

ANTONIO MARCIO BARBOSA JUNIOR

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE
ISOLADOS DE *Cryptococcus neoformans* E *Cryptococcus
gattii* DE ORIGEM AMBIENTAL E CLÍNICA E
EPIDEMIOLOGIA DA CRIPTOCOCOSE DO ESTADO DE
SERGIPE, BRASIL**

Belo Horizonte

Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Minas Gerais

2010

ANTONIO MARCIO BARBOSA JUNIOR

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE
ISOLADOS DE *Cryptococcus neoformans* E *Cryptococcus
gattii* DE ORIGEM AMBIENTAL E CLÍNICA E
EPIDEMIOLOGIA DA CRIPTOCOCOSE DO ESTADO DE
SERGIPE, BRASIL**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Microbiologia

Orientadora: Prof. Dra. Maria Aparecida de Resende Stoianoff

Co-orientadora: Profa. Dra. Rita de Cássia Trindade

Belo Horizonte

Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Minas Gerais

2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

Barbosa Junior, Antonio Marcio

Caracterização fenotípica e genotípica de isolados de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* de origem ambiental e clínica e epidemiologia da criptococose do Estado de Sergipe, Brasil. [manuscrito] Antonio Marcio Barbosa Junior. - 2010
140 f. : il.; 29,5 cm.

Orientadora: Maria Aparecida de Resende Stoianoff . Co-orientadora: Rita de Cássia Trindade.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. *Cryptococcus neoformans* – Teses. 2. Saúde pública – Teses. 3. Fungos – Teses. 4. Microbiologia – Teses. 5. Criptococose – Epidemiologia - Sergipe - Teses. 6. Ecologia microbiana – Teses. 7. Epidemiologia – Teses. 8. Testes de susceptibilidade aos antifúngicos – Teses. 9. Micologia – Teses. 10. Reação em cadeia de polimerase – Teses. 11. *Cryptococcus gattii*. 12. Mating type sexual. I. Stoianoff, Maria Aparecida de Resende. II. Trindade, Rita de Cássia. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 582.28



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
POS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DOUTORADO EM MICROBIOLOGIA

TESE DEFENDIDA EM 17 DE SETEMBRO DE 2010.

APROVADA PELA BANCA EXAMINADORA EM 17/09/ 2010

CONSTITUÍDA PELOS PROFESSORES:

Profa. Dra. Maria Aparecida de Resende Stoianoff

Departamento de Microbiologia – Universidade Federal de Minas Gerais

Profa. Dra. Maria Lúcia Scroferneker

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki

Universidade Católica de Pernambuco

Prof. Dr. Ary Correa Júnior
Departamento de Microbiologia – Universidade Federal Minas Gerais

Profa. Dra. Cleide Viviane Buzanello Martins
Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Dedico este trabalho a Deus, a minha família e todos aqueles que me ajudaram e me deram força para executá-lo.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter dado força e vida nos percalços desse período. Onde tivermos momentos de calma, de solidão, de tristeza e de alegria. Sem essa luz, tudo seria bem mais complicado;

Aos meus pais, Márcio e Cecília (*in memoriam*), por tudo aquilo que fizeram ao longo de todos esses anos na compreensão, carinho e na ajuda me mostrando um futuro digno e sincero. E acima de tudo o respeito e ser tudo o que eu sou. *Sem vocês não sei de mim!!!*

A minha sempre namorada e agora esposa Dângelly pela luta, carinho, compreensão, companheirismo e principalmente no complemento a construção da minha vida, de nossos objetivos. *Você será o momento, e a união entre o amor e a razão!!!*

À Prof^a Cida da UFMG pelas dicas recebidas, orientação e supervisão não só da tese, mas das minhas responsabilidades da vida. Uma amizade de congresso que virou uma parceria para vida e cujo início chamou-se doutorado... *És minha fonte de inspiração científica!!!*

À Prof^a Rita pela orientação, confiança e amizade colocada não somente durante esse período, mas em toda a minha formação científica e minha vida. *São 10 anos como minha mãe científica!!!*

À Patrícia Oliveira pelas sugestões e companheirismo ao longo dessa trajetória. Depois de 10 anos de convívio, brigas e alegrias posso te dizer... *Crescemos juntos científica e pessoalmente;*

Ao primeiro PIBIC do grupo de pesquisas em *Cryptococcus*, Erick Oliveira, que sempre esteve junto quando “quebrávamos a cabeça” até padronizar os protocolos. *Você se tornou meu braço esquerdo!!!*

Ao outro PIBIC muito especial na construção dessa pesquisa, grande amigo Bruno (Bruninho). Valeu a força nos cálculos, execuções e principalmente no carinho e dedicação recebida. *Você se tornou meu braço direito!!!*

A Camilla Evangelista pelo apoio e auxílio no último momento dessa tese. A sua alegria foi o carimbo que faltava nesse final tão tenso. A tese um ponto, que está longe de ser um ponto final... A linha de pesquisa continua e a próxima estação é contigo;

Ao amigo Emerson, de início as incertezas do mestrado e depois o apoio certo no HemoLacen/SE, pode sempre contar comigo, meu amigo;

À antiga geração do Laboratório de Microbiologia Aplicada, Diogo, Eryca, Michel, Celso, Éden, Mila, Meyline, Talita, Euvaldo, Flávia e Reinalda pelas conversas e sugestões recebidas;

À nova geração do LMA/UFS, Kamila, Patricia Ferreira, Rute, Cíntia, Cynthia, Taine, Alexander, Erica, Jéssica, Gustavo, Fábio, Fabrício, vocês são os novos caminhos nessa estrada científica;

À Camilla de Ponzzes pelas dicas e ajuda recebida. E, claro, da presença garantida nos congressos e na vida. Estamos sempre aqui!

Aos colegas Francisco (SES/SE) e Rodrigo (UFMG) com atitudes marcantes, apoio recebido e na clareza das responsabilidades.

Aos professores Daniel e Betânia pela valiosa contribuição na minha qualificação, cujas sugestões e correções foram fundamentais;

Ao professor Cláudio Antonio Bonjardim coordenador da Pós-graduação em Microbiologia pela oportunidade oferecida e pela concretização do sonho.

Ao funcionário da UFMG, Douglas Nunes, a ajuda recebida foi imensa, em especial, nos avisos, emails e toques recebidos, o meu muito obrigado!!!

Ao Instituto Parreiras Horta por ter cedido, gentilmente, as amostras para elaboração dessa obra.

Ao Laboratório de Microbiologia Aplicada da Universidade Federal de Sergipe pela aplicação, execução e apoio irrestrito recebido ao longo desses anos.

Ao Laboratório de Micologia da Universidade Federal de Minas Gerais pela aplicação e orientação dessa tese, sendo uma segunda casa científica.

Ao Curso de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais pela chance de realização e por fim em acompanhar meu mundo científico.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de pesquisa, sem essa ajuda tudo seria mais difícil.

Aos funcionários, professores e colegas da Universidade Federal de Sergipe e da Universidade Federal de Minas Gerais pelo convívio durante esses anos.

E para finalizar, gostaria de agradecer a todo carinho e confiança recebidos ao longo dessa estrada científica, sem as emoções, intuições e nas decisões ocorridas ao longo dessa tese, nada disso teria chegado a esse momento, na Vicência científica cresci, e como cresci, sobretudo na minha vida me tornei não somente amadurecido e realizado mas engrandecido e com pensamentos e sentimentos que são essenciais para a vida de alguém que preze responsabilidade, respeito, objetivos e principalmente amor.

Obrigado a todos !!!!

Antonio Marcio Barbosa Junior (Tony)

RESUMO

Cryptococcus neoformans species complex são fungos oportunistas que desencadeiam meningite, tanto em pacientes imunocompetentes como em indivíduos hígidos. Este trabalho teve como objetivo estudar as espécies circulantes de *Cryptococcus neoformans species complex* isolados no Estado de Sergipe tanto a partir do LCR (líquido céfalo raqueano) de pacientes com meningite infecciosa como de diversos substratos ambientais. Foram utilizadas amostras do LCR que deram entrada no IPH/HEMOLACEN/SE no período de 2001 a 2007. Foram realizadas 104 coletas ambientais dentro do Estado de Sergipe, das quais 55 foram obtidas a partir de excretas de aves e quatro de amostras de fezes de morcegos coletadas em cavernas. As demais foram obtidas de materiais de origem vegetal, perfazendo 45 amostras: 21 de *Eucalyptus* spp., oito de material de troncos vegetais em decomposição, 10 de restos vegetais coletados em duas praças e seis de *Anacardium occidentale* L. – (cajuero). O líquido foi examinado por microscopia direta e cultivado a 25°C e a 37°C. No período de 2005 a 2007 foram obtidos 141 isolados ambientais e 35 isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans species complex*. Foram determinadas inferências ecológicas e epidemiológicas dos isolados obtidos além de realização de provas para identificação presuntiva fenotípica em meio Níger e, das espécies em meio CGB, teste de sensibilidade frente aos antifúngicos, caracterização enzimática de interesse biotipar e/ou marcador de linhagens, determinação de mating type sexual utilizando PCR e *PCR Fingerprinting* com iniciador M13. Nas linhagens de *Cryptococcus* spp. isoladas de líquido de pacientes com meningite infecciosa no Estado de Sergipe prevaleceu a espécie *C. neoformans*. Em relação às linhagens ambientais, somente uma amostra, dentre 140, foi identificada como *C. gattii*. Todas as amostras oriundas de excretas de aves foram positivas no isolamento da levedura. Os isolados clínicos de *C. neoformans* e *C. gattii* oriundos de pacientes com meningite criptocócica no Estado de Sergipe apresentaram valores altos de concentração inibitória mínima (CIM) para os agentes antifúngicos testados, o que simboliza alta taxa de resistência, principalmente à

Anfotericina B e ao Fluconazol. Em relação ao *mating type sexual* foi evidenciando que a maioria das linhagens clínicas foi identificada como MAT α , confirmando o caráter de virulência que esta levedura desenvolve. Entretanto, no isolados ambientais o MAT α foi mais prevalente, evidenciando o caráter menos virulento destas linhagens frente às de origem clínica. *Cryptococcus neoformans* foi a única espécie amplificada por PCR *fingerprinting*. Houve presença, dentre as amostras locais, de três perfis genéticos distintos e pertencentes a uma mesma espécie.

Palavras – chaves: *Cryptococcus neoformans*; *Cryptococcus gattii*; teste de sensibilidade; MAT sexual, eco-epidemiologia; PCR Fingerprinting, saúde pública.

ABSTRACT

Cryptococcus neoformans species complex are opportunistic fungi that cause meningitis in both immunocompetent patients and in healthy individuals. This work aimed to study the species of circulating *Cryptococcus neoformans species complex* isolated from northeastern Brazil from both the CSF (cerebrospinal fluid) of patients with infectious meningitis as various environmental substrates. Samples of CSF were received at IPH/HEMOLACEN/SE in the period 2001 to 2007. Were carried out 104 environmental samples within the state of Sergipe, of which 55 were obtained from the feces of birds and four stool samples collected from bat caves. The other samples were obtained from plant materials, totaling 45 samples: 21 from *Eucalyptus* spp., eight from material of decomposing trunks of plants, 10 from plant collected in two squares, six from *Anacardium occidentale* L. - (Cashew). CSF was examined by direct microscopy by staining with Indian ink and cultured in Sabouraud agar with chloramphenicol at 25 °C and 37 °C. In the period from 2005 to 2007 were obtained from 141 environmental isolates and 35 clinical isolates of *Cryptococcus neoformans species complex*. Ecological and epidemiological inferences were determined. In addition characteristics of isolates were carried out by tests for presumptive phenotypic identification, through Niger medium and species into the CGB test, sensitivity to the antifungal, enzymatic characterization of biotypes of interest and/or marker lines, determining sexual mating type using PCR and PCR Fingerprinting with primer M13. Among the strains of *Cryptococcus* spp. isolated from CSF of patients with infectious meningitis in the state of Sergipe, in the period from 2001 to 2009, prevailed the species *C. neoformans*. Among the environmental strains, only one sample of 140, was identified as *C. gattii*. All samples from the feces of birds were positive in the isolation of yeast. Clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* originating from patients with

cryptococcal meningitis in the state of Sergipe exhibited higher values of minimum inhibitory concentration (MIC) to the antifungal agents tested, which symbolizes high rate of resistance, especially to amphotericin B and fluconazole. In relation to sexual mating type was evident that most of the clinics were MAT α strains, confirming the character of virulence of this yeast. However, among the environmental isolates the MAT α was more prevalent, showing the character of these less virulent strains. *Cryptococcus neoformans* was the only species amplified by PCR fingerprinting. There was a presence among the local samples of three different genetic profiles belonging to the same species.

Keys-words: *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*, sensitivity test, sexual type, eco-epidemiology, PCR Fingerprinting, health publishes