGA ANTIFÚNGICA											
		ITRACONAZOL				VORICONAZOL				TERBINAFINA			
		48 H		72 H		48 H		72 H		48 H		72 H	
		CIM ₅₀	CIM ₉₀	CIM ₅₀	CIM ₉₀	CIM ₅₀	CIM ₉₀	CIM ₅₀	CIM ₉₀	CIM ₅₀	CIM ₉₀	CIM ₅₀	CIM ₉₀
CLSI	AMBIENTAL	0,12	0,25	0,12	0,5	0,5	1	1	2	4	16	8	16
	CLÍNICO	0,12	0,25	0,12	0,25	0,06	0,25	0,12	0,25	0,5	2	1	2
E-TEST	AMBIENTAL	0,25	1	0,25	1	**	**	**	**	**	**	**	**
	CLÍNICO	0,75	1,5	0,75	1,5	**	**	**	**	**	**	**	**

Legenda: H - Horas
 CIM₅₀ - Concentração inibitória mínima capaz de inibir 50% do crescimento
 CIM₉₀ - Concentração inibitória mínima capaz de inibir 90% do crescimento
 ** - Não foram realizadas as determinações das CIM pela metodologia do E-test para voriconazol e terbinafina.

5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliar se existiram diferenças entre as seis drogas antifúngicas testadas, nos intervalos de leitura de 48 e 72 horas, para cada metodologia, CLSI e E-test, e para os dois tipos de amostras, clínicas e ambientais, foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Quando foram detectadas diferenças estatisticamente significativas foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Para a metodologia CLSI ocorreram 15 combinações possíveis dos antifúngicos, sendo assim o nível de significância a ser considerado 0,003 ($0,05/15=0,003$). Para a metodologia do E-test, uma vez que só foram testados quatro antifúngicos, ocorreram seis possíveis combinações, portanto o nível de significância a ser considerado foi 0,008 ($0,05/6=0,008$). Desta forma, somente os valores de p menores do que esses foram consideradas diferenças estatisticamente significativas. Uma vez que existia diferença entre os seis antifúngicos foi necessário identificar as diferenças entre todos os pares possíveis. Para isso foi utilizado o teste de Mann-Whitney. A fim de caracterizar as amostras foram obtidas estatísticas descritivas para as medidas de interesse. Com o objetivo de avaliar se existia diferença estatisticamente significativa, para cada um dos antifúngicos, considerando o tipo de amostra, os intervalos de leitura e as metodologias, foi realizado o teste não paramétrico de Wilcoxon.

Para o antifúngico 5-flucitosina existe diferença estatisticamente significativa (valor-p=0,001) para as amostras clínicas, entre as concentrações quando se utilizou a metodologia do CLSI nos dois intervalos avaliados (48 e 72 horas). Resultado semelhante foi observado para os antifúngicos anfotericina B (valor-p =0,000), fluconazol (valor-p =0,000) e para o voriconazol (valor-p =0,001).

Para as amostras ambientais foram observadas diferenças estatisticamente significativas para metodologia CLSI com 48 e 72 horas para os antifúngicos fuconazol (valor-p=0,027) e voriconazol (valor-p = 0,042).

Foi observada diferença estatisticamente significativa entre as concentrações, para as duas metodologias testadas consideradas com nos intervalos de leitura de 48 e 72 horas, para os diferentes antifúngicos. Só não se observou diferença estatisticamente significativa para o fluconazol com relação aos isolados clínicos, considerando os intervalos de leitura de 48 e 72 horas dentro das metodologias CLSI e E-test avaliadas.

Foi observada diferença estatisticamente significativa (valor- $p=0,000$) e entre os intervalos de leitura de 48 e 72 horas de acordo com a metodologia do CLSI. Para esta análise foi utilizado o teste de Wilcoxon.

Para comparar as metodologias utilizadas em cada intervalo de leitura, separadamente, utilizou-se o teste de Mann-Whitney. Observou-se que existe diferença entre as metodologias para 72 horas (valor- $p=0,002$).

O teste de Mann-Whitney também foi utilizado para avaliar se existe diferença entre tipos de amostra de acordo com a metodologia utilizada. Observou-se que existia diferença estatisticamente significativa entre amostra clínica e ambiental para a metodologia CLSI, tanto no intervalo de leitura de 48 quanto de 72 horas.

Neste trabalho foi utilizado um gráfico conhecido como *boxplot*, particularmente útil para comparar a distribuição de amostras em diferentes grupos. Para a construção do *boxplot* são utilizadas as seguintes estatísticas: mínimo, primeiro quartil (valor que deixa 25% dos dados abaixo), terceiro quartil (valor que deixa 75% dos dados abaixo) e máximo. A metade central dos dados, do primeiro ao terceiro quartil, é representada através de um retângulo, sendo a mediana representada através de uma barra. Duas linhas conectam o primeiro quartil (Q_1) ao mínimo e o terceiro quartil (Q_3) ao máximo da amostra. A Figura 2.1 ilustra a construção desse gráfico. Além das quantidades já mencionadas, pontos atípicos (ou outliers) são plotados no gráfico quando presentes em um conjunto de dados.

Figura 8: Construção do gráfico *Boxplot*

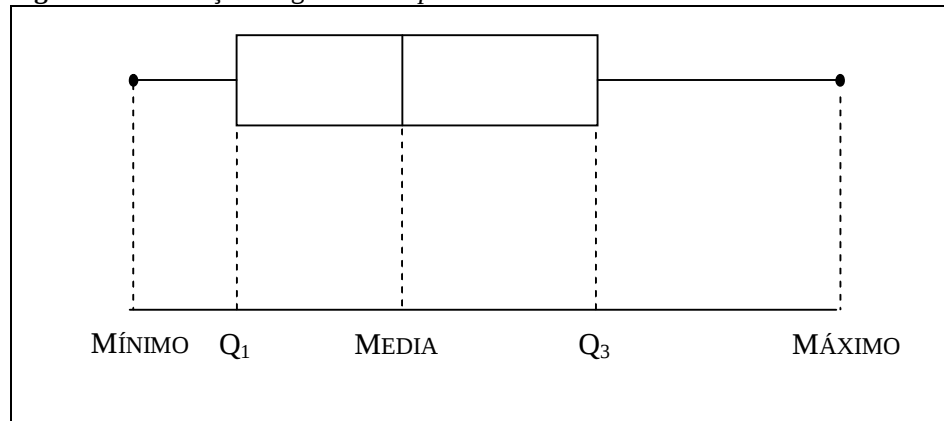


Figura 9: *Boxplot* das CIM ($\mu\text{g/mL}$) dos isolados de *Cryptococcus neoformans*, comparando os intervalos de leitura 48 e 72 horas

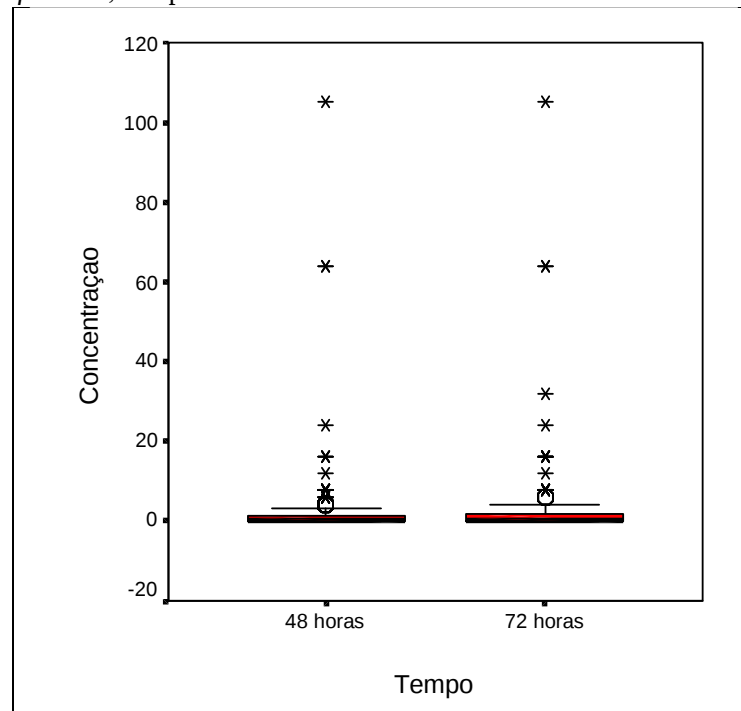
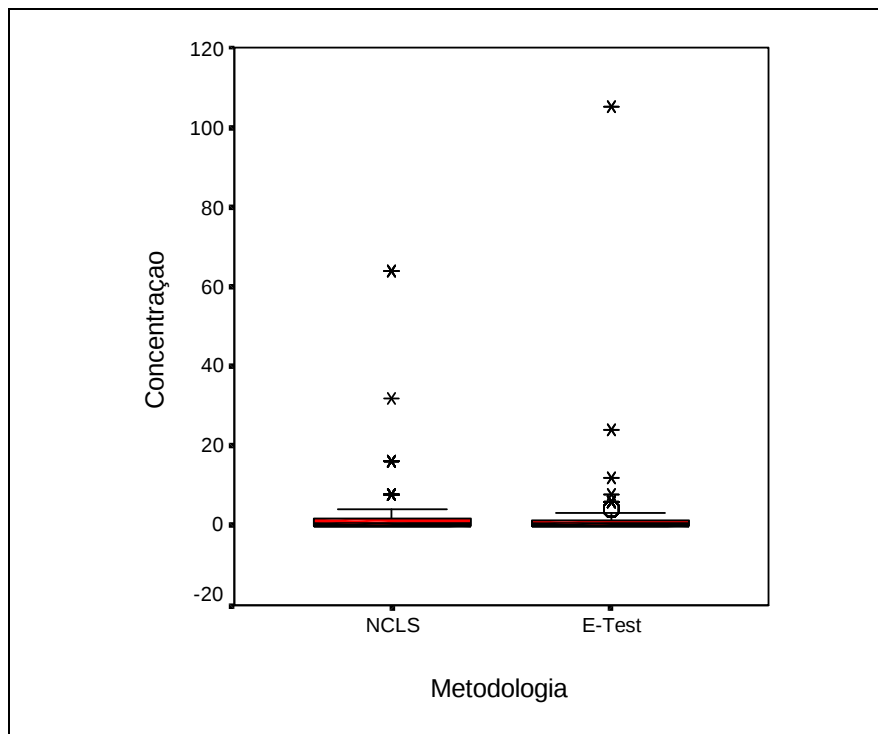


Figura 10: *Boxplot* das CIMs ($\mu\text{g/mL}$) dos isolados de *Cryptococcus neoformans*, comparando as metodologias CLSI e E-test



6 DISCUSSÃO

O *Cryptococcus neoformans*, anteriormente variedade *neoformans* tem sido isolado de diversas fontes ambientais e sua associação com fezes de aves, especialmente pombos, já foi evidenciada por numerosos trabalhos. Outros isolados ambientais têm sido encontrados em muitos tipos de solo, animais e pássaros. Todos os isolados obtidos neste trabalho foram pertencentes a esta variedade, o que confirma, mais uma vez a presença desta em fezes de pombos.

Em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, foram coletadas 20 amostras de excretas de aves em distintos ambientes, que foram semeadas em meio ágar níger com o objetivo de isolar *Cryptococcus neoformans*. Este fungo foi isolado em 10 amostras (50%) comprovando sua ocorrência saprofítica nesta cidade (FILIÚ et al., 2002).

Em Santiago de Cali, Colômbia, foi realizado estudo em 119 amostras de acúmulos de fezes de pombos, com o objetivo de estabelecer a presença do *Cryptococcus neoformans*. Este fungo foi isolado em 59 amostras (49,6 %) demonstrando assim sua presença em perímetro urbano e a importância de empreender campanhas para evitar o acúmulo de excretas animais.

Neste trabalho, foram obtidos 09 isolados de *Cryptococcus neoformans* a partir das amostras ambientais. Todos os isolados obtidos foram provenientes de fezes de pombos coletadas nas dependências da UFMG e corresponderam a um índice de positividade de 5,5%, quando comparado ao total de amostras de excretas de aves e 25 % quando comparado apenas ao número de amostras de excretas de pombos. Diferenças na ocorrência dos isolados deste trabalho podem ter sido devidas à diversidades entre os ensaios, bem como por características distintas das amostras, já que em grande parte dos locais de coletas das excretas das aves observou-se condições satisfatórias de higienização, evitando, assim, acúmulo das mesmas.

De forma marcante, nas regiões Sul e Sudeste, nas duas últimas décadas, predominou a associação da doença criptocócica com AIDS, em homens, com prevalência do *C. neoformans*, chegando a atingir índices de 8 a 12%, nos centros de referência da Região Sudeste (CAVALCANTI, 1995). Em estudo realizado no Meio Norte do país (Maranhão-Piauí), no período de 1986 a 1995 observou-se que mais de 90% dos casos de criptococose em indivíduos aparentemente normais do ponto de vista imunológico, são causados pelo *C. gattii*, que é endêmica na região (LAZÉRA et al., 2004). Neste trabalho, todos os isolados clínicos foram identificados como pertencentes à espécie *C. neoformans*, o que confirma sua prevalência no estado de Minas Gerais.

Como o fungo *Cryptococcus* spp. tem acesso ao hospedeiro através da inalação de propágulos infecciosos oriundos de fontes ambientais, a infecção pulmonar pode ser a manifestação primária da doença. Os pulmões são o segundo sítio mais comumente envolvido. A expressão clínica é variável, oscilando entre a forma assintomática e a doença pulmonar disseminada é associada, geralmente, a nódulos pulmonares. A doença pulmonar focal é mais comum quando a micose é ocasionada pelo *C. gattii* pois em geral, o *C. neoformans* causa, em geral, doença pulmonar disseminada. O *C. gattii* não tem sido frequentemente isolado de espécimens clínicos como sangue e urina ao contrário do ocorre em de pacientes imunossuprimidos, cuja doença é causada, em sua maioria, pelo *C. neoformans* (SPEED e DUNT, 1995; RUFINO e SWINNE, 1998; CHEN et al, 2000; SORRELL, 2001).

Diferenças na patogênese das infecções causadas pelas espécies, *C. neoformans* e *C. gattii*, na interação fungo-hopedeiro poderiam justificar a predominância da micose causada pela espécie *C. neoformans* em indivíduos com reação sorológica positiva para HIV, já que a pequena exposição às fontes ambientais à outra espécie seria insuficiente para explicar as diferenças nas áreas onde a criptococose devido a esta espécie é endêmica (PASSONI et al., 1998).

As manifestações clínicas da criptococose em pacientes com AIDS geralmente se dão por febre e cefaléia, mal-estar e vômitos, podendo ocorrer em 7 a 8 % dos pacientes, lesões cutâneas, simulando molusco contagioso (LACAZ et al., 2002). Podem ocorrer também náuseas e dispnéia, sendo que os sintomas pulmonares se devem a outras manifestações clínicas como, por exemplo, pneumonia por *Pneumocystis carinii*. Apenas uma pequena porcentagem chega a apresentar sintomas de meningite, como pescoço rígido, fotofobia ou visão dupla. Usualmente podem ocorrer sintomas orais, linfadenopatia difusa e perda de peso. Em 12 a 18% observa-se sonolência e confusão (KOWN-CHUN e BENNETT, 1992).

O principal determinante da diferença entre as espécies *C. neoformans* e *C. gattii* na apresentação clínica da criptococose é o estado imunológico do paciente. Ao contrário dos pacientes infectados pelo *C. neoformans*, aqueles acometidos pela doença determinada pelo *C. gattii* são, em sua maioria, imunocompetentes. As infecções geralmente requerem prolongada terapia antifúngica e estão associadas com seqüelas neurológicas e intervenção neurocirúrgica (SORREL, 2001).

Através dos dados coletados nos prontuários médicos dos pacientes com amostras avaliadas neste trabalho, observou-se que, se tratavam, em sua maioria, de pacientes imunossuprimidos, sendo grande a porcentagem de pacientes com AIDS que apresentavam sintomatologia e outras patologias concomitantes, semelhante às descritas por demais autores.

Para o *Cryptococcus neoformans*, são encontrados numerosos trabalhos empregando metodologias diversas para a determinação da CIM frente às drogas antifúngicas. Inúmeros trabalhos no Brasil e no mundo têm sido publicados para auxiliar na validação destas metodologias. Tais trabalhos servem como base não só para a pesquisa mas, principalmente, para auxiliar no entendimento da terapia antifúngica e suas implicações no desenvolvimento de fenótipos resistentes (PAPPALARDO e MELHEM, 2003).

Foram utilizadas, neste trabalho, duas metodologias de grande importância que vêm sendo alvos de numerosos estudos. A metodologia da microdiluição em placa foi sugerida pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2005), documento M27-A2, 2002, e o método baseado em ágar-difusão, E-test, desenvolvido por AB-Biodisk (Solna, Suécia). Estas foram escolhidas por possuírem fundamentos diversos e por serem de grande confiabilidade.

Pfaller et al. (1988), ao compararem metodologias, na época disponíveis, para execução de provas de susceptibilidade antifúngicos, elegeram o preparo do inóculo pela utilização de espectrofotometria. Ainda outros autores têm utilizado, com sucesso inóculos da ordem de 10^3 ou 10^4 células por mililitro (cel/mL) para realização destes testes, o que justificou o emprego da concentração celular de 10^3 no presente trabalho.

O CLSI (2005) propõe a utilização do meio de referência RPMI-1640 para a execução dos testes de susceptibilidade às drogas antifúngicas. No entanto, este muitas vezes não provê um crescimento satisfatório de *Cryptococcus* spp., mesmo após incubação por 72 horas. O RPMI-1640 acrescido de 2% de glicose e o meio YNB (Yeast Nitrogen Base, Difco) se compararam, favoravelmente, ao meio de referência (RPMI-1640 sem 2% de glicose), e provêm um melhor crescimento da levedura após 48 horas, facilitando a determinação do ponto de corte sem alterar significativamente os valores de CIMs obtidos na primeira situação (ESPINEL-INGROFF et al., 1998). Alguns trabalhos publicados referentes à avaliação da influência de vários meios de cultura nos resultados dos testes com antifúngicos demonstram que o YNB constitui o melhor meio a ser empregado nestes experimentos (SHADOMY et al., 1987; GHANNOUM et al., 1992; DERMOUMI, 1994). No presente trabalho optou-se pela utilização do meio RPMI-1640 acrescido de 2% de glicose o qual permitiu crescimento satisfatório, nas condições de temperatura, 35°C, e períodos de incubação, 48 e 72 horas, dos isolados testados (ESPINEL-INGROFF et al., 1998)

Soares e Hamdan (2004), em estudo com isolados clínicos de *C. gattii*, através da metodologia de microdiluição do CLSI (2005), documento M-27A, 1997, obtiveram 4% de isolados sensíveis, 85% sensíveis dose dependente e 11% resistentes ao fluconazol. Para o itraconazol, 81% dos isolados foram sensíveis e 19% foram sensíveis dose dependente. Em relação à anfotericina B e terbinafina, 100% dos isolados foram classificados como sensíveis *in vitro*. Nesta mesma análise, utilizando a metodologia do E-test, as porcentagens de isolados sensíveis, sensíveis dose dependentes e resistentes, foram, respectivamente, 6%, 12% e 82% para o fluconazol. Em relação à anfotericina B, 100% dos isolados foram considerados sensíveis. Para as amostras ambientais, 8% foram consideradas sensíveis, 15% sensíveis dose dependente e 77% resistentes ao fluconazol. Em relação à anfotericina B, 100% das amostras apresentaram sensibilidade.

Franzot e Hamdan (1995) avaliaram, a partir de amostras brasileiras, a susceptibilidade *in vitro* de isolados ambientais e clínicos de *Cryptococcus* spp. frente aos azólicos cetoconazol, fluconazol e itraconazol, de acordo com a técnica do CLSI, pelo método de macrodiluição, preconizado no documento M27-P, 1992. Em geral os resultados demonstraram homogeneidade entre os isolados clínicos e ambientais. O fluconazol apresentou menor atividade que o cetoconazol e o itraconazol.

Calvo-Morales et al. (1999), avaliaram a susceptibilidade frente à anfotericina-B, 5-flucitosina, itraconazol e fluconazol de 33 isolados de *Cryptococcus* spp. a partir de amostras clínicas de diferentes regiões do Brasil. Não foi encontrado nenhum isolado resistente às drogas testadas, entretanto 3% se apresentaram como sensíveis dose-dependente em relação ao fluconazol.

Alves et al. (2001), avaliaram 69 isolados clínicos de pacientes com AIDS e 13 isolados ambientais de *Cryptococcus* spp., pela técnica de microdiluição do CLSI (2005), documento M27-A, 1997, frente à anfotericina-B, itraconazol e cetoconazol. Os autores obtiveram resultados bastante similares entre isolados clínicos e

ambientais, entretanto os de origem clínica foram menos sensíveis ao fluconazol do que aqueles oriundos de fontes ambientais.

Fernandes et al. (2003), testaram *in vitro* a susceptibilidade de 60 isolados de *C. neoformans* de pacientes com AIDS da cidade de Goiânia, frente ao fluconazol, itraconazol e anfotericina-B pelo método da macrodiluição, segundo o CLSI (2005), documento M27-A, 1997. Nenhum dos isolados apresentou resistência ao itraconazol e anfotericina-B, entretanto, quatro isolados foram resistentes ao fluconazol.

Fernandes et al. (2003) observaram em seus resultados que os valores de CIMs para *C. gattii* foram superiores aos encontrados para *C. neoformans* para o fluconazol, o itraconazol e a anfotericina B.

Franzot & Casadevall (1997) testaram a susceptibilidade de 18 amostras de *Cryptococcus* spp. frente às drogas antifúngicas fluconazol, anfotericina B e pneumocandina e ainda às combinações entre estas drogas. Foram obtidas CIMs entre 1 a 128 µg/mL para a anfotericinaB e 16 a 32 µg/mL para a pneumocandina.

Em relação à terbinafina, há escassez de dados relativos à susceptibilidade de isolados de *Cryptococcus* spp. Ryder et al. (1998) observaram uma elevada atividade da droga frente à espécies de *Cryptococcus* e, ainda, esta ação foi superior à do fluconazol.

A susceptibilidade de um total de 53 isolados ambientais e clínicos de *Cryptococcus* spp. frente à anfotericina-B, 5-flucitosina, cetoconazol, fluconazol e itraconazol, de acordo com a técnica do NCCLS (CSLI, 2005), documento M27-P (1992) demonstraram homogeneidade entre os isolados clínicos e ambientais. Dentre os azólicos, o fluconazol apresentou menor atividade que o cetoconazol e itraconazol (FRANZOT e HAMDAN, 1996).

Em estudo realizado com 33 isolados de *Cryptococcus* spp. frente à anfotericina-B, 5-flucitosina, itraconazol e fluconazol não foi encontrados nenhuma

amostra resistente. Os isolados foram obtidos a partir de amostras clínicas de diferentes regiões do Brasil; entretanto, 3% se apresentaram com sensibilidade dependente da dose em relação ao fluconazol (CALVO-MORALES et al., 1999).

Foi observada alta susceptibilidade em 100 isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. a partir de amostras de pacientes no Brasil (69 isolados), Chile (11 isolados) e Venezuela (20 isolados). O método utilizado foi o da microdiluição em meio líquido, segundo a técnica do NCCLS (CLSI, 2005), documento M27-A ,1997 (CALVO et al., 2001).

Foram avaliados 69 isolados clínicos de pacientes com AIDS e 13 isolados ambientais de *Cryptococcus* spp., através do documento do NCCLS (CLSI, 2005), documento M27-A (1997) frente à anfotericina-B, itraconazol e cetoconazol. Os resultados clínicos e ambientais obtidos foram bastante similares, porém os de origem clínica foram menos susceptíveis ao fluconazol do que aqueles oriundos de fontes ambientais (ALVES et al., 2001).

Carrillo-Muñoz et al. (1997), testaram 181 isolados pertencentes à espécies do gênero *Candida* e 21 de *Cryptococcus* spp. Estes autores destacaram, em seus resultados, a elevada porcentagem de sensibilidade à anfotericina B e a ausência de resistência a este poliênico, tendo observado 100% de sensibilidade aos azólicos e 19% de resistência a 5-flucitosina entre as amostras de *Cryptococcus* spp.

Foram realizados testes de susceptibilidade em 64 isolados ambientais e clínicos de *C. neoformans* e *C. gattii* frente à anfotericina-B, 5-flucitosina, fluconazol e itraconazol, segundo recomendações do CLSI (2005), documento M27-A2, bem como pela metodologia da macrodiluição em meio líquido, de acordo com Shadomy et al. (1987). Não foram observadas diferenças significativas entre as duas metodologias e nem entre os valores de sensibilidade entre isolados clínicos e ambientais. Em linhas gerais, os isolados foram mais sensíveis ao fluconazol e anfotericina-B pelo método do CLSI. Apenas um isolado de *C. gattii* exibiu alta

resistência à anfotericina-B, pelo método de Shadomy et al. (1987) (MORAES et al., 2003).

A susceptibilidade *in vitro* de 60 isolados de *Cryptococcus* spp. de pacientes com AIDS da cidade de Goiânia, Brasil, frente ao fluconazol, itraconazol e à anfotericina-B foi determinada pelo método da microdiluição, segundo o NCCLS (CLSI), documento M27-A (1997). Nenhum dos isolados apresentou resistência ao itraconazol e a anfotericina-B, entretanto, quatro isolados foram resistentes ao fluconazol (FERNANDES et al., 2003).

Ellis et al. (1999) avaliaram a atividade *in vitro* da terbinafina comparada ao fluconazol frente a 205 isolados de *Cryptococcus* spp. obtidos de amostras clínicas e ambientais. Foram realizados testes de susceptibilidade segundo a metodologia de microdiluição, de acordo com padronização do CLSI (2005), documento M27-A, 1997. Os resultados obtidos demonstraram que a terbinafina pode ser usada para tratamento de criptococose, já que efeito sinérgico entre esta droga e fluconazol foi claramente demonstrado.

Chang et al. (2001) analisaram o perfil de sensibilidade para isolados de *C. neoformans* e *C. gattii*, frente ao fluconazol, itraconazol e 5-flucitosina, segundo a metodologia do E-test (AB-Biodisk, Solna, Suécia), e obtiveram 5,8%, 11,6% e 0,7% de sensibilidade dose dependente e 3,2%, 12% e 4,3% de resistência para estas respectivas drogas. Os autores observaram ainda que o *C. gattii* apresenta menor sensibilidade ao fluconazol do que o *C. neoformans*.

De Bedout et al. (1999) compararam as susceptibilidades a antifúngicos de isolados clínicos de *C. neoformans* e *C. gattii* e observaram que dentre os 35 isolados, 80% foram sensíveis à anfotericina B, ao fluconazol e ao itraconazol, independente da espécie.

De maneira geral, os resultados obtidos neste trabalho, estão de acordo com os registros da literatura: altas taxas de sensibilidade à anfotericina B e terbinafina;

valores de CIMs mais elevados para fluconazol, porém com maiores taxas de sensibilidade a este azólico do que ao itraconazol; alta taxa de sensibilidade ao voriconazol e baixas porcentagens de resistência ou de resistência intermediária à 5-flucitosina

7 CONCLUSÕES

Todos os isolados ambientais de *Cryptococcus neoformans* foram obtidos a partir de fezes de pombos coletadas nas dependências do campus da Universidade Federal de Minas Gerais evidenciando, mais uma vez, a associação direta deste fungo com excretas de aves.

Os isolados clínicos adquiridos foram comprovados com sendo pertencentes à espécie *Cryptococcus neoformans*.

Cryptococcus neoformans confirmou seu caráter oportunista, já que todos os isolados obtidos a partir de amostras clínicas eram provenientes de pacientes imunossuprimidos.

A anfotericina B apresentou melhor desempenho, maior atividade *in vitro*, contra todos os isolados testados, tanto ambientais quanto clínicos, considerando as duas metodologias utilizadas e os intervalos de incubação de 48 e 72 horas.

Através da metodologia de microdiluição sugerida pelo CLSI, o voriconazol demonstrou considerável atividade *in vitro*, tanto em relação aos isolados clínicos quanto ambientais, nos intervalos de 48 e 72 horas.

Segundo a metodologia da microdiluição do CLSI, considerando todos os isolados clínicos testados, a terbinafina também apresentou atividade *in vitro* satisfatório, demonstrando a possibilidade de sua utilização contra a criptococose humana.

A 5-flucitosia apresentou atividade *in vitro* contra os isolados de *C. neoformans*, já que foram encontradas altas taxas de isolados sensíveis a esta droga.

De modo geral, comparando-se a metodologia de microdiluição e E-teste, a segunda apresentou valores menores de Concentrações Inibitórias Mínimas dos

isolados, em relação às drogas 5-flucitosina e fluconazol, conseqüentemente, ocorreram taxas de sensibilidade maiores para estas drogas.

O contrário ocorreu em relação ao itraconazol, em que maiores porcentagens de isolados mais sensíveis foram determinados pela metodologia de microdiluição, preconizada pelo CLSI.

Sob aspectos gerais, o fluconazol apresentou melhor atividade *in vitro* do que o itraconazol frente aos isolados ambientais e clínicos considerando as duas metodologias utilizadas.

Apesar do reduzido número de isolados ambientais obtidos neste trabalho, ocorreu uma tendência à maior resistência neste grupo de isolados do que nos isolados clínicos, principalmente em relação às drogas fluconazol, itraconazol e terbinafina.

Diferenças estatisticamente significativas foram encontradas nos valores de CIMs frente às drogas antifúngicas ao se comparar as duas metodologias estudadas, tanto no intervalo de leitura de 48 quanto 72 horas.

Com relação ao itraconazol, ocorreu discrepância entre as taxas de sensibilidade e sensibilidade-dose-dependente, considerando as duas metodologias estudadas, tanto no intervalo de 48 quanto 72 horas.

Ambas as metodologias apresentaram-se como alternativas para determinação da CIM e conseqüente interpretação do perfil de sensibilidade de isolados de *Cryptococcus neoformans* frente às drogas antifúngicas testadas. Entretanto, devem ser levar em consideração aspectos de custo-benefício e execução dos ensaios, já que na metodologia do E-test as tiras impregnadas com antifúngicos possuem custo oneroso e a metodologia de microdiluição é bastante trabalhosa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, S. H.; OLIVEIRA, L. T.; COSTA, J. M.; LUBECK, I.; CASALI, A. K.; VAINSTEIN, M. H. *In vitro* susceptibility to antifungal agents of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolated in southern of brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, São Paulo, v. 43, n. 5, p. 267-270, 2001.

AMANUEL, Y. W. & JEMANEH, L. Isolation and characterization of *Cryptococcus neoformans* from environmental sources in Ethiopia. *The Ethiop. Jour. of Health Dev.*, Addis Ababa, v. 15, p. 45-50, 2001.

ANDREU, C. M. F.; MACHIN, G. M.; ZARAGOZÍ, M. T. I.; LANCHÁ, M. P.; MIRANDA, M. G. Identificación de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* em aislamientos clínicos cubanos. *Rvis. Cub. Med. Trop.*, v. 50, n. 2, p.167-169, 1998.

BARÓ, T.; MORERA, Y.; TORRES-RODRÍGUES, J. M.; ALÍA, C.; LAZÉRA, M. Estudio de muestras de polvo doméstico para el aislameinto ambiental de *Cryptococcus neoformans*. *Rev. Iberoam. Micol.*, Rio de Janeiro, v. 15, p. 309, 1998.

BARTLETT, K. H.; MACDOUGALL, L.; MAK, S.; DUNCAN, C.; KIDD, S.; FYFE, M. *Cryptococcus gattii*, a tropical pathogen emerging in a temperate clima zone. *Hum. Biometeo.: Model. Pred.*, Session 5, 2004.

BENHAN, R. W. Cryptococci: their identification by morphology and serology. *J. Infect. Dis.*, 57: 255-274,1935. *apud* LAZÉRA, M. S.; IGREJA, R. P.; WANKE, B. Criptococose. In: SIDRIM, J. J. C. e ROCHA, M. F. G. (Ed.). *Micol. Méd. Luz Aut. Contem*, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 2004, p.252-264.

BHATTACHARJEE, A. K.; KWON-CHUNG, K. J.; GLAUDEMANS, P.J. Capsular polysaccharides from a parent strain and from a possible, mutant strain of *Cryptococcus neoformans* sorotype A. *Carboh. Res.*, Amsterdam, v. 95, p.237-248, 1981.

BHATTACHARJEE, A. K.; KWON-CHUNG, K. J.; GLAUDEMANS, P.J. The major capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans* sorotype B. *Carboh. Res.*, Amsterdam, v. 233, p. 271-272, 1992.

BRUESKE, C. H. Proteolytic activity of a clinical isolate of *Cryptococcus neoformans*. *J.Clin. Microbiol.*, v. 23, p. 631-633, 1986.

BUCHANAN, K. L.; MURPHY, J. W. What makes *Cryptococcus neoformans* a pathogen? *Emer. Infec. Dis.*, Oklahoma, v. 4, n. 1, p. 71-83, 1998.

BUSSE, O. Ueber parasitare zeelleinschlusse und ihre zuchtung. *Zbl. Bakt.*, 16: 175-180, 1894. *apud* LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. (Ed.). *Criptococose. Trat. Mic. Méd. Lacaz*, São Paulo. Sarvier, 9 ed., 2002, p. 416- 440.

CAICEDO, L. D.; ALVAREZ, M. I.; LIANOS, C. E.; MOLINA, D. *Cryptococcus neoformans* em excretas de palomas del perímetro urbano de cali. *Colombia Med.*, Cali, v. 27, n. 3-4, p.106-107, 1996.

CALVO, B. M.; COLOMBO, A. L.; FISCHMAN, O.; SANTIAGO, A.; THOMPSON, L.; LAZÉRA, S.; TELLES, F.; FUKUSHIMA, K.; NISHIMURA, K.; TANAKA, K.; MYIAJY, M.; MORETTI-BRANCHINI, M. L. Antifungal susceptibilities, varieties, and electrophoretic kariotypes of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* from Brazil, Chile, and Venezuela. *J. Clin. Microb.*, São Paulo, v. 39, n. 6, p. 2348-2350, 2001.

CANUTO, M.M.; RODERO, F. G. Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. *Infect. Dis.*, v. 2, p. 550-563, 2002.

CARRILLO-MUÑOZ, A. J.; TUR, C.; ESTIVILL, D.; MONTSANT, L.; CARCELLER, A.; HERNÁNDEZ-MOLINA, J. M.; TORRES-RODRIGUEZ, J. M. Resistência *in vitro* al fluconazol e itraconazol em aislameintos clínicos de *Cândida spp* y *Cryptococcus neoformans*. *Rev. Iberoam. Micol.*, v. 14, p. 50-54, 1997.

CASADEVALL, A.; ROSAS-ANGEL, L.; NOSANCHUK, J. D. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Cur. Opin. Micro.*, v. 3, p. 354-358, 2000.

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

CAVALCANTI, M. A. S. Criptococose e seu agente no Meio-Norte, estados do Piauí e Maranhão, Brasil. 1995. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro) – Universidade Federal do Piauí (Teresina), 1995.

CHANG, W. N.; HUANG, C. R.; LEI, C. B.; LEE, P. Y.; CHEN, C. C. Serotypes of clinical cerebrospinal fluid *Cryptococcus neoformans* isolates from southern Taiwan and their *in vitro* susceptibilities to amphotericin B, fluconazol, and voriconazol. *J. Infect. Dis.*, Taiwan, v. 57, p. 113-115, 2001.

CHEN S. C. A.; MULLER, M.; ZHOU, J. Z.; WRIGHT, L. C.; SORRELL, T.C. Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*: a new factor? *J. Infect. Dis.*, v. 175, p. 414-420, 2000.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. M 27-P. Reference methodo for broth diluition antifungal susceptibility testing of yeast. *Clin. and Lab. Stand. Inst.*, Lancaster Aveneu, Villanova, PA, USA, 1992.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. M27-A. Reference methodo for broth diluition antifungal susceptibility testing of yeast; Approved Standard Standard. *Clin. and Lab. Stan. Inst.*, Lancaster Avenue, Villanova, PA, USA, 1997.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. M27-A2. Reference methodo for broth diluition antifungal susceptibility testing of yeast. *Clin. and Lab. Stan. Inst.*, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2002.

COLOMBO, A. L. e ALVES, S. H. Testes de susceptibilidade a antifúngicos. In: SIDRIM, J. J. e ROCHA, M. F. G. *Micol. Méd. Luz Aut. Contem.* Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan S. A., 2004, p.102-111.

COX, G. M.; MUKHERJEE, J.; COLE, J. T.; CASADEVALL, A.; PERFECT, J. R. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. *Infect. Immun.*, v. 68, n. 2, p. 443-448, 2000.

DENNING, D.W. Echinocandin antifungal drugs. *New Drug. Classes*, v.362, p. 1142-1151, 2003.

DERMOUMI, H. *In vitro* susceptibility of fungal isolates of clinically important specimens to itraconazole, fluconazole and amphotericin B. *Chemoterapy.*, v. 40, p. 92-98, 1994.

ELLIS, D. H.; PFIFFER, T. J.; ANDREWS, A. BELL, J. *In vitro* activity of terbinafina and fluconazol against 205 clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans*. 4th Intern. Conf. *Cryptococcus e Cryptococosis*, London, 1999.

EMMONS, C. W.: Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with the pigeon (*Columbia livia*) *apud* LAZÉRA, M. S.; IGREJA, R. P.; WANKE, B. *Criptococose*. In: SIDRIM, J. J. C. e ROCHA, M. F. G. (Ed.). *Micol. Méd. Luz Aut. Contem.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 2004, p.252-264.

ESPINEL-INGROFF, A.; BARCHIESI, F.; HAZEN, K. C.; MARTINEZ-SUAREZ, J. V.; SCALISET, G. Standardization of antifungal susceptibility testing and clinical relevance. *Med. Myco.*, v. 36, supl 1, p. 68-78, 1998.

EVANS, E. E. An immunologic comparison of twelve strains of *Cryptococcus neoformans* (*Torula histolytica*). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 71:644-646, 1949. *apud* KWON-CHUNG, K. J. e BENNETT, J. E. *Cryptococcosis*. In: (Ed.). *Med. Mycol.*, Philadelphia: Lea & Febiger, 1992, p. 397– 446

FERNANDES, O. F. L.; COSTA, T. R.; COSTA, M. R.; SOARES, A. J.; PEREIRA, A. J. S. C.; SILVA, M. R. R. *Cryptococcus neoformans* isolados de pacientes com AIDS. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Goiânia, v. 33, n. 1, p75-78, 2000.

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

FILIÚ, W. F. O.; WANKE, B.; AGÜENA, A. M.; VILELA, V. O.; MACEDO, R. C.; LAZÉRA, M. Cativeiro de aves como fonte de *Cryptococcus neoformans* na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 35 (6), p. 591-595, 2002

FISHER, F. e COOK, N. B. Leveduras e organismos leveduriformes. *Micol. Fund. Diagnós.*, Rio de Janeiro: Revinter, p.193-224, 2001.

FORTES, S. T.; LAZÉRA, M. S.; NISHIKAWA, M. M.; MACEDO, R. C. L.; WANKE, B. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from a native jungle tree in the Brazilian Amazon Rainforest. *Mycoses*, v.44, p. 137-140, 2001.

FRANÇA, J. L. e VASCONCELOS, A. C. Manual para normalização de publicações técnico-científicas, Editora UFMG, 7 ed, 2004.

FRANZOT, S. P. e HAMDAN, J. S. *In vitro* susceptibilities of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* tom five antifungal drugs. *Antim. Agen. Chemo.*, Belo Horizonte, v. 40, n. 3, p. 822-824, 1996.

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

GARAU, M.; PALACIO, A. Artritis por *Cryptococcus neoformans* em Receptor de Transplante Renal. *Rev. Iberoam. Micol*, Madrid, v. 19, p. 186-189, 2002.

GHANNOUM, M. A.; IBRAHIM, A. S.; FU, Y.; SHAFIQ, M. C.; EDWARDS, JR.; J. E.; CRIDDLE, R. S. Susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans*; a microdilution technique. *J. Clin. Microbiol.*, v. 30, n. 11,p. 2881-2886, 1992.

HANSEMAN, D. VON. Über eine bisher nicht beobachtete, Gehirnerkrankung durch Hefe. Verh. Dtsch. Ges. Pathol., 9:21- 24,1905. *apud* LAZÉRA M. S.; IGREJA, R. P.; WANKE, B. Criptococose. In: SIDRIM, J. J. C. e ROCHA, M. F. G. (Ed.). *Micol. Méd. Luz Aut. Contem* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 2004, p.252-264.

HERNÁNDEZ, V.; MACHIN, G. M.; ANDREU, C. M. F.; ZARAGOZÍ, M. T. I. Pigmentación de cepas de *Cryptococcus neoformans* sobre agar semilla de girasol. *Rev. Cub. Med. Trop.*, v. 55, n. 2, p.119-120, 2003.

KOHL, K. K.; HOF, H.; SCHRETTENBRUNNER, A.; SEELIGER, H. P. R.; KWON-CHUNG, K. J. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Europe. *The Lancet*, v. 29, p. 1515, jun. 1985.

KÜTZING, F. Sistematische zusammenstellung der niedern algen und arten. Linneae, 8: 365, 1833. *apud* LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. Criptococose. (Ed.). *Trat. Micol. Méd. Lacaz*, São Paulo. Sarvier, 9 ed., 2002, p. 416- 440.

KWON-CHUNG, K. J. A new species of *Filobasidiella*, the perfect state of *Cryptococcus neoformans*. *Mycology*, 67: 1197-1200, 1975 *apud* KWON-CHUNG, K. J. e BENNETT, J. E. Cryptococcosis. In: (Ed.). *Med. Mycol.* Philadelphia: Lea & Febiger, 1992, p. 397– 446.

KWON-CHUNG, K. J. e BENNET, J. E. Epidemiologic Differences between the Two Varieties of *Cryptococcus neoformans*. *J. Infect. Dis.*, v. 55, p. 31-32, 2002.

KWON-CHUNG, K. J. e BENNETT, J. E. Cryptococcosis. *Med. Mycol.* Philadelphia: Lea & Febiger, 1992, p. 397– 446.

KWON-CHUNG, K. J.; SORREL, T. C.; DROMER, F.; FUNG, E.; LEVITZ, S. M. Cryptococcosis: Clinical and biological aspects. *Med. Micol.*, v. 38 (suppl. 1), p. 205-212, 2000.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. Criptococose. *Trat. Micol. Méd. Lacaz*, São Paulo: Sarvier, 9 ed., 2002, p. 416- 440.

LANGFELDER, K.; STREIBEL, M.; JAHN, B.; HAASE, G.; BRAKHAGE, A. A. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology*, v. 38, p. 143-158, aug. 2003.

LAZÉRA, M. S. Ocos de árvores vivas como biótipo de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*. 1995. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1995.

LAZÉRA, M. S.; CAVALCANTE, M. A. S.; LONDERO, A. T.; TRILLES, L.; NISHUKAWA, M. M.; WANKE, B. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. *Med. Mycol.*, Rio de Janeiro, v. 38, p. 379-383, 2000.

LAZÉRA, M. S.; IGREJA, R. P.; WANKE, B. Criptococose. In: SIDRIM, J. J. e ROCHA, M. F. G. *Mic. Méd. Luz Aut. Contem.* Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan S. A., 2004, p.252-264.

LAZÉRA, M. S.; PIRES, F. D. A.; CAMILLO COURA, L.; NOSHUKAWA, M. M.; BEZERRA, C. C. F.; TRILLES, L.; WANKE, B. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in decaying wood forming hollows in living trees. *J. Med. Vet. Mycol.* v. 34, n. 2, p. 127-131, 1996.

LAZÉRA, M. S.; WANKE, B.; NISHIKWA, M. N. Isolation of both varieties of *Cryptococcus neoformans* from saprophytic sources in the city of Rio de Janeiro, Brasil. *J. Med. Vet. Mycol.*, v. 31, p. 449-454, 1993.

LICEA, B. A.; GARZA, D. G.; URBIETA, V. F.; OLIVARES, R. A. C. Aislamiento y Caracterización de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* a partir de muestras de *Eucalyptos camaldulensis* em la cidade de México. *Rev. Iberoam. Micol.*, Tlalnepalantav. 16, p. 40-42, 1999.

LUPETTI, A.; NIBBERING, P. H.; CAMPA, M.; TACCA, M. D.; DANESI, R. Molecular targeted treatments for fungal infections: the role of drug combinations. *Trend in Mol. Med.*, v. 9, n. 6, jun. 2003.

MENEZES, E. A.; MONTEIRO, M. N. R.; ANGELO, M. R. F.; SANTOS, C. D.; FREIRE, C. C. F.; CUNHA, F. A. *Cryptococcus neoformans* causing meningitis em AIDS patients. *Ver. Soc. Bras. Med. Trop.*, Fortaleza, v. 35, n. 5, p. 537-539, 2002.

MITCHELL, T. G. e PERFECT, J. R. Cryptococcosis in the era of AIDS – 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clin. Microb. Reviews*, Durham, v. 8, n. 4, p. 515-548, oct. 1995.

MONTENEGRO, H. e PAULA, C. R. Environment isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* and *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in the city of São Paulo, Brazil. *Med. Mycol.*, São Paulo, v. 38, n. 5, p. 385-390, 2000.

MORAES, E. M. P.; PRÍMOLA, N. S.; HAMDAN, J. S. Antifungal susceptibility of clinical and ambiental isolates of *Cryptococcus neoformans* to four antifungal drugs determined by two techniques. *Mycoses*, Belo Horizonte, v. 46, p.164-168, 2003.

MULLER, H. E.; SETHI, K. K. Proteolytic activity of *Cryptococcus neoformans* against human plasma proteins. *Med. Microbiol. Immunol.*, v. 158, p. 129-134, 1972.

MUSSA, A. Y.; RANDHAWA, H. S.; KHAN, Z. U. Decaying wood as a natural habitat os melanin-forming (Mel⁺) Variant of *Cryptococcus laurentii*. *Cur. Scien.*, Kuwait, v. 79, n. 10, p. 1471-1474, 2000.

NISHIKAWA, M. M.; LAZÉRA, M. S.; BARBOSA, G. G.; TRILLES, L.; BALASSIANO, B. R.; MECEDO, R. C. L.; BEZERRA, C. C. F.; PÉREZ, M. ^a; CARDARELLII, P.; WNKE, B. Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Brazil: analysis of host and regional patterns. *J.IClin. Microb.*, Rio de Janeiro, v. 41, n.1, p. 73-77, 2003.

ODDS, F. C.; BROWN A. J.P.; GOW, N.A.R. Antifungal agents: mechanisms of action. *Tren. Microb.*, v. 11, n. 6, p. 272-279, 2003.

OLIVEIRA, M. T. B.; BOEKHOUT, T.; THEELEN, B.; HAGEN, F.; BARONI, F. A.; LAZERA, M. S.; LENGELER, K. B.; HEITMAN, J.; RIVERA, I. N. G.; PAULA, C. R. *Cryptococcus neoformans* shows a remarkable genotypic diversity in Brazil. *J. Clin. Microbiol.*, v. 42, p. 1356-1359, 2004.

OLIVEIRA-NETO, I.C. Meio século de criptococose no Brasil: revisão de 308 casos (141-1942). *Âmb. Hosp. (Infect)*, v. 35, n. 5, p. 385-391, 2000.

OPLUSTIL; C. P.; ZOCCOLI, C. M.; TOBOUTI, N. R.; SINTO, S. I. Meios de cultura, reagentes, soluções, corantes e testes bioquímicos. *Proc. Bás. em Microb. Clín.* São Paulo, Sarvier, p.181-152, 2000.

ORDONÊS, N. e CASTÁNEDA, E. Varieties and serotypes of *Cryptococcus neoformans* in Colombia. *Rev. Iberoam. Micol.*, v.21, p. 70-74, 2001.

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

PERFECT, J. R. e CASADEVALL, A. Criptococosis. *Infect. Dis. Clin. North Am.*, Durham, 16(4), 837-874, 2002.

PASSONI, L. F. C.; WANKE, B.; NISHIKAWA, M. M.; LAZERA, M. S. *Cryptococcus neoformans* isolated from human dwellings in Rio de Janeiro, Brazil: an analysis of the domestic environment of AIDS patients with and without cryptococcosis. *Med. Mycolo.*, v. 36, p. 305-311, 1998.

PAUW, B.E. New antifungal agents and preparations. *International Journal of Antimicrobial Agents*, Nijmegen, v.16, p. 147-150, 2000.

PFALLER, M. A.; MESSER, S. A.; BOLMSTRÖM, A. Evaluation of E-test for determining in vitro susceptibility of yeast isolates to amphotericin B. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 32, p. 223-227, 1998.

RUFINO, B. B., SWINNE, D. Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* em los pacientes peruanos. *Ver. Iberoam. Micol.*, v.15, p. 22-24, 1998.

RYDER, N. S.; WAGNER, S.; LEITNER, I. *In vitro* activities of terbinafine against cutaneous isolates of *Candida albicans* e other pathogenic yeasts. *Antimicrobiol. Agents and Chemotherapy*, v. 42, p. 1057-1061, 1998.

SANFELICE, F. Contributo alla morfologia i biologia dei blastomiceti che si sviluppano nei suchi de alcuni frutti. Instituto d'Igiene della R. Università di Cagliari, 4: 463-498, 1894. *apud* LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. In: (Ed.). *Criptococose. Tratado de Micologia Médica Lacaz*, São Paulo. Sarvier, 9 ed., 2002, p. 416- 440.

SANGLARD, D. Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs. *Cur. Opin. Microb.*, Lausanne, v.5, p. 379-385, 2002.

SHADOMY, S.; ESPINEL-INGROFF, A.; CARTWRITH, R. Y. Estudios de laboratorio com agents antifungicos: prebas de suscepibilidad y bioensayos. In: LENNETTE, E. H.; BALOWS, A.; HASVSLER, W. G.; SHADOMY, H. J. *Man. Microb. Clín.*, p. 1229-1238, 1987.

SILVA, A. C. G.; MARCHIORI, E.; SOUZA JR., A. S. S.; IRION, K. L. Criptococose pulmonar: aspectos na tomografia computadorizada. *Radiol. Bras*, Niterói, v. 36, n. 5, p. 277-282, 2003.

SILVA, M. L.; MELHEM, M.; OROZCO, S. F.; NINOMIYA, A.; PALHARES, M. C. -Fungemia in patients with AIDS: etiological aspects. *Int. Conf. AIDS*, v. 11, n. 93, p. 7-12, 1996.

SOARES, B. M. Comparação de três metodologias para testes de susceptibilidade a antifúngicos de 40 amostras de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. 2004, 104f., Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2004.

SORRELL, T. C. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *Med. Micol.*, v. 39, p. 2, p. 155-168, 2001.

SPEED, B.; DUNT, D. Clinical and host differences between infections with the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Clin. Infect. Dis.*, v. 21, p. 28-34, 1995.

STAIB, F. *Cryptococcus neoformans* and *Guizotia abyssinica* (Syn. *G. oleifera*) Farbreaktion für *Cr. Neoformans*. *Z. Hyg.*, 148: 466-475, 1962. *apud* KWON-CHUNG, K. J. e BENNETT, J. E. In: (Ed.). *Cryptococcosis. Med. Mycol.*, Philadelphia: Lea & Febiger, 1992, p. 397– 446.

STEENBERGEN, J. N.; CASADEVALL, A. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Microb. Infect.*, v. 5, p 667-675, 2003.

STODDARD, J. L. e CUTLER, E. C. *Torula* Infection in Man. Rockefeller for Medical Research, Monograph N° 6, 1916, pp.1-98 *apud* KWON-CHUNG, K. J. e BENNETT, J. E. In: (Ed.). *Cryptococcosis. Medic. Mycol.*, Philadelphia: Lea e Febiger, 1992, p. 397– 446.

TAYLOR, M. B.; CHADWICK, D.; BARKHAM, T. First Reported Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from a Patient in Singapore. *Jour. Clin. Microbiol.*, Singapore, v. 40, n.8, p. 3098-3099, 2002.

VUILLEMIN, P. Les blastomycetes pathogenes. Ver. Gen. Sci. Pures Appl., 12: 732-751, 1901 *apud* LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T In: (Ed.). *Criptococose. Trat. Micol. Méd. Lacaz*, São Paulo. Sarvier, 9 ed., 2002, p. 416- 440.

WILLIAMSON, P. R. Lacase and Melanin in the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *Front. Biosci.*, Chicago, v. 2, p. 99-107, 1997.



**Universidade Federal de Minas Gerais / Instituto de Ciências
Biológicas
Departamento de Microbiologia /Laboratório de Micologia**

**Isolamento, determinação da variedade e susceptibilidade frente a drogas
antifúngicas de isolados de *Cryptococcus* spp, obtidos de amostras ambientais e
de pacientes hospitalizados em Minas Gerais**

Orientadora: Profa/Dra Maria Aparecida de Resende

Orientanda: Érica Oliveira Dias Brito

Telefone: 31-91038264 (celular) /31-33134294 (residência) / 31-34492742 (lab. UFMG)

E-mail: ed_brito@yahoo.com.br

Nome do Hospital: _____

Situado em: () Belo Horizonte () Juiz de Fora () Outra: _____

1 - DADOS DE REGISTRO DO PACIENTE

1.1 - N° do prontuário: _____

1.3 - N° do registro de internação na data da coleta: _____

1.4 - Data de internação: ____/____/____ (DD/MM/YYYY)

2 - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

2.1 - Data de Nascimento: ____/____/____ (DD/MM/YYYY)

2.2 - Sexo: () Masculino () Feminino

2.3 - Paciente mora na: () Zona Rural () Cidade

2.4 - Profissão: _____

2.5 - O paciente tem contato com:

Observação: Em relação às questões deste item, se o paciente não tem contato atualmente mas teve contato em alguma época anterior de sua vida, responda em "Sim, anteriormente"

Pombos: () Sim () Não () Sim, anteriormente

Outras aves: () Sim () Não () Sim, anteriormente

Se sim, qual?

Árvore do tipo eucalipto: () Sim () Não () Sim, anteriormente

Outro tipo de árvore: () Sim () Não () Sim, anteriormente

Se qual? _____

Terra: () Sim () Não () Sim, anteriormente

3 - HISTÓRIA PATOLÓGICA PREGRESSA

3.1- É paciente HIV +: () Sim () Não

Se sim, o paciente preenche critérios para AIDS? () Sim () Não () Não sei

Contagem mais recente de CD4 : _____ () Não sei

Data do exame de CD4: ____/____/____ (DD/MM/YYYY) () Não sei

3.2 – Portador de Neoplasia: () Sim () Não

Se sim, qual tipo? () Hematológica () Tumor sólido () Não sei

3.3 - Paciente transplantado: () Sim () Não () Não sei

Se sim, especifique o órgão transplantado:

- () Rim () Coração () Pulmão () Fígado () Pâncreas
() Medula óssea () Outro. Qual? _____
- 3.4 - Doença Cardíaca: () Sim () Não () Não sei
3.5 - Doença Pulmonar: () Sim () Não () Não sei
3.6 - Doença Hepática: () Sim () Não () Não sei
3.7 - Diabetes Mellitus: () Sim () Não () Não sei
3.8 - Insuficiência Renal: () Sim () Não () Não sei
3.9 - Doença Auto-imune: () Sim () Não () Não sei
Se sim, é tratado com drogas imunossupressoras? () Sim () Não () Não sei
3.10 - Doença Neurológica: () Sim () Não () Não sei
3.11 - Cirurgia nos últimos 3 meses: () Sim () Não () Não sei
Se sim, que tipo de cirurgia?
() Abdominal () Cardiorácica () Genitourinária () Ginecológica
() Neurológica () Ortopédica () Trauma () Outra. Qual? _____
3.12 - Queimadura de terceiro grau: () Sim () Não () Não sei
3.13 - Neutropenia (neutrófilos <500/mm³): () Sim () Não () Não sei
3.14 - É portador de alguma outra doença de base não citada anteriormente?
() Sim () Não () Não sei
Se sim, qual? _____
3.15 - Qual foi o motivo da internação atual?

4 – HISTÓRICO MEDICAMENTOSO

Estava em uso de :

- 4.1 - Antibiótico (oral ou IV)? () Sim () Não () Não sei
4.2 - Corticosteróides sistêmicos (oral ou IV)? () Sim () Não () Não sei
4.3 - Outras drogas imunossupressoras? () Sim () Não () Não sei
4.4 - Quimioterapia contra o câncer? () Sim () Não () Não sei
4.5 - Terapia anti-retroviral? () Sim () Não () Não sei
4.6 - O paciente recebeu ou estava recebendo drogas antifúngicas?
() Sim () Não () Não sei
Se sim, qual (is)? () Anfotericina B () 5 Flucitosina () Itraconazol
() Fluconazol () Outro. Qual? _____
Se sim, qual é a razão para o seu uso?
() Tratamento da Criptococose já diagnosticada anteriormente
() Tratamento de outra infecção fúngica. Qual? _____ () Não sei
() Profilático
() Não sei

5 – DADOS LABORATORIAIS

- 5.1 - Amostra biológica
() Líquor () Secreção pulmonar () Material de lesão corporal
() Material de lesão ocular () Outro tipo. Qual? _____
5.2 - Data da colheita do material: ____/____/____(DD/MM/YYYY)
5.3 - Diagnóstico laboratorial realizado através de:
() Exame direto com tinta nanquim
() Cultura
() Outro? Qual _____

OBSERVAÇÃO

Os dados referentes ao registro do paciente (item 1) não serão divulgados em hipótese alguma e os demais dados coletados só serão divulgados com fins científicos.

Assinatura de comprometimento dos pesquisadores

Érica Oliveira Dias Brito _____

Profa/Dra Maria Aparecida de Resende _____

PARECER COEP no. 205-05
Enviado ao COEP em 07/06/05
Recebido pelo parecerista em 10/11/05

Nome do trabalho - Isolamento, determinação da variedade e susceptibilidade frente a drogas antifúngicas de isolados de *Cryptococcus neoformans*, obtidos de amostras ambientais e de pacientes hospitalizados em Minas Gerais

Pesquisador responsável – Maria Aparecida de Resende (orientadora)
Érica Oliveira Dias Brito (mestranda)

Área do Conhecimento – Ciências Biológicas

Instituição responsável – Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia. Constam assinaturas do diretor e do Chefe do Departamento

Folha de Rosto – completa

Documentos - Parecer consubstanciado do Departamento
Carta de encaminhamento ao COEP

Currículo – constam

Datas – Início – a pesquisadora enviou carta ao COEP para desconsiderar a data colocada no protocolo tendo em vista que a coleta de dados em amostras de sangue de pacientes ainda não foi iniciada e aguarda aprovação do COEP

TCLE - Usa termos claros e está completo

Resumo do Projeto -

Este é um trabalho que tem como objetivo realizar estudo das fontes saprofíticas do fungo *Cryptococcus neoformans* na cidade de Belo Horizonte, através do isolamento e da identificação da tipagem sorológica a partir do meio ambiente e de pacientes hospitalizados portadores de criptococose. As amostras com humanos serão obtidas de pacientes que estejam hospitalizados no Hospital das Clínicas da UFMG. Não há documento do hospital concordando com a realização desta pesquisa.

Riscos e Benefícios -

Os pesquisadores relatam não haver riscos para os pacientes.

Mérito - A proposta do trabalho é relevante pela alta prevalência e pela gravidade do quadro clínico que os indivíduos podem apresentar.

Dê sempre o melhor e o melhor virá...

*Às vezes as pessoas são egocêntricas, ilógicas e insensatas...
Perdoe-as assim mesmo.*

*Se você é gentil, as pessoas podem acusá-lo de egoísta e interesseiro...
Seja assim mesmo.*

*Se você é um vencedor, terá alguns falsos amigos e alguns inimigos verdadeiros...
Vença assim mesmo.
O que você levou anos para construir, alguém pode destruir de uma hora para
outra...
Construa assim mesmo.*

*Se você tem paz e é feliz, as pessoas podem sentir inveja...
Seja feliz assim mesmo.*

*O bem que você faz hoje, pode ser esquecido amanhã...
Faça o bem assim mesmo.*

*Dê ao mundo o melhor de você. Mas isso pode nunca ser o bastante...
Dê o melhor de você assim mesmo*

*E vája você que, no final das contas...
É entre você e Deus...
Nunca foi entre você e eles!*

(MADRE TEREZA DE CALCUTÁ)

ORAÇÃO DA SERENIDADE

***“CONCEDEI-ME SENHOR A **SERENIDADE** NECESSÁRIA PARA ACEITAR
AS COISAS QUE NÃO POSSO MODIFICAR.
CORAGEM PARA MODIFICAR AQUELAS QUE POSSO E **SABEDORIA**
PARA DISTINGUIR UMAS DAS OUTRAS”***

POR

ÉRICA OLIVEIRA DIAS BRITO