

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ  
MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA**

**Colonização cutâneo-mucosa e/ou infecção por *Cryptococcus neoformans*  
em indivíduos infectados pelo HIV, com e sem síndrome de  
imunodeficiência adquirida. Estudo prospectivo e evolutivo de coorte  
interrompida.**

**Iracema Forni Vieira**

**Rio de Janeiro**  
Janeiro de 2000

**Ministério da Saúde**  
**Fundação Oswaldo Cruz**  
**Instituto Oswaldo Cruz**  
**Dissertação de Mestrado em Biologia Parasitária**

**Iracema Forni Vieira**

**Colonização cutâneo-mucosa e/ou infecção por *Cryptococcus neoformans*  
em indivíduos infectados pelo HIV, com e sem síndrome de  
imunodeficiência adquirida. Estudo prospectivo e evolutivo de coorte  
interrompida.**

Dissertação apresentada com vistas à  
obtenção do Título de Mestre em Ciências na  
área de Biologia Parasitária

Orientadores: Prof. Dr. Bodo Wanke  
Prof.<sup>a</sup>. Dra. Márcia dos Santos Lazéra

Janeiro de 2000

**Ministério da Saúde**  
**Fundação Oswaldo Cruz**  
**Instituto Oswaldo Cruz**  
**Curso de Pós-graduação em Biologia Parasitária**

**Colonização cutâneo-mucosa e/ou infecção por *Cryptococcus neoformans*  
em indivíduos infectados pelo HIV, com e sem síndrome de  
imunodeficiência adquirida. Estudo prospectivo e evolutivo de coorte  
interrompida.**

**Apresentada por**

Iracema Forni Vieira

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Ricardo Pereira Igreja

Prof. Dra. Dirce Bonfim de Lima

Prof. Dr. Octavio Fernandes

Dissertação defendida e aprovada em:07/02/2000

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

V 658 Vieira, Iracema Forni.

Colonização cutâneo-mucosa e/ou infecção por *Cryptococcus neoformans* em indivíduos infectados pelo HIV, com e sem síndrome de imunodeficiência adquirida. Estudo prospectivo e evolutivo de coorte interrompida / Iracema Forni Vieira. - Rio de Janeiro, 2000.  
xv, 90 f. :il. ;30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2000.  
Bibliografia: f. 58-76

1. *Cryptococcus neoformans* 2. AIDS 3. Colonização 4.  
Criptococose I.Título

CDD616.969

## DEDICATÓRIA

Para vocês, meus queridos pais **Neusa** e **Getúlio**, mestres de fato;

Eu dedico este trabalho com ternura.

– vocês me deram o ser

– me ensinaram a viver

– Mestres: Na sabedoria do assistir do  
encorajar e amar.

*A vida é curta e, muito longo o caminho a percorrer.  
As oportunidades são passageiras, a experiência  
traíçoeira e a avaliação difícil.*

**Hipócrates \_ Aforismos, I**

## AGRADECIMENTO

Agradeço inicialmente a Deus, por estar viva e ter conseguido concluir esta etapa.

A conclusão deste trabalho não foi um mérito individual, cumpro aqui agradecer aos amigos e profissionais que auxiliaram e apoiaram nas horas mais difíceis.

Aos pacientes que, mesmo no difícil momento de suas vidas, dispuseram-se a participar desse trabalho, que busca auxiliar no desvendar da relação de parasitismo deste agente infeccioso com o homem,

Aos orientadores, mestres no trabalho e na vida: Dr. Bodo Wanke e Dra. Márcia dos Santos Lazera;

A todos os técnicos, biólogos e médicos do Laboratório de Micologia Médica do Hospital Evandro Chagas;

À incansável amiga Regina Célia Lima de Macêdo, pelo auxílio técnico;

À Equipe de Enfermagem do hospital-dia do Hospital Evandro Chagas;

Aos amigos do Hospital São Francisco de Assis; à Dra. Louise; ao José Roberto (Beto); à Dra. Junia Rodrigues,

À amiga de todas as horas, Dra. Ana Cristina Pereira Jacques;

À Dra. Maria Eugênia Midle, pela compreensão e amizade;

À Dra. Maria do Socorro Pombo de Oliveira, do Centro de Estudo de Medula óssea (CEMO), por ceder o espaço e orientação quanto à técnica de imunofenotipagem dos linfócitos.

Ao Dr. Maurício Perez, pela orientação estatística do trabalho;

À Dra. Eneida Almeida Santos, amiga de muitas e muitas horas.

E todos aqueles que, por um lapso de memória, tenha omitido neste singelo agradecimento.

## RESUMO

No período de abril de 1990 a maio de 1999 foi realizado estudo prospectivo de colonização cutâneo-mucosa e/ou infecção por *Cryptococcus neoformans* em 100 indivíduos infectados pelo HIV, com e sem SIDA. Os espécimes clínicos examinados foram respectivamente: raspados de interdígito dos pés e das mãos, da superfície dorsal da língua, *swab* de fossa nasal, urina e escarro. Todos os espécimes foram semeados em placas contendo meio niger. As colônias fenoloxidase positivas foram subcultivadas e identificadas. O estudo foi subdividido em três etapas. Na primeira fase, de abril de 1990 a dezembro de 1992, dos 100 indivíduos investigados, obtivemos isolamento de *C. neoformans* de seis, sendo uma colonização transitória, dois casos compatíveis com colonização ou infecção brônquica inicial e outros três com doença disseminada. Na segunda fase, correspondente à interrupção do protocolo de janeiro de 1993 a dezembro de 1995, foi realizada a revisão dos 100 prontuários desta casuística, sendo apurados cinco casos de criptococose disseminada e 60 óbitos por variadas causas, dos quais seis relacionados com criptococose disseminada. Na terceira fase, 28 indivíduos remanescentes da casuística original foram resubmetidos ao protocolo inicial de investigação, sendo encontrado um caso de colonização brônquica por *C. neoformans* var. *gattii* sorotipo B em mulher grávida, a qual três anos após este achado, apresentou criptococose disseminada por *C. neoformans* var. *neoformans*.

Palavra-chave: *Cryptococcus neoformans*, AIDS, Colonização, Criptococose

## ABSTRACT

Mucocutaneous colonization and/or infection by *Cryptococcus neoformans* was prospectively studied from April 1990 to May 1999 in 100 individuals infected by HIV, with and without AIDS. Clinical specimens included in the study were: interdigital scrapings of hands and feet, scraping of the dorsal surface of the tongue, nasal swab, urine and sputum. All specimens were plated onto niger seed agar. Phenoloxidase-positive colonies were subcultivated and identified. The study was performed in three steps. In the first step, from April 1990 until December 1992, *C. neoformans* was isolated from 6 out of the 100 individuals studied: one had transient colonization, two were compatible with colonization or initial bronchial infection and three had disseminated cryptococcosis. In the second step, corresponding to the period of interruption of the protocol from January 1993 to December 1995, review of the case history of the patients showed that 5 had disseminated cryptococcosis and at least 60 died from various causes, 6 of whom related to disseminated cryptococcosis. In the third step, 28 remaining individuals from the original casuistic were re-evaluated according to the protocol of the first step, disclosing one case of bronchial colonization by *C. neoformans* var. *gattii* serotype B in a pregnant woman who three years later presented disseminated cryptococcosis by *C. neoformans* var. *neoformans*.

Keywords: *Cryptococcus neoformans*, SIDA, Colonization, cryptococcosis

## Sumário

RESUMO.....	viii
ABSTRACT .....	ix
<b>- INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 – INFECÇÃO POR <i>Cryptococcus neoformans</i> - CRIPTOCOCOSE .....	1
1.2 – COLONIZAÇÃO POR <i>Cryptococcus neoformans</i> .....	3
<b>2 - OBJETIVOS.....</b>	<b>5</b>
2.1 - OBJETIVO GERAL .....	5
2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	5
<b>3 - REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>6</b>
3.1. O AGENTE .....	6
<b>3.1.1. Sorotipos e variedades: .....</b>	<b>7</b>
<b>3.1.2. Forma sexuada .....</b>	<b>8</b>
3.2. ASPECTOS ECO-EPIDEMIOLÓGICOS DO <i>Cryptococcus neoformans</i> E SUAS VARIEDADES.....	9
3.3. A RELAÇÃO PARASITA-HOSPEDEIRO.....	12
3.4. CONSIDERAÇÕES SOBRE FISIOPATOGENIA .....	16
<b>3.4.1. Via de infecção .....</b>	<b>16</b>
<b>3.4.2. Patogenicidade / virulência do <i>C. neoformans</i> .....</b>	<b>17</b>
<b>3.4.3. Mecanismos de defesa do hospedeiro.....</b>	<b>19</b>
3.5. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	20
3.6. DIAGNÓSTICO.....	22
<b>4 - CASUÍSTICA E MÉTODOS .....</b>	<b>25</b>
4.1. CASUÍSTICA.....	25
4.2. METODOLOGIA.....	25
<b>4.2.1. Desenho do estudo .....</b>	<b>25</b>
<b>4.2.2. Seleção dos pacientes .....</b>	<b>26</b>
<b>4.2.3. Protocolo.....</b>	<b>26</b>
<b>4.2.4. Coleta de espécimes clínicos e isolamento primário de <i>C. neoformans</i>.....</b>	<b>27</b>
<b>4.2.5. Estudo da variedade de <i>Cryptococcus neoformans</i> .....</b>	<b>28</b>
<b>4.2.6. Sorotipagem .....</b>	<b>28</b>
<b>4.2.7. Contagem de CD4 e CD8.....</b>	<b>29</b>
<b>4.2.8. Sorologia.....</b>	<b>30</b>
<b>4.2.9. Definições.....</b>	<b>32</b>
4.2.9.1 - Definição de casos de SIDA .....	32
4.2.9.2 - Colonização ou saprofitismo cutâneo-mucoso.....	32
4.2.9.3 - Infecção / doença criptocócica .....	33
<b>5 - RESULTADOS.....</b>	<b>34</b>
5.1 - FASE 1 .....	34
<b>A. Colonização (3 casos) .....</b>	<b>34</b>
5.2 - FASE 2 - REVISÃO DOS PRONTUÁRIOS DOS 100 INDIVÍDUOS DA PRIMEIRA FASE. ....	37
<b>A - Dados Epidemiológicos .....</b>	<b>37</b>
A.1. Sexo e Faixa Etária .....	37
A.2. - Raça.....	38
A.3. - Naturalidade e Procedência .....	38
A.4.- Fator e/ou Comportamento de Risco para aquisição da infecção pelo HIV. ....	38
<b>B.- Dados Clínicos.....</b>	<b>40</b>
B.1.- Perfil clínico da casuística em relação à infecção pelo HIV. ....	40

B.2 - Contagem dos níveis de CD <sub>4</sub> .....	40
B.3.- Infecções oportunistas prévias e concomitantes .....	41
<b>C. Estudo da frequência e principais causas dos óbitos na casuística até 1995 .....</b>	<b>43</b>
5.3 FASE 3.....	46
<b>A - Descrição de caso: Colonização transitória .....</b>	<b>46</b>
<b>B - Frequência de isolamento de <i>C. neoformans</i> por espécime clínico .....</b>	<b>48</b>
5.4 - FASE 4 .....	48
<b>6 - DISCUSSÃO.....</b>	<b>48</b>
<b>7 – CONCLUSÃO.....</b>	<b>56</b>
<b>8-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>58</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>77</b>
<b>ANEXO II.....</b>	<b>78</b>
<b>ANEXO III .....</b>	<b>80</b>
<b>ANEXO III – a.....</b>	<b>82</b>
<b>ANEXO IV .....</b>	<b>83</b>
<b>ANEXO V.....</b>	<b>84</b>
<b>ANEXO VI .....</b>	<b>85</b>
<b>ANEXO VII.....</b>	<b>86</b>
<b>ANEXO VIII .....</b>	<b>87</b>
<b>ANEXO IX .....</b>	<b>89</b>
<b>ANEXO X.....</b>	<b>90</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição dos 100 pacientes por Naturalidade.....	38
Tabela 2 - Distribuição e percentual da casuística segundo o fator e/ou comportamento de risco associado para aquisição da AIDS.....	39
Tabela 3 – Distribuição dos indivíduos por sexo em relação ao critério de classificação do CDC de 1989.....	40
Tabela 4-Frequência das doenças associadas que ocorreram em 79 pacientes HIV positivos da casuística.....	42
Tabela 5 - Distribuição das causas de 60 óbitos na casuística estudada até março de 1996. ....	43

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Distribuição da casuística por sexo e idade . .....	37
Gráfico 2 – Distribuição da casuística por sexo e contagem de CD <sub>4</sub> .....	40

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 A - Cultura de swab nasal em meio Níger do paciente nº 14 (BLG), evidenciando colônias fenol oxidase positivas, identificadas como <i>C. neofarmans</i> .....	87
Figura 1 B Isolamento de <i>C. neofarmans</i> do LCR do paciente nº 14 (BLG), em meio Sabouraud. ....	88
Figura 2 A Cultura do escarro da paciente nº 97 em meio Níger, evidenciando inúmeras colônias fenol oxidase positiva. Identificadas posteriormente como <i>C. neofarmans var. gatti</i> . ....	89
Figura 2 B: Detalhe da cultura do escarro da paciente nº 97, evidenciando colônias fenol oxidase positivas junto a fungo filamentosos.....	89
Figura 3 A: Detalhe da cultura do escarro da paciente nº 97 em meio Níger, evidenciando inúmeras colônias fenol oxidase positiva. Identificadas posteriormente como <i>C. neofarmans var. gatti</i> . ....	90
Figura 3 B: Detalhe da cultura do escarro da paciente nº 97, evidenciando colônias fenol oxidase.....	90

## - INTRODUÇÃO

*Cryptococcus neoformans* é uma levedura capsulada encontrada amplamente dispersa em numerosos substratos ambientais, sejam relacionados a animais ou vegetais, cuja relação com o homem pode ser analisada sob dois aspectos principais: infecção e colonização.

### 1.1 – INFECÇÃO POR *Cryptococcus neoformans* - CRIPTOCOCOSE

Nas últimas décadas a criptococose vem sendo referida como doença infecciosa de maior destaque entre as infecções fúngicas emergentes. Denominada por Ajello "the medical mycological iceberg" (1970), a criptococose emergiu com maior intensidade a partir da década de 80, sobretudo devido ao progressivo aumento da população de indivíduos com deficiência imunitária, em maior proporção atribuída ao surgimento da Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA) (Gonçalves, 1995).

Embora estudos de incidência da criptococose nos Estados Unidos da América - EUA e Japão já assinalassem para um aumento desta micose antes mesmo do advento da SIDA, foi marcante o impacto da epidemia desta retrovírose humana na incidência da criptococose oportunística. Em revisão nacional de 50 anos, a partir de 1981 foi observado um aumento em 57,8% de casos relatados, sendo que a SIDA esteve associada como fator predisponente em 71,9% da casuística (Oliveira-Netto et al., 1993).

Doença micótica sistêmica, cosmopolita, à exceção de dois casos de transmissão por órgão transplantado, (Beyt & Waltman 1978; Ooi et al., 1978) não se conhece contágio inter-humano. A criptococose tem como agente causal o *Cryptococcus neoformans*. São conhecidas duas variedades relacionadas ao parasitismo humano: *C. neoformans* var. *neoformans* e *C. neoformans* var. *gattii*. A infecção por este fungo denota aspecto peculiar quanto ao parasitismo, uma vez que este agente tem sido relacionado também com a colonização cutâneo-mucosa, atividade comensal saprofítica, aspecto da relação parasito-hospedeiro classicamente relacionado à *Candida albicans*. Tal inter-relação não é observada entre outros agentes de micoses sistêmicas (Hammerman et al., 1973; Rippon, 1988; Londero & Gonçalves, 1988). O contato inicial com o hospedeiro dá-se em geral pelo trato respiratório,

através da inalação de propágulos viáveis. Outras vias como trato gastrointestinal, também já foram reportadas (Salkowski et al., 1987).

A permanência de *C. neoformans* no hospedeiro pode resultar em infecção primária, levando à formação de complexo gânglio-pulmonar primário e disseminação hematogênica, com estabelecimento de focos secundários em qualquer órgão ou sistema, atingindo principalmente o sistema nervoso central (Anderson, 1988). Nos hospedeiros imunocompetentes, a infecção primária tem decurso autolimitado, regressivo, e muitas vezes subclínico. No entanto, a infecção pode assumir caráter progressivo, disseminando-se para outros órgãos logo após a primo infecção, ou apresentar-se tardiamente, após período de latência variável, na vigência da diminuição da imunidade mediada por células (Kwon-Chung et al., 1992). Este fato pode ser corroborado pela frequente associação da criptococose oportunística com doenças ou situações que induzem à imunossupressão celular, como por exemplo, as doenças linfoproliferativas, o uso de corticóides sistêmicos em concentrações imunossupressoras, diabetes mellitus, sarcoidose, AIDS, entre outros (Fiorillo et al., 1990).

A depressão da imunidade celular encontrada nos pacientes com AIDS é determinante ao surgimento da doença criptocócica oportunística (Sugar, 1991). O risco de meningoencefalite criptocócica aumenta com a diminuição da contagem de linfócitos T-helper CD4 em indivíduos infectados pelo HIV (Pinner, 1995).

A prevalência desta micose na AIDS varia de 2% a 8,5% nas casuísticas norte-americanas, em contraste com aquelas originadas da África Central, variando de 13 a 35% (Katlama et al., 1984). No Brasil, necropsia de 32 óbitos por AIDS no Rio de Janeiro (RJ) revelou 6 (18%) casos de criptococose disseminada (Vergara et al., 1987). Nos Estados Unidos da América (EUA), a criptococose é a segunda causa, em frequência, de infecção do sistema nervoso central e corresponde à terceira causa de óbito na AIDS (Kovacs et al., 1985).

Quanto à associação da criptococose com AIDS, predomina de maneira absoluta a variedade *neoformans* em casuísticas mundiais (Rivaldi et al., 1986), sendo rara a doença causada pela variedade *gattii* neste grupo de pacientes mesmo em área endêmica como Vitória, na Austrália, de reconhecida prevalência de criptococose pela variedade *gattii* (Speed & Dunt, 1995).

## 1.2 – COLONIZAÇÃO POR *Cryptococcus neoformans*

A particular relação do *C. neoformans* com o hospedeiro, caracterizado pela colonização cutâneo-mucosa, é surpreendente, à medida que a fisiopatogenia não é totalmente elucidada.

O trato respiratório tem sido estudado principalmente em casuísticas ambulatorial e hospitalar (Reiss & Szilagyi, 1965, Tynes et al., 1968, Ward, Bates & Stone, 1968, Duperval et al., 1977, Randhawa & Paliwal, 1979). Estudo multicêntrico, prospectivo, sugere colonização brônquica em pelo menos 0,5 a 1% de indivíduos com doença pulmonar crônica subjacente (Hammerman et al., 1973). Em 6 casos foi observada colonização de mucosa brônquica por 1 a 3 anos (Tynes et al., 1968).

Na pele e mucosa oral os índices de colonização variam de 0 a 18,5%, a maioria referente a indivíduos sadios (Howard 1973, Randhawa & Paliwal, 1977, McGinnis et al., 1975, Badillet et al., 1986).

Em estudo quantitativo e qualitativo da microbiota interdigitopodal de 27 voluntários sadios, realizado por McGinnis et al., (1975), foram identificadas 1291 espécies de fungos filamentosos e 598 de leveduras, sendo observada a tendência de grandes populações de leveduras conviverem com pequena população de fungos filamentosos e vice-versa. A espécie de *Cryptococcus* mais encontrada foi *C. albicus*; no entanto, o *C. neoformans* foi isolado de 5 indivíduos (18,5%). Não há estudos sistematizados sobre o assunto em pacientes com AIDS. Pouco se sabe sobre o mecanismo de aderência de *C. neoformans* à superfície do epitélio, a inter-relação existente entre as microbiotas bacterianas e fúngicas, os fatores predisponentes à colonização e também a mudança do estado de comensalismo para invasão tecidual. Em animais imunocompetentes é difícil induzir experimentalmente a colonização do trato digestivo. No entanto, há dados demonstrando que uma cepa capsulada pode colonizar superfícies mucosas e causar criptococose sistêmica em camundongos atímicos (Salkowski et al., 1987). Mesmo em presença de microbiota bacteriana normal, foi observada aderência do fungo à superfície do epitélio da cavidade oral, esôfago e trato gastrintestinal após inoculação por via oral nestes animais, seguindo-se disseminação hematogênica e óbito após 3 a 4 semanas. É possível que maior facilidade de colonização da superfície mucosa esteja relacionada a defeito da imunidade celular, e que este sítio sirva como porta de entrada para criptococose no hospedeiro imunodeficiente (Salkowski, 1987). Por outro lado, a presença de *C. neoformans* já foi verificada no orofaringe humano normal (Reiss & Szilagyi, 1965, Tynes,

1968), podendo ser fonte endógena para infecção pulmonar, através de aspiração, ou do trato digestivo, por deglutição. Inúmeras hipóteses podem ser sugeridas para patogenia da criptococose em indivíduos imunodeficientes. Assim, recomenda-se que a colonização seja considerada como estágio inicial da doença (Staib, 1963), sobretudo nos indivíduos imunodeficientes. Assim recomenda-se que seja considerada como estágio inicial da doença.

O indivíduo infectado pelo HIV torna-se progressivamente susceptível às inúmeras doenças oportunistas, dentre elas a criptococose tem se destacado como importante causa de morbi-mortalidade e está entre as seis primeiras causas de infecção oportunística que ocorrem nestes indivíduos, segundo o Ministério da Saúde (1997).

A fisiopatogenia da criptococose ainda não foi completamente elucidada, particularmente no que concerne à colonização, que seria, de fato, um estágio inicial da doença nos indivíduos susceptíveis. A possibilidade da existência saprobiótica das duas variedades do *C. neoformans* em pele e mucosa humana também não foi ainda objeto de estudo dirigido e sistemático, exceto nos indivíduos com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (Randhawa & Paliwal, 1979). Um aspecto relevante no estudo da colonização é a identificação da variedade envolvida. No Brasil, além da ocorrência de criptococose pelas duas variedades do *C. neoformans*, ambas também já foram isoladas de fontes ambientais, inclusive no Rio de Janeiro (Lazera et al., 1993; Passoni et al., 1998; Calvo, 1990).

Este estudo visa ampliar os conhecimentos envolvidos na colonização cutâneo-mucosa por *C. neoformans* em hospedeiros humanos infectados pelo HIV e determinar as variedades envolvidas. Desta forma, retomamos um trabalho em andamento sobre colonização cutâneo-mucosa por *C. neoformans* em indivíduos infectados pelo HIV, precocemente interrompido.

## 2 - OBJETIVOS

### 2.1 - OBJETIVO GERAL

Investigar a colonização por *Cryptococcus neoformans* em indivíduos infectados pelo HIV, com e sem síndrome de imunodeficiência adquirida, e seu papel na evolução da infecção criptocócica.

### 2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 – Determinar a frequência da colonização de pele e mucosas por *C. neoformans* em indivíduos infectados pelo HIV;

2.2.2 – Avaliar a frequência de colonização cutâneo-mucosa por *C. neoformans* como fator de risco para infecção disseminada;

2.2.3 – Correlacionar as diferentes situações de colonização e infecção por *C. neoformans* com dados clínicos e evolutivos;

2.2.4 – Correlacionar as variedades e sorotipos de *C. neoformans* com os diferentes estados de relação parasita-hospedeiro: colonização e infecção.

### 3 - REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. O AGENTE

*Cryptococcus neoformans* (Sanfelice) Vuillemin, 1901 é a forma anamórfica ou assexuada do basidiomiceto *Filobasidiella neoformans*. Este fungo é um dos mais importantes patógenos humanos pertencente ao Filo Basidiomycota. Poucas espécies deste filo causam infecções no homem e animais. Em geral, são patógenos de plantas ou sapróbios. O *C. neoformans* apresenta-se morfológicamente em parasitismo (tecidos e fluidos orgânicos infectados) e *in vitro*, como um lêvedo - elemento globoso ou ovóide, de tamanho variável (2,5 a 10 µm de diâmetro), e cápsula de espessura também variável (2 a 9 µm) a qual é constituída basicamente por complexo polissacarídeo **glucuronoxilomanana** (GMX), responsável pela especificidade sorotípica, associada a dois carboidratos menores, **galactoxilomanana** (GalXM) e **manoproteína** (MP) (James & Cherniak, 1992).

A reprodução ocorre por brotamento de blastoconídios, a partir de qualquer ponto da parede celular. Estes apresentam-se unidos à célula-mãe por um colo estreito e em geral são unibrotantes, mas, eventualmente, podem apresentar-se bi ou multibrotantes. A formação de hifas ou pseudohifas é rara, e não são produzidas no estado haplóide.

No cultivo em meio sólido Sabouraud ágar glicose (SC) a 25°C em geral crescem colônias mucóides, as quais adquirem coloração que varia do creme ao levemente acastanhado, mas não há produção de pigmentos carotenóides visíveis. Em meios contendo extrato de semente de *Guizotia abyssinica* (niger) (Staib, 1963) e de *Heliantus annuus* (girassol) ou contendo compostos difenólicos, como ácido cafeico, L-Dopa, hidroquinona, catecolaminas, as colônias apresentam coloração marrom ou castanho escuro em 1 a 5 dias de cultivo (Melo et al., 1993). O pigmento acastanhado deve-se à produção de melanina pelo fungo, por ação da enzima de membrana 3-4-dihidroxifenilalanina-fenoxidase sobre os compostos orto-difenólicos existentes nesses meios. A produção de melanina é um dos fatores que distingue o *C. neoformans* de outros gêneros e outras espécies de *Cryptococcus* (Polacheck & Kwon-Chung, 1988).

Caracterizam o gênero *Cryptococcus*: 1) termo tolerância - crescimento em meios de cultivo a 35 - 37°C; 2) não fermentação de carboidrato; 3) produção de urease; 4) capacidade de assimilar inositol como fonte de carbono; 5) ausência de pseudohifas ou hifas verdadeiras e ballistosporos; 6) sensibilidade à cicloheximida (actidiona) em concentrações de

0,16 a 0,24  $\mu$ /ml; 7) assimilação de d-glicose, d-galactose, sacarose, maltose, trealose, melizitose, d-xilose, ribitol, metil- $\alpha$ -d-glicosídeo; 8) não assimila lactose, meliobiose e nitrato de potássio; 9) incapacidade de reduzir nitrato a nitrito; 10) utilização de creatinina como fonte de nitrogênio, a qual é metabolizada a metil-hidantoína e amônia por ação de enzima deaminase (creatininodeiminase), cuja síntese só ocorre em presença deste substrato (Polacheck & Kwon-Chung, 1986).

A patogenicidade do *C. neoformans* para camundongos, quando inoculados intracerebralmente, aliado à produção de melanina (um dos fatores de virulência), auxilia na diferenciação entre outras espécies do gênero *Cryptococcus* (Rippon, 1988).

### 3.1.1. Sorotipos e variedades:

A espécie *C. neoformans* é heterogênea. Diferenças relacionadas ao seu perfil antigênico permitem definir cinco sorotipos básicos: A, B, C D, AD (Evans 1949, Wilson et al., 1968). Em vários estudos tem sido demonstrado que, além das diferenças quanto à antigenicidade dos polissacarídeos capsulares, os sorotipos A, D e AD exibem características distintas dos sorotipos B e C em relação à morfologia dos elementos fúngicos em parasitismo, às propriedades físico-químicas, à reprodução sexuada e ao biótopo. (Ellis & Pfeiffer 1990, 1992; Speed & Dunt, 1995)

Gatti & Eeckels (1970) detectaram no líquido de um menino do antigo Congo Belga (República Democrática do Congo) células leveduriformes capsuladas, de morfologia alongada em forma de charuto, ao lado de células arredondadas clássicas. Estudos em modelo animal demonstraram que esta morfologia era estável e vinculada ao parasitismo. A esta cepa Vanbreuseghem & Takashio (1970) denominaram *C. neoformans* var. *gattii*.

As propriedades fisiológicas e metabólicas distintas entre as duas variedades têm auxiliado nos estudos clínicos e epidemiológicos. Estas observações, aliadas aos aspectos epidemiológicos da infecção e da doença, geraram o conceito de variedades dentro da espécie. Assim, são reconhecidas duas variedades: *C. neoformans* var *neoformans* (sorotipos A, D e AD) e o *C. neoformans* var *gattii* (sorotipos B e C).

A variedade *gattii* apresenta menor termo tolerância que a variedade *neoformans*. Menos de 30% dos elementos fúngicos de *C. neoformans* var *gattii* crescem a 37° C e, em geral, desenvolvem colônias menores que o habitual quando cultivados em meios sólidos

(Kwon-Chung, Bennett & Rhodes, 1982). Assimilam ácidos dicarboxílicos do ciclo de Krebs mais rápida e frequentemente que a variedade *neoformans*, além de serem mais resistentes à ação inibidora da L-canavanina e cicloheximida (Polacheck & Kwon-Chung, 1986, Kwon-Chung & Bennett, 1992). A glicina é também assimilada como fonte de carbono e hidrogênio com maior rapidez pela variedade *gattii*. Baseando-se na resistência a altas concentrações à cicloheximida e na rapidez de assimilação da glicina, Salkin & Hurd (1982) desenvolveram o meio glicina-cicloheximida-vermelho fenol (meio GCP) para distinguir as variedades, entretanto Kwon-Chung et al., (1986) encontraram 11% de resultados falso-negativos dos isolados da variedade *gattii*. Para eliminar o falso negativo, um novo meio, canavanina-glicina-azul de bromotimol (meio CGB) foi desenvolvido. Os isolados da variedade *gattii*, por serem resistentes à ação inibitória da L-canavanina e assimilarem glicina, desenvolvem-se, e devido à alcalinização do meio, este adquire coloração azul - CGB positivo; por outro lado, as cepas da variedade *neoformans*, além de serem inibidas em seu crescimento, não alteram a coloração do meio de cultivo - CGB negativo (Min & Kwon-Chung, 1986).

*C. neoformans* var *gattii* é capaz de assimilar D-prolina como única fonte de nitrogênio, mas não de carbono, diferenciando-se da variedade *neoformans* (Dufait & Devroey, 1987). Esta prova é atualmente pouco utilizada para discriminar as variedades.

### 3.1.2. Forma sexuada

A forma teleomórfica do *C. neoformans* é o basidiomiceto *Filobasidiella neoformans* (Kwon-Chung, 1975). O estado perfeito, teleomórfico ou sexuado, é observado somente em condições laboratoriais utilizando-se meios especiais com depleção de nitrogênio, como agar-malte, agar-suco V8 e infusão de feno-agar a 25 – 37°C. A obtenção da forma sexuada faz-se através da conjugação de duas células haplóides compatíveis, ou seja, de sexualidade distinta, denominadas *mating-type*  $\alpha$  e **a**, gerando longas hifas hialinas dicarióticas, com conexões em ansas (*clamp connection*) ao nível dos septos. Apresentam septos dolipóricos sem parentossomo. Para completar o ciclo sexuado estas hifas dão origem a basídios na sua porção lateral ou terminal. Os basídios surgem como uma dilatação abrupta do ápice, têm formato subgloboso ou em clava, são longos, delgados, hialinos e não septados. No núcleo zigótico, após meiose, produzem-se quatro núcleos haplóides localizados em quatro sítios no ápice do basídio e cada sítio dá origem a uma cadeia de até 20 basidiosporos. Estes são formados por

divisão mitótica e, de maneira sucessiva, separam-se por brotamento basiseptal. Os basidiosporos são uninucleados, ovais, elípticos e/ou subglobosos e não possuem cápsula. Quando submersos em ágar, germinam produzindo células leveduriformes capsuladas típicas de *C. neoformans*.

A conjugação entre cepas compatíveis dos sorotipos A e D de *C. neoformans* produz *Filobasidiella*, originando hifas finas (1-1,5 µm de diâmetro), hialinas, com ramificações irregulares, denominadas hifas hausteróides, as quais dão origem a basidiosporos de formato esféricos, elípticos ou cilíndricos, com 1,8 a 2,5 µm de tamanho e paredes levemente rugosas. Na conjugação entre os sorotipos B e C, não são observadas hifas hausteróides e os basidiosporos apresentam forma bacilar, com 1-1,5 por 3-8 µm, retos ou curvos e de superfície lisa. Diferenças morfológicas dos basidiosporos, das hifas, aliado à aparente incompatibilidade sexual entre cepas A-D e B-C, classicamente fizeram com que a descrição inicial da forma teleomórfica fosse apresentada como duas espécies distintas: *F. neoformans* (sorotipos A-D) e *F. bacillispora* (sorotipos B-C) (Kwon-Chung, 1975, 1976). Em 1982, Kwon-Chung *et al.*, reestudando a taxonomia das espécies de *Filobasidiella* e seus anamorfos, concluíram que o cruzamento interespecífico ocorria, produzindo basidiosporos com 70% de viabilidade, e a progênie viável mostrava segregação de marcadores fenotípicos. Com estes achados e o rearranjo do DNA, tornou-se possível a redução de *F. bacillispora* a variedade de *F. neoformans* e reconheceu-a como sinônimo de *C. neoformans* var. *gattii*.

### 3.2. ASPECTOS ECO-EPIDEMIOLÓGICOS DO *Cryptococcus neoformans* E SUAS VARIEDADES

O *C. neoformans* é uma levedura sapróbia na natureza, encontrado tanto em nichos rurais quanto urbanos, com ampla distribuição mundial. A ocorrência saprobiótica e patogênica foi reportada praticamente na mesma ocasião. Em 1894, Sanfelice o cultivou a partir da fermentação de suco de pêssago e, ao mesmo tempo, Busse & Buschke descreviam, separadamente, o primeiro caso de doença relacionado a este lêvedo. A partir de então, relatos sucessivos quanto ao isolamento deste fungo de secreções humanas e animais têm ocorrido, bem como o seu isolamento de fontes ambientais (apud. Kwon-Chung & Bennett, 1992).

As variedades *neoformans* e *gattii* foram criteriosamente separadas por diferenças genéticas, fenotípicas, eco-epidemiológicas e clínicas.

O *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipos A, D e AD), tem sido isolado a partir de várias fontes ambientais, particularmente as relacionadas a locais onde há acúmulo de fezes de aves, principalmente excretas de pombos. O sorotipo A é encontrado em muitas regiões com frequência maior que o D (Powell *et. al.* 1972). A metodologia empregada a partir de 1950, tal como a inoculação em animais e também técnicas de inoculação direta em meios de cultivo apropriados, sobretudo aqueles à base de compostos orto-difenólicos, conduziram para melhor identificação das fontes saprobióticas. Desta maneira, foi possível identificar diversos novos biótopos tais como em poeiras ou solos de igrejas, praças públicas, prédios abandonados, celeiros, escolas, hospitais e domicílios, em diversas regiões do mundo, na Inglaterra (Reiss & Szilagy, 1965), no Uruguai (Civita & Conti-Diaz, 1970), em Porto Rico (Ruiz *et. al.*, 1989) no Brasil (Queiroz-Telles *et. al.*, 1998, Passoni *et. al.*, 1998), na Bélgica (Swinne, 1975). Os ocos de várias espécies de árvores, de localização urbana e rural, têm também sido descritos como habitat natural desta levedura, (Lazera 1996, Passoni, 1999) Outras fontes saprobióticas de *C. neoformans* var. *neoformans* foram identificadas: fezes de canários (Staib, 1963; Passoni *et. al.*, 1998), psitacídeos (Passoni *et. al.*, 1998), pombos (Emmons *et. al.*, 1960) entre outros. Há relatos de isolamento de fezes de morcego (Lazera, 1993).

Inúmeros fatores interferem na sobrevivência e multiplicação do *C. neoformans* em nichos ambientais. A multiplicação é diminuída quando há umidade elevada (Emmons, 1962), ou ainda, pela forte alcalinização do substrato produzida pela decomposição bacteriana das fezes frescas. Amebas de vida livre como *Acanthamoeba polyfaga*, *A. palestinensis* e *A. castellanii* podem ingerir e matar células fúngicas competindo pelo mesmo nicho (Buting *et. al.*, 1979, Ruiz *et. al.*, 1982).

Os excretas de aves são considerados a principal fonte de contaminação ambiental por esta variedade (Casadevall, 1993). Pombos e outras aves podem atuar como carreadores mecânicos, levando nos bicos, penas e pés este fungo (Littman & Borok, 1968). A resistência natural dessas aves à infecção parece estar relacionada à sua elevada temperatura corporal (42°C), inibindo o crescimento fúngico, sobretudo o da var. *gattii*.

Currie *et al.*, (1994) utilizando método de tipagem molecular de DNA a partir do uso de enzimas de restrição (“Restriction Fragment Length Polymorphism” - RFLP), examinaram a relação entre as cepas de *C. neoformans* encontradas em reservatórios ambientais e os isolados clínicos na cidade de Nova York. Observaram que alguns tipos de cepas estavam presentes em múltiplos nichos ambientais e correlacionavam-se com as encontradas nos

pacientes. Estudos sucessivos têm demonstrado que a contaminação ambiental pela variedade *neoformans* é ampla. Há relatos de elevada frequência (6,3%) de isolamento na poeira domiciliar ou no ar, em Kinshasa-República Democrática do Congo, na África Central, (Swinne *et. al.*, 1986). Em Bumjumbura, Burundi, o fungo foi encontrado em 54% de domicílios de aidéticos com criptococose e em 20% de domicílios controle (Swinne & Deppner *et al.*, 1991). Mais recentemente, no Brasil, foi verificada contaminação por *C. neoformans* em 13% de domicílios de indivíduos aidéticos com criptococose (Passoni *et. al.*, 1998).

O *C. neoformans* var. *gattii* de acordo com a antigenicidade capsular, apresenta os sorotipos B e C. A sua distribuição geográfica é limitada às regiões tropicais e subtropicais. Até 1990, era desconhecido o seu biótopo natural, quando Ellis & Pfeiffer (1990) e Pfeiffer & Ellis (1992) relataram o isolamento ambiental a partir de flores e folhas de duas espécies de eucalipto: *Eucalyptus camaldulensis* e *E. tereticornis*. Em 1991, Pfeiffer & Ellis identificaram *C. neoformans* var. *gattii* (sorotipo B) em restos de *E. camaldulensis* em São Francisco, Califórnia. O estudo do cariótipo das cepas mostrou que havia relação entre a cepa isolada em São Francisco àquela isolada de *E. camaldulensis* da Austrália. Este estudo corrobora a hipótese da dispersão ambiental do *C. neoformans* var. *gattii* através de sementes *E. camaldulensis*, uma vez que o mesmo foi exportado extensivamente da Austrália para muitas regiões tropicais e subtropicais, incluindo o Sudeste da Califórnia, México, Brasil, Havaí, África e Ásia (Pfeiffer & Ellis 1993, López-Matinez *et. al.* 1996).

*C. neoformans* var. *gattii*, sorotipo B, foi isolado de *E. camaldulensis* na Apulia, Itália (Montagna 1997 a, 1997 b), no nordeste do Estado de Punjab, na Índia (Chakrabarti, 1997; Abraham, 1997) e no estado do Piauí, nordeste do Brasil (Bezerra *et. al.*, 1998). Este mesmo sorotipo também foi isolada de duas espécies de eucaliptos, uma das quais identificada como *E. citriodora*, na área do zoológico de San Diego, California (Sorrell *et al.*, 1996) e de restos de madeira de outras duas espécies de eucaliptos (*E. rudis* e *E. gomphocephala*), na Austrália (Ellis *et. al.* 1996). No Rio de Janeiro, Brasil, foi isolado, no perímetro urbano, de poeira de um sótão de uma casa abandonada frequentada por morcegos insetívoros (Lazera *et al.*; 1993). No Uruguai, foi isolado de fragmentos de ninho de vespa (*Polybia occidentalis*), durante investigação de fonte ambiental de *Polybia brasiliensis* (Gezuele *et.al.*; 1993). O sorotipo C foi isolado a partir de detritos de amendoeira (*Terminalia catappa*), na Colômbia (Callejas *et. al.*, 1998).

O isolamento da variedade *gattii* a partir madeira em decomposição proveniente de outras árvores que não os eucaliptos, de fontes ambientais como poeiras em residências e insetos, sugerem que diferentes espécies plantas e outros nichos possam ser reservatórios para esta variedade nas distintas áreas geográficas, fato este que precisa ser melhor investigado.

Criptococose humana pela variedade *gattii* ocorre predominantemente em indivíduos não imunocomprometidos (Oliveira-Netto, 1993; Saag, 1995), sendo rara esta variedade em indivíduos HIV positivos. A aparente raridade em indivíduos com AIDS ainda não foi elucidada. Considera-se que a maioria dos indivíduos infectados pelo HIV reside em áreas urbanas que parecem ser menos expostas a fontes ambientais com esta variedade, embora este fato não explique a mesma raridade nas áreas de alta endemicidade, como na Austrália (Speed et al., 1993) e certas regiões do nordeste (Cavalcanti, 1997), norte (Correia *et. al.*, 1998) e na região sudeste do Brasil (Rozembaum *et al.*, 1990, 1992), na Índia (Abraham *et al.*, 1997).

### 3.3. A RELAÇÃO PARASITA-HOSPEDEIRO

Na natureza, a inter-relação entre os seres vivos muitas vezes adquire caráter complexo. Influenciam esta relação, fatores extrínsecos, ambientais: temperatura, umidade, tensão de gases, nutrição, PH e, fatores intrínsecos, como virulência e mecanismos de escape, entre outros.

Para caracterização do tipo de associação interespecífica entre seres vivos, o grau de interdependência metabólica tem sido considerado determinante. Na tentativa de melhor definir o caráter destas relações, foram criados termos apropriados e específicos para cada situação. Assim, aos componentes destas associações denominou-se **parasita** (palavra de origem grega: **para** = ao lado; **sítios** = alimento) àquele ser que se alimenta à custa do outro e, **hospedeiro** àquele no qual, ou através do qual, o parasito adquire sua nutrição.

Entre as associações parasita-hospedeiro de interesse clínico podemos ressaltar:

**Parasitismo** - Há relação direta e estreita entre os organismos, sendo bem definido o hospedeiro e o parasita. É essencialmente unilateral: o hospedeiro indispensável ao parasito. O grau de interdependência metabólica é elevado (Pessoa, 1982). O caráter patogênico do parasitismo é incidental e não deve ser incluído na sua definição (Rey, 1973, apud Pessoa, 1982).

**Comensalismo** - São as associações onde as espécies subsistem regularmente, sem o cunho de unilateralidade ou dependência metabólica exclusiva, ou seja, sem que uma viva às expensas de outra.

**Colonização** - É um tipo de comensalismo ou saprobiotismo caracterizado pela presença permanente ou transitória de qualquer microrganismo (bactérias, vírus, fungos ou protozoários) de baixa virulência que adere à pele ou às membranas mucosas do hospedeiro, dissociado de sinais e sintomas de doença. Aos conjuntos de microrganismos que permanentemente habitam o corpo humano denomina-se genericamente de **microbiota normal humana**. Patógenos primários, como por exemplo, *Neisseria meningitidis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Salmonella* sp., entre outros, também podem representar estado transitório e assintomático de colonização nos chamados **portadores assintomáticos**. A microbiota normal ocupa o nicho cutâneo-mucoso impedindo a adesão de outros microrganismos mais virulentos (Zanon & Marangoni, 1998).

A colonização fúngica, segundo McGinnis & Ajello (1998), é caracterizada pelo crescimento e replicação do fungo no hospedeiro ou em tecido não viável ou outro material do hospedeiro. Este autor introduz um novo conceito nessa relação entre parasita fúngico e hospedeiro, na medida em que inclui como colonização a presença e replicação do fungo em outros sítios ("tecido não viável") que não a superfície cutâneo-mucosa.

**Contaminação** - É uma situação onde o fungo simplesmente ocorre no hospedeiro, sem crescimento ou replicação (McGinnis & Ajello, 1998).

**Infecção** - Não tem a mesma conotação de **doença**, pois é caracterizada pela invasão em tecido viável sem que ocorra alteração estrutural ou funcional.

**Doença** - Quando ocorrem alterações funcionais ou estruturais que resultem em sinais e/ou sintomas, denominamos **doença** (McGinnis & Ajello, 1998).

Entretanto, no campo da micologia médica, há duas situações em que doença pode resultar da ingestão de fungos venenosos (**micetismo**) ou de micotoxinas veiculadas por alimentos contaminados por produtos metabólicos produzidos por fungos, gerando **micotoxicose** (McGinnis & Ajello, 1998).

Segundo Zannon & Marangoni (1998) o termo infecção tem a mesma conotação de doença, pois é empregado para designar os efeitos anatômicos e fisiopatológicos resultantes da interação anormal (doença) entre o hospedeiro e um microrganismo qualquer. Assim, segundo estes autores, as doenças infecciosas decorrem da ação direta ou indireta de um

agente infeccioso normalmente ausente na microbiota do hospedeiro (patógeno primário) e são etiologicamente específicas e tipicamente comunitárias.

A interação do hospedeiro com o *C. neoformans* tem aspectos variados, desde simples colonização, infecção assintomática ou oligossintomática até formas progressivas e disseminadas, geralmente graves, e que podem levar ao óbito. Devido ao pleomorfismo da interação deste fungo com o hospedeiro, bem como a necessidade de conhecer-se o prognóstico e risco para disseminação nas diversas formas de infecção pelo *C. neoformans*, várias propostas de estadiamento ou mesmo classificação clínica têm sido sugeridas.

O estudo do trato respiratório em casuística ambulatorial e hospitalar (Reiss & Szilagyc, 1965; Tynes *et al.*, 1968; Warr, Bates & Stone, 1968; Duperval *et al.*, 1977; Hammerman *et al.*, 1973; Randhawa & Paliwal, 1979) trouxe evidências quanto ao saprobiontismo deste fungo patogênico, agente de micose sistêmica.

Tynes *et al.*, (1968) em estudo muito interessante com 32 pacientes, todos com doença de base, descreveram o **saprotitismo transitório** em doze deles, com isolamento transitório do fungo apenas do trato respiratório. *C. neoformans* não foi causa de óbito em nenhum dos pacientes. Descreveram ainda o **saprotitismo persistente**, evidenciado em seis pacientes e caracterizado pelo isolamento do *C. neoformans* de material obtido do trato respiratório sem qualquer evidência clínica ou isolamento deste fungo de quaisquer outros sítios, por um longo período, que variou de um a três anos.

Londero & Gonçalves (1988), considerando os mecanismos fisiopatogênicos da criptococose, sugeriram que o isolamento do *C. neoformans* do trato respiratório de indivíduos sadios ou de pacientes com doenças pulmonares subjacentes, fosse do escarro ou de material oriundo dos brônquios, não teria valor indicativo de lesão pulmonar, caracterizando um estágio de **colonização**. Descreveram também três formas clínicas principais da micose: pulmonar regressiva, pulmonar progressiva e disseminada.

- **Criptococose pulmonar regressiva** – corresponde à infecção criptocócica inicial ou primo infecção, decorrente da inalação de propágulo viável. Pode ser subclínica ou manifestar-se por sintomas leves ou inespecíficos que regridem espontaneamente. Nódulos subpleurais ou complexo parênquima pulmonar ou gânglio satélites contendo *C. neoformans* podem ser achados de toracotomia ou necrópsia.

- **Criptococose pulmonar progressiva** – pode ser resultante de primoinfecção, infecção exógena ou recaída tardia de infecção prévia. Em geral é oligossintomática. O decurso clínico é subagudo ou crônico, com poucos sinais e sintomas constitucionais. As manifestações pulmonares caracterizam-se por tosse, dor torácica, escarro mucóide, raramente hemoptóico, e dispnéia. As alterações ao exame radiológico são variáveis e em geral sugestivas quando encontramos lesões pulmonares pseudo-tumorais de localização periférica (nódulos subpleurais). Estas lesões, usualmente únicas, apresentam áreas de rarefação central, tipo cavitação. Raramente ocorre derrame pleural. Quando há quadros de criptococose pulmonar com manifestações clínicas mais exuberantes, o aspecto radiológico é também pleomórfico e inespecífico, variando desde infiltrado alveolar ou broncopneumônico até quadros intersticiais micronodulares que tendem a disseminar por via hematogênica, indistinguível de outras doenças crônicas granulomatosas, infecciosas ou não (Gonçalves *et. al.*, 1994; Kimura *et. al.*, 1998).
- **Criptococose disseminada** – Manifestações sistêmicas são decorrentes da reativação de focos extrapulmonares latentes ou infecção recente progressiva que disseminam-se por via linfohematogênica. As manifestações clínicas mais comuns são as referentes ao acometimento do SNC. Inicialmente a criptococose do SNC tende a ser insidiosa, sem sintomas prodrômicos. Cefaléia e modificações da conduta podem ser os únicos sinais de envolvimento neurológico durante longo período. As manifestações neurológicas apresentam-se sob três quadros clínicos: meningite, meningoencefalite ou processo expansivo. Manifestações ósseas e cutâneas ocorrem em 5 a 10% dos casos. O acometimento ósseo caracteriza-se por lesões líticas únicas ou múltiplas em ossos cranianos e da coluna vertebral, tem decurso arrastado, sendo a dor e tumefação os sintomas mais comuns. As manifestações cutâneas e subcutâneas são resultantes da disseminação hematogênica. Em geral são múltiplas e apresentam-se como pápulas, pústulas, lesões acneiformes, nódulos ou úlceras necróticas; com menor frequência, podem ocorrer celulite ou abscessos. Nestes casos, usualmente estão associadas manifestações de outros órgãos.

Weinke *et al.*, (1989) propuseram dois estágios para a doença criptocócica em pacientes com AIDS, baseando-se na localização do fungo. O primeiro, considerado **estágio inicial**, quando o fungo era apenas isolado de material obtido do trato respiratório e, **estágio tardio**, quando o fungo era isolado de quaisquer sítios extrapulmonares.

Saag *et al.*, (1992) propuseram um sistema de classificação em pacientes com AIDS, baseado no risco de evolução para o óbito durante a terapia, mediante número de fatores associados ao mau prognóstico descrito por Diamond & Bennett (1974) para indivíduos sem AIDS, com outros fatores associados ao risco. Consideraram paciente de **baixo risco** os que tivessem menos de três fatores de mau prognóstico e os pacientes de **alto risco** aqueles que tivessem três ou mais fatores. Segundo Diamond & Bennett os fatores associados ao mau prognóstico seriam: 1) presença do fungo no LCR ao exame direto; 2) hipoglicorraquia; 3) aumento da pressão intracraniana; 4) baixa celularidade (menos de 20 células/mm<sup>3</sup>); 5) isolamento do agente de outros sítios estéreis; 6) ausência de anticorpo anti-criptocócico; 7) títulos antigênicos iniciais no LCR igual ou menor que 1:32 ; 8) doença linforreticular; 9) terapia com corticóides.

White & Armstrong (1994) propuseram outro sistema, alternativo, de estadiamento nos pacientes com AIDS, baseando-se na gradação dos mecanismos etiopatogênicos:

1. estágio 0 ⇒ colonização assintomática ou nódulo incidental (achado casual)
2. estágio I ⇒ doença pulmonar isolada
  - IA ⇒ doença localizada
  - IB ⇒ doença difusa
3. estágio II ⇒ doença não meníngea, multifocal (disseminada)
  - IIA ⇒ doença extrapulmonar
  - IIB ⇒ doença pulmonar e extrapulmonar
4. estágio III ⇒ criptococemia e meningite

Até o momento nenhuma das formas de estadiamento clínico para a infecção criptocócica conseguiu situar de forma clara a complexa inter-relação deste agente com seu hospedeiro. O papel da colonização da pele e do trato respiratório por este fungo patogênico ainda não foi completamente elucidado, assim como a dinâmica da fisiopatogenia.

### 3.4. CONSIDERAÇÕES SOBRE FISIOPATOGENIA

#### 3.4.1. Via de infecção

A infecção humana por *C. neoformans* em geral é adquirida por inalação de propágulos viáveis aerossolizados provenientes de fontes saprobióticas ambientais. O

tamanho e o peso destes propágulos, esporos ou conídios são compatíveis com deposição alveolar, favorecendo a penetração pela via aerógena.

O isolamento do fungo de escarro e a sua detecção em tecido pulmonar de indivíduos com meningite criptocócica e naqueles com outras doenças pulmonares (Haugen & Baker, 1954), bem como a descrição de complexo ganglionar pulmonar primário semelhante ao da tuberculose (Baker, 1976), além dos experimentos com animais, reforçam a participação do trato respiratório como via de infecção. O trato gastrointestinal tem sido outra via sugestiva para aquisição da infecção pelo *C. neoformans*; tal sugestão deve-se ao encontro do fungo em alimentos e à descrição de casos de criptococose gastrointestinal (Casadeval & Perfect, 1998). A inoculação do fungo por via percutânea acidental não resultou em disseminação (Halde, 1964).

A infecção criptocócica não é contagiosa, e não há evidências de transmissão inter-humana, excetuando-se dois casos que ocorreram em pacientes transplantados (Byet & Waltman 1978; Ooi *et al.*, 1971) e um outro ocorrido após acidente pérfuro-cortante com sangue de indivíduo com AIDS e criptococemia (Levitz, 1991).

A transmissão entre animais e o homem nunca foi comprovada, ainda que o *C. neoformans* tenha sido isolado de cães e gatos com e sem criptococose (Malik *et al.*, 1995, 1997; Brustein *et al.*, 1998).

### **3.4.2. Patogenicidade / virulência do *C. neoformans***

*C. neoformans* é freqüentemente relacionado como patógeno oportunista. Os fatores que o tornam patógeno estão relacionados às características básicas que possui para estabelecer infecção, sobreviver no hospedeiro superando suas defesas naturais e gerar doença. A este conjunto de fatores denomina-se virulência. Na tentativa de adaptar-se ao hospedeiro este fungo pode gerar lesão tecidual direta por invasão do tecido, ou indireta, por ação dos produtos ou metabólitos excretados, e estes associados à resposta do hospedeiro ao agente poderá gerar maior ou menor grau de patogenicidade.

Os fatores de virulência que caracterizam a patogenicidade do *C. neoformans* são:

- 1) **Tamanho da partícula infecciosa** capaz de ser aerossolizada no ambiente e alcançar o trato respiratório;

2) **Termotolêrancia**, ou seja, a capacidade de crescer à temperatura de 37°C e em pH fisiológico do hospedeiro, permitindo a invasão tecidual profunda;

3) **Cápsula criptocócica** de natureza polissacarídica, é constituída pelos açúcares manose, xilose, galactose, ácido glucurônico e grupo O-acetil, estes formam complexo maior, ácido e altamente viscoso, denominado glucuronoxilomanana (GXM) (Hogan, 1996); e dois menores galactoxilomanana (GalXM) e manoproteína (MP). O GXM e MP compõe 88% da massa capsular e a GalXM e MP compõe aproximadamente os 12% restantes. O GXM, além de ser responsável pela especificidade sorotípica do *C. neoformans*, tem ação antifagocítica (Kozel & Gotschlich 1982; Kozel, 1995; Bhattacharjee et al., 1984). O GalXM tem um restrito potencial na ativação da imunidade humoral (Reiss et. al.; 1984) e a MP modula a resposta imune celular, de hipersensibilidade retardada (Murphy et al., 1988) e ambos são ativadores da via alternativa do sistema complemento. São responsáveis pela adesividade as células endoteliais (Ibrahim et. al., 1995). Estudos indicam que a síntese da cápsula é regulada por genes cromossomiais denominados CAP10, CAP59, CAP60 e CAP64 (Chang et. al. 1996).

Em geral o *C. neoformans* é capsulado na forma parasitária em tecidos de mamíferos, excetuando-se as cepas mutantes que podem apresentar dois fenótipos, hipocapsuladas e acapsuladas. As cepas hipocapsuladas são semelhantes, tanto imunológica quanto fisico-quimicamente da forma usual, capsulada. Os mutantes acapsulados, além de perderem a virulência, perdem também a especificidade sorotípica.

Em condições ambientais áridas, quando ocorre diminuição de nutrientes e água, a cápsula confere ao fungo a capacidade de adaptar-se, ao colapsar, protegendo o fungo da desidratação; proporcionalmente também há redução de seu tamanho, ideal para aerossolização e deposição alveolar.

*In vitro* a espessura da cápsula é variável, sendo estimulada produção em concentrações fisiológicas de íons bicarbonato e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e quando há diminuição na concentração de ferro. Em condições superfisiológicas de sais e açúcares simulando em parte condição de estresse ambiental para o fungo, há redução da espessura capsular. Logo, a produção da cápsula parece ser regulada por um modelo que consiste na adaptação ao parasitismo.

O polissacarídeo criptocócico aumenta a infectividade do HIV1 em cultivo de células, induzindo a formação de sincício *in vitro*, causado pelo aumento da aderência do vírus a

célula alvo (Kozel, 1995). A potencialização da infectividade do HIV pode explicar, ao menos parcialmente, o prognóstico pior de pacientes com SIDA que desenvolvem a criptococose.

4) **produção de melanina** é iniciada por uma enzima ligada à membrana celular, a fenoloxidase (lacase), que catalisa a oxidação de catecóis em intermediários instáveis, que autopolimerizam na formação de melanina. Esta contribui para a sobrevivência fúngica por promover a integridade da parede celular. Em 1996, Wang demonstrou que a resistência das células fúngicas a agentes ácidos e desnaturizantes era diretamente proporcional ao aumento da deposição de melanina na parede celular. A melanização, além de promover a resistência à ação antioxidante dos superóxidos derivados do oxigênio e nitrogênio encontrado em fagosomas de macrófagos e células da micróglia e na natureza, também protege dos efeitos fungicidas da radiação ultravioleta e diminui a susceptibilidade à anfotericina B (Kwon-Chung & Rhodes, 1986).

Jacobsom *et al.*, (1996) descreveram a regulação inversa entre os dois fatores de maior virulência do *C. neoformans*, a fenoloxidase tem sua atividade aumentada quando há aumento da concentração de ferro no ambiente e tem sua atividade reprimida na presença de glicose e em temperatura maior que 25°C (termosensível) enquanto que a produção da cápsula polissacarídica é induzida pela diminuição da concentração de ferro e aumento da concentração de açúcares, e a temperatura 37° C não inibe sua produção.

Todos esses dados sugerem que a produção de melanina contribui para o aumento da virulência por proteger o *C. neoformans* não só dos mecanismos de defesa antimicrobiana do hospedeiro como também dos fatores ambientais (Kozel, 1995).

5) **Produção de D-manitol** pelo *C. neoformans* é proporcional ao crescimento fúngico.

Pelo menos dois mecanismos têm sido propostos para o papel da produção de manitol na virulência: a produção de edema pelo efeito osmótico e pela ação de captar radicais hidroxil exerce ação de proteção do fungo contra radicais livres (superóxidos tóxicos) produzidos pelos fagócitos do hospedeiro (Wong *et al.*, 1990).

Entre outros potenciais fatores de virulência do *C. neoformans*, destacam-se a produção de superóxido desmutase, proteases, fosfolipases (Buchanan & Murphy; 1998).

### 3.4.3. Mecanismos de defesa do hospedeiro

Barreiras mecânicas naturais e a imunidade humoral e celular, correspondem aos mecanismos básicos de defesa do hospedeiro humano e animal.

As barreiras mecânicas são exercidas pela integridade do sistema epitelial cutâneo-mucoso, o sistema mucociliar do epitélio respiratório auxiliam no *clearance* do microrganismo, a elevada temperatura corporal do hospedeiro variando de 36,5 a 38°C, o elevado pH dos fluidos corporais inibem o crescimento do *C. neoformans*.

Quanto às barreiras imunológicas humorais atuando de maneira inespecífica o sistema complemento é fortemente ativado pela via alternativa através dos polissacarídeos capsulares GalX e MP.

A ausência do componente C5a do complemento tem sido associada com a diminuição da resistência a infecção por *C. neoformans*.

Os macrófagos têm sido mostrados como inibidores da disseminação criptocócica devendo ser ativados para se tornarem efetivos eliminadores do *C. neoformans*. Assim, a imunidade ao *C. neoformans* depende de uma complexa interação de fatores humorais e celulares, ou seja, a estimulação do hospedeiro ao *C. neoformans* pode auxiliar na reação de hipersensibilidade retardada (DTH), a qual primariamente levará ao início da produção de linfocinas e subsequentemente aumentará a produção de complemento e ativará macrófagos (Fromtling & Shadomy, 1982).

Sumariamente, os mecanismos fisiopatogênicos da criptococose que determinam o quadro clínico estão inteiramente relacionados à capacidade de resposta do hospedeiro e à virulência do *C. neoformans*. Por sua vez, a principal variável do hospedeiro que interfere no quadro clínico é o seu perfil imunológico, principalmente representado pela imunidade celular através da contagem de CD<sub>4</sub>, e a principal variável do parasita é a diferente patogenicidade das duas variedades, var *gatti* e var. *neoformans*.

### 3.5. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

O perfil clínico e epidemiológico da criptococose difere nos indivíduos imunocompetentes para os imunodeficientes, sejam infectados ou não pelo HIV. A começar, no indivíduo imunocomprometido isolamos com maior freqüência a variedade *neoformans*, sendo rara a ocorrência da variedade *gatti*.

A criptococose é uma das doenças definidoras do estágio avançado da infecção pelo HIV. Uma vez que ocorre com maior freqüência em indivíduos HIV positivos intensamente

imunocomprometidos, com a dosagem de linfócitos tímicos CD<sub>4</sub> positivos em geral abaixo de 200 células/mm<sup>3</sup>. Embora possa se manifestar em qualquer período no curso da infecção pelo HIV, não é incomum apresentar-se como primeira infecção oportunística nestes indivíduos (Severo *et. al.*, 1993).

A forma de apresentação clínica mais comum é a disseminada, a qual em geral manifesta-se inicialmente de maneira inespecífica com síndrome febril e mal-estar. O SNC é o sítio mais comum da infecção disseminada, caracterizando-se principalmente como meningite e meningoencefalite, e é em geral secundário a sítio extraneural, tal como pulmão, próstata, pele, sangue. Em pacientes com AIDS e meningoencefalite, a duração dos sinais e sintomas pode ser mais curta que nos imunocompetentes. Nos imunocompetentes, história clínica em geral é subaguda ou crônica, com duração de semanas ou meses antes do diagnóstico (Barraviera, 1985). A avaliação do SNC é essencial quando a criptococose é diagnosticada em qualquer outro sítio. Um estudo realizado em pacientes com AIDS que apresentavam pneumonia criptocócica revelou que dos onze pacientes, nove tinham também meningite (Gal Koss *et. al.*, 1986). A apresentação clínica da meningoencefalite criptocócica é insidiosa e inespecífica. Os achados clínicos mais comuns são a febre, mal estar cefaleia náusea, vômitos, alterações do estado de consciência (sonolência, confusão mental, torpor, coma), rigidez de nuca (ocorre em menos de 50% nos pacientes HIV positivos). Em menor frequência, os sinais focais, como hidrocefalia, papiledema, distúrbios visuais e lesões de pares cranianos (Londero & Gonçalves 1988, Kestelyn, 1993).

O sítio extraneural mais comum da infecção criptocócica são os pulmões, e os sintomas variam significativamente tanto em frequência, quanto intensidade nos indivíduos sem e com AIDS. Os sintomas são mais severos nos indivíduos com AIDS e o *C. neoformans* tende a disseminar-se para outros órgãos e sistemas. Os principais sintomas são febre, tosse, dispnéia, perda ponderal, e cefaléia, aumento da secreção brônquica, com a eventual ocorrência de escarro hemoptóico, dor pleurítica e derrame pleural. A criptococose no imunocompetente em geral não dissemina e tem decurso auto limitado, mas eventualmente pode manifestar-se como pneumonia progressiva, ou com lesões pulmonares císticas que podem comprimir mecanicamente estruturas circunjacentes, inclusive simulando tumor de Pancoast (Mitchell & Sorrell, 1992). Achados radiológicos são inespecíficos e incluem infiltrado intersticial e focal, linfadenopatia, derrame pleural e nódulos pulmonares. Em indivíduos com AIDS, não deve ser descartada de coinfeção por outros agentes

(*Pneumocystis carinii*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Histoplasma capsulatum*, citomegalovírus).

As manifestações cutâneas, em geral secundária a disseminação, podem apresentar-se como lesões umbelicadas semelhantes a molusco contagioso, pápulas ou placas violáceas semelhantes a sarcoma de Kaposi (Londero & Gonçalves, 1988; White & Armstrong, 1992).

Manifestações osteoarticulares são raras, caracterizam-se por osteomielite ou artrite, clinicamente sintomas de dor óssea e febre baixa, ao exame radiológico observam-se lesões líticas (Barraviera, 1985). Outros órgãos e sistemas podem ser afetados como gastrintestinal, cardiovascular, aparelho genito-urinário, glândulas adrenais, tireóide, entre outros. Particular atenção merece a próstata, que pode manter-se como um sítio potencial de reinfeção endógena ou recidiva da criptococose em pacientes imunodeficientes, uma vez que há dificuldade na erradicação deste sítio potencialmente protegido da terapia antifúngica.

### 3.6. DIAGNÓSTICO

O polimorfismo sintomatológico da criptococose, seja no hospedeiro imunocompetente ou imunodeficiente, pode mimetizar inúmeras doenças, de caráter infeccioso ou não, tornando necessário um diagnóstico diferencial abrangente, baseado não só em achados clínicos e laboratoriais, mas também epidemiológicos.

A maioria dos casos diagnosticados de criptococose corresponde ao comprometimento do sistema nervoso central e o líquido cefalorraquidiano (LCR) é o material biológico mais comumente utilizado no diagnóstico (Oliveira-Netto, 1983).

O LCR pode ser obtido por punção lombar ou cisternal. Os achados citológicos e bioquímicos não são tão expressivos. O aspecto deste material é freqüentemente claro ou opalescente, com celularidade baixa e predomínio linfomononuclear, a dosagem de proteína tende a ser moderadamente elevada e a glicose diminuída. A pressão liquórica pode ser normal ou um pouco elevada.

O diagnóstico laboratorial em diferentes materiais biológicos pode ser feito pelos métodos:

- **Exame microscópico direto:** Usualmente realizado em LCR, mediante a utilização de birrefringência formado entre a parede celular e o nanquim, representando a cápsula

polissacarídica. É possível, inclusive, sugerir a provável variedade do fungo, visto que algumas cepas da variedade *gattii* apresentam morfologia peculiar (formas capsuladas alongadas, baciliformes, ao lado de formas clássicas, redondas e ovóides) da variedade *neoformans* em parasitismo. Esta morfologia é revertida em meio saprobiótico (cultura). Segundo Arechavala (1993) por este método simples, tem sido obtido uma positividade, mais de 80% em pacientes com AIDS e meningoencefalite criptocócica e em 30 a 50% de pacientes com criptococose sem AIDS, tem sensibilidade estimada 83,6 %.

- **Sorologia:** Pode ser feita pesquisa de antígeno ou anticorpo, a mais usada é a pesquisa de antígeno utilizando-se a prova do látex. Nesta prova, uma partícula inerte de látex é sensibilizada com anticorpos contra antígenos capsulares. A positividade é visualizada pela presença de aglutinação. O teste de aglutinação tem aproximadamente 95% de sensibilidade e especificidade. A titulação da reação do látex realizado tanto em soro quanto em LCR e pode auxiliar quanto a eficácia do tratamento e evolução da doença, visto que a positividade, indica também a viabilidade fúngica. Reações falsas positivas ou negativas podem ocorrer nos fluídos biológicos testados. Reações cruzadas induzindo a um resultado de falso-positivo podem ocorrer na presença de fatores reumatóides e na infecção por outros microorganismos, especificamente em infecções disseminadas por *Trichosporon beigeli* e *Stomatococcus mucilaginosus* (Campbell *et. al.*, 1985; Charnock, 1993).

As reações falso-negativas podem ser explicadas de diversas formas: Fenômeno de prozona (por excesso de antígeno) podendo ser corrigido diluindo-se o material biológico utilizado (soro ou LCR), pela baixa sensibilidade do *Kit* comercial usado; ou ainda pela formação de complexos imunes (antígenos anticorpos), o que pode ser corrigido através do tratamento do fluído biológico com enzima pronase, a qual tem a capacidade de desprender o antígeno do anticorpo (complexo imune) e 2-β mercaptoetanol atuando em fatores reumatoides; ou ainda outros fatores associados (Currie, 1993; Gray & Roberts, 1988a).

Outros métodos de imunodiagnóstico têm sido investigados como ensaios com anticorpos monoclonais e métodos imunoenzimático do tipo ELISA para detecção de antígenos polissacarídeos capsulares do *Cryptococcus* (Kwon-Chung & Bennett 1992; Dromer, 1993).

- **Cultura:** O meio de cultivo mais utilizado para fluídos biológicos habitualmente estéreis é o Sabouraud dextrose ágar a 2%, após a inoculação asséptica do espécime clínico, este pode ser mantido à temperatura ambiente ou em estufa à 37°C. O crescimento fúngico ocorre em geral no período de 24 horas a dez dias, podendo variar de acordo com o número de microorganismos viáveis, principalmente na vigência do tratamento, chegando por vezes o crescimento demorar até dois a meses ocorrer. Para o cultivo de outras amostras clínicas potencialmente contaminadas (com outros microorganismos) como urina, escarro, secreção bronquial (obtido por expectoração espontânea ou induzida, lavado brônquico e bronco-alveolar), fragmentos de tecidos (gânglios, fígado, pele - obtidos por biópsias), um excelente meio de cultura seletivo e indicador utilizado é o meio contendo sementes de niger (*Guizotia abyssinica*, sementes de alimentação de pássaros) ou que contenham derivados de ortodifenólicos. As colônias de *C. neoformans* adquirem coloração marrom escuro devido a presença da enzima de membrana fenoloxidase destes fungos que transformam estes substratos em melanina. No estudo da levedura o meio CGB tem sido empregado (Melo et al., 1993).

- **Histopatológico:** O estudo histopatológico de peças de biópsia, com vistas à identificação do *C. neoformans*, deve ser feito através de colorações usuais como Giemsa ou hematoxilina-eosina, e específicas para cápsula, o mucicarmim, ou para fungos, a impregnação argêntica (prata-metenamina de Gomori-Grocott) (Arachevala, 1993; Gray & Roberts, 1988 b).

- **Exames complementares:** Na investigação da doença criptocócica devem ser incluídos exames complementares inespecíficos para evidenciação de seqüelas decorrentes da micose. Diagnóstico por imagem como a telerradiografia - de tórax (presença de nódulos subpleurais, podem ser indicativos de criptococose pulmonar), de seios da face – sinusopatias, de ossos – lesões líticas (Gurevitz, 1994); tomografia computadorizada ou ressonância nuclear magnética, orientando quanto à presença de hidrocefalia, criptococoma; broncoscopia com lavado brônquico; exame de fundo de olho para evidenciação de papiledema, coroidite, neuroretinite pelo *C. neoformans* (Kestelyng, 1993).

- **Diagnóstico diferencial:** No diagnóstico diferencial das meningoencefalites a liquor claro destacamos:

1. Doenças infecciosas: - Causadas por bactérias, tais como tuberculose, leptospirose, doença de Lyme, brucelose, sífilis terciária, nocardiose; por fungos - coccidioidomicose, cromoblastomicose, histoplasmose, paracoccidioidomicose; por vírus como HIV, citomegalovirose, herpes vírus; por protozoário – *Toxoplasma gondii*; por metazoária cisticercose.
2. Doenças de causa não infecciosas como neoplasias, sarcoidose, lúpus eritematosos sistêmicos, doença de Behçet, Granulomatose de Wegener.

## **4 - CASUÍSTICA E MÉTODOS**

### **4.1. CASUÍSTICA**

**Fase 1 - Colonização cutâneo-mucosa e/ou infecção por *Cryptococcus neoformans* em 100 indivíduos HIV-positivos, com ou sem síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS).** Realizada no período de maio de 1990 a dezembro de 1992, pela equipe clínica e do Laboratório de Micologia Médica do Hospital Evandro Chagas, da Fundação Oswaldo Cruz.

**Fase 2 - Revisão dos prontuários dos 100 indivíduos da primeira fase.** Realizada entre dezembro de 1995 e março de 1996.

**Fase 3 - Colonização cutâneo-mucosa e/ou infecção por *Cryptococcus neoformans* em 28 dos 30 indivíduos remanescentes da casuística inicial (n=100).** Realizada de abril de 1996 até agosto de 1997, repetindo o protocolo da primeira fase.

**Fase 4 - Acompanhamento até maio de 1999.**

### **4.2. METODOLOGIA**

#### **4.2.1. Desenho do estudo**

Trata-se de estudo de *follow-up* interrompido ou Coorte interrompida, segundo Kleinbaum, Kupper & Morgenstern, 1982.

Todos os casos de colonização e infecção por *C. neoformans* identificados através dos procedimentos estabelecidos nos protocolos das fases 1 e 3 serão descritos detalhadamente. Serão também objeto de descrição detalhada os casos de criptococose identificados no acompanhamento médico de rotina, apurados na mesma população alvo (N = 100) ao longo de todo o estudo. Os óbitos ocorridos durante o período de estudo também serão analisados detalhadamente, bem como as necrópsias realizadas.

#### **4.2.2. Seleção dos pacientes**

De maio de 1990 a novembro de 1992, todos os indivíduos soro-reagentes ao HIV (independente do estadiamento clínico) que compareceram pela primeira vez ou à consulta de rotina foram informados e convidados a participar do projeto de pesquisa desenvolvido no Serviço de Micologia. Após esclarecimentos técnicos quanto aos objetivos e procedimentos que seriam realizados, os pacientes consentiram aderir ao projeto.

#### **4.2.3. Protocolo**

O protocolo do projeto, antes da consulta aos pacientes e implantação da metodologia preconizada, foi submetido e aprovado pela comissão de ética da FIOCRUZ. Todos os indivíduos incluídos no estudo deram o seu consentimento após informação detalhada dos propósitos do protocolo.

Os pacientes foram encaminhados à consulta e seguiu-se preenchimento de ficha padrão, constando dados de identificação, história patológica pregressa (HPP), dados clínicos atualizados e exame físico; e posteriormente conduzidos ao Serviço de Micologia Médica do HEC, para coleta de espécimes clínicos (anexo IV).

Foram coletados raspados de interdígito dos pés, das mãos, da superfície ventral de língua e de fossa nasal. O escarro também foi colhido quando havia eliminação espontânea, além de urina matinal (uma amostra).

A infecção pelo HIV foi detectada mediante realização de dois testes sorológicos do tipo ELISA e confirmada por imunofluorescência e/ou Western-Blot (Ministério da Saúde, 1989).

Durante o projeto, os que apresentaram isolamento de *Cryptococcus neoformans* nos espécimes colhidos de rotina, foram submetidos a nova avaliação clínico-laboratorial dirigida, sendo inspecionado pele e mucosas, e quando necessário, solicitada radiografias de seios da face e de tórax, broncoscopia com lavado e/ou biópsia transbrônquica, coleta de sangue para realização de hemoculturas e pesquisa de antígenos pelo teste de aglutinação em látex. Coleta de urina com pesquisa direta e cultura. Coleta de líquido cefalorraquidiano (LCR), quando indicado, com realização de citometria, bioquímica, exame microscópico direto em nanquim, cultivo e pesquisa de antígenos pelo teste de aglutinação em látex. Estes exames tiveram por objetivo distinguir casos iniciais da micose e situações de colonização cutâneo-mucosa, procedendo-se tratamento clínico quando necessário.

No período de abril de 1996 a agosto de 1997, dos 30 indivíduos remanescentes da casuística inicial (n=100), 28 participaram de nova investigação de colonização cutâneo-mucosa, baseado no mesmo protocolo desenvolvido de maio de 1990 a dezembro de 1992; dois destes pacientes se recusaram a participar de nova investigação. Face à exiguidade de escarro obtido por eliminação espontânea, optamos em acrescentar ao estudo o procedimento de indução ao escarro e introduzimos a dosagem de CD<sub>4</sub> e CD<sub>8</sub>, o que não foi realizado regularmente na fase I do estudo.

No mesmo dia da coleta dos espécimes clínicos para estudo micológico, procedeu-se à coleta de sangue para realização para contagem de CD<sub>4</sub> e CD<sub>8</sub>. O fluxograma de trabalho está anexado (anexo IV).

Os dados, obtidos na avaliação clínica, consulta aos prontuários e análise de necrópsias, foram registrados em fichas padronizadas, respectivamente, anexos III e IIIa, e digitados em um banco de dados utilizando-se o programa Epi Info (Epi Info 6.02, outubro - 1994, Center for Disease Control, Atlanta, USA).

#### **4.2.4. Coleta de espécimes clínicos e isolamento primário de *C. neoformans***

Os espécimes clínicos foram coletados assepticamente, do seguinte modo:

- Os raspados de interdígito dos pés, das mãos, de superfície ventral de língua, foram realizados com curetas estéreis, sendo ressuspensos em 3 mililitros (ml) de água destilada estéril, e semeado 0,1 ml da solução, por placa.

- Os materiais coletados da cicatriz umbilical e fossa nasal anterior foram obtidos com o auxílio do swab fino, estéril, umedecido com água destilada estéril e semeados diretamente em placa, sem diluição.
- A urina matinal foi coletada assepticamente pelo paciente orientado quanto ao procedimento de coleta (Resumidamente: antissepsia local, desprezar o primeiro jato e colher o posterior). A amostra de urina homogeneizada foi colocada em tubo de ensaio estéril e centrifugada a 2.500 rotações por minuto (rpm), por 10 minutos, e 0,1 ml do sedimento urinário foi semeado.
- O escarro foi obtido de forma espontânea ou induzido por nebulização com solução salina. O material foi acondicionado em frasco estéril e colocado posteriormente em placa de Petri estéril (para melhor visualização - separação de escarro e saliva), sendo semeado por esgotamento.
- Foram utilizadas cinco placas de Petri (contendo meio seletivo - Niger ágar cloranfenicol- NSA) por espécime clínico; sendo mantidas à temperatura ambiente e observadas diariamente por 7 a 10 dias (anexo I). As colônias fenoxidases positivas - de cor marrom no meio NSA, foram subcultivadas em meio sabouraud dextrose ágar (SC) para provas morfo-fisiológicas.

#### **4.2.5. Estudo da variedade de *Cryptococcus neoformans***

- Foi feito através da técnica de cultivo em meio de Canavanina Glicina Bromotimol (CGB - Kwon-Chung, Polacheck & Bennett, 1982) (Anexo II).

#### **4.2.6. Sorotipagem**

Todas as cepas de *Cryptococcus neoformans* isoladas, de espécimes clínicos durante o projeto, ou de rotina nestes 5 anos, foram estocadas no banco de cepas do Laboratório (Serviço) de Micologia Médica/HEC/FIOCRUZ/RJ. Posteriormente, foram submetidas ao teste de aglutinação com partícula de látex sensibilizada pelos fatores séricos contra seguintes antígenos capsulares: 1, 5, 6, 7 e 8. O látex sensibilizado utilizado foi do *kit* Crypto Check Iaton RM. 304-k, desenvolvido no Japão. A escolha destes fatores séricos encontrados no kit

deveu-se à frequência destes em determinados *C. neoformans* caracterizando sorotipos de importância médica.

Na caracterização dos sorotipos de *C. neoformans* são observados os seguintes fatores: sorotipo A (fatores 1 e 7), sorotipo D (fatores 1 e 8), sorotipo AD (fatores 1,7 e 8), sorotipo B (fatores 1 e 5) e sorotipo C (fatores 1 e 6), respectivamente.

#### **4.2.7. Contagem de CD4 e CD8**

A técnica de marcação imunofenotípica celular para contagem de CD4 e CD8 em sangue periférico, foi realizado no laboratório de marcadores celulares do Centro de Estudos de Medula Óssea (CEMO) do Instituto Nacional do Câncer (INCA).

A metodologia empregada para separação celular foi método de lise, utilizando-se sangue total heparinizado, este coletado assepticamente e conservado em gelo até o processamento. Este método tem por objetivo lisar, ou seja, destruir as células que possam interferir na contagem dos linfócitos marcados, além de diminuir o manejo do sangue e ser uma técnica mais rápida em relação a separação celular com ficol.

Descrição sumária:

Amostra: Em um tubo de ensaio (um para cada marcador celular – painel de anticorpos monoclonais utilizados foi: anti CD3, CD4, CD8, CD14, CD45 e IgM) colocou-se 100 µl de sangue total heparinizado e a este foi adicionado 20 µl de anticorpo monoclonal e incubado por 15 minutos à temperatura ambiente, no escuro.

Etapa de Lise: À amostra de sangue já preparada em etapa anterior foi adicionada 2 ml de solução de lise Becton Dickson e esta foi misturada imediatamente por inversão do tubo e incubado por 10 minutos à temperatura ambiente, no escuro. Centrifugada a 300 g por 5 minutos, sendo posteriormente decantado o sobrenadante. Ao precipitado celular, procedeu-se lavagem por três vezes com 2 ml de solução tampão fosfato (PBS com pH 7,0) com 0,1% de azida sódica, misturando-se com “Vortex” e centrifugada 300 g por 5 minutos. Após a última lavagem decantou-se e ao precipitado celular foi adicionado fixador (PBS com pH 7,0 com 0,5% de paraformaldeído). O restante da fixação ocorreu em 30 minutos a 4 °C. A leitura do painel foi realizada na mesma semana, por citometria de fluxo.

#### 4.2.8. Sorologia

A metodologia empregada para detecção de antígenos (Ag) criptocócicos (polissacarídeos capsulares) em espécimes clínicos foi teste de aglutinação. Partículas de látex sensibilizadas com altos títulos de globulina contra Ag criptocócico reagem à presença de antígenos criptocócicos capsulares ocorrendo a aglutinação.

O *kit* utilizado foi Latex Crypto Antigen System da Immuno Mycology®. O limite de detecção de antígenos neste teste variava entre 0,625ng/ml a 2,5 ng/ml ou maior em fluídos corporais como soro e LCR.

A presença de fatores reumatóides e complexos imunes circulantes que poderiam interferir no resultado são eliminados com a introdução de complexo de enzimas proteolíticas denominado pronase, para tratamento da amostra. Este tem função dual de clivar anticorpos (Ac) em complexos imunes sem afetar o antígeno, facilitando sua detecção, e destruir fatores reumatóides tornando-os indetectáveis. A pronase é composta por duas endoproteases e duas exoproteases, as quais são capazes de digerir proteínas de baixo peso molecular através dos aminoácidos livres (Gray & Roberts, 1988a).

## I. Reagentes e materiais:

- A- Tampão diluente glicina com albumina
- B- Reagente globulina anticriptocócica (latex sensibilizado)
- C- Controle de antígenos criptocócicos (baixo peso molecular – 15 ng/ml)
- D- Pronase
- E- Controle negativo - Soro normal inativado a 56° C por 30 minutos em “banho-maria”
- F- Tubos de ensaio rosqueado
- G- Placas
- H- Inibidores da enzima

## II. Metodologia

### 1) Preparo das amostras:

- 300µl de soro ou LCR em tubo contendo 50 µl de pronase em tubo de ensaio;
- Misturar com mix ou vortex fechar o tubo e colocar em “banho-maria” a 56°C por 30 minutos;
- Adicionar 50 µl de inibidor da enzima.

Observações: 1) - O soro e LCR devem estar livres de células sanguíneas, plaquetas, fibrina, muco ou outros contaminantes. 2) - Espécime pode ser testado imediatamente ou ser estocado a 4°C por uma semana, estocagem mais longa ode ser feita com freezer à -20°C.

## 2) Técnica (em placa escavada)

Latex sensibilizado (anti crypto globulin) - adicionar 25µl em cada cavidade		
Espécime clínico (Soro ou LCR tratado com pronase) <b>25µl</b>	<b>Controle (+)</b> (Anti-γ globulina humana-Fator reumatóide) <b>25µl</b>	<b>Controle (-)</b> (soro inativado a 56°C por 30 minutos) <b>25µl</b>



Aglutinação

Misturar e agitar a 100 rotações por minuto (rpm), 10 minutos à temperatura ambiente.

Ler imediatamente após.

3) Interpretação da reação: Aglutinação é considerada positiva a presença de antígeno criptocócico no fluido corpóreo testado. Leitura deve ser comparada aos controles.

### 4.2.9. Definições

#### 4.2.9.1 - Definição de casos de SIDA

Os casos de SIDA no grupo estudado foram definidos inicialmente através da utilização dos critérios CDC, Atlanta, USA (1987) e revisado pelo critério CDC, Atlanta, USA (1993) que incluiu a contagem de células CD4 como parâmetro laboratorial para evolução da doença.

#### 4.2.9.2 - Colonização ou saprofitismo cutâneo-mucoso

Este tipo de relação é caracterizado pela utilização do hospedeiro pelo parasita, como suporte mecânico e alimentar, sem prejuízo para o hospedeiro, ou seja, destituído do caráter patogênico (Rey, 1995).

Os critérios utilizados em conjunto para caracterização do saprofitismo cutâneo-mucoso neste trabalho foram definidos da seguinte forma:

- Isolamento de *C. neoformans* de um ou mais espécimes clínicos obtidos de superfícies cutâneo-mucosas;
- Látex negativo, indicando ausência de antígenos específicos do *C. neoformans* em soro e LCR;
- Ausência de sinais e sintomas indicativos de doença;
- Nos casos de pacientes que foram submetidos ao estudo de necrópsia, ausência do fungo no tecido.

#### 4.2.9.3 - Infecção / doença criptocócica

É caracterizada pelo caráter patogênico da relação entre parasita e hospedeiro, ou seja, há prejuízo do hospedeiro.

Os critérios utilizados para determinação da infecção pelo *C. neoformans* no grupo de pacientes estudados foram:

- Isolamento de *C. neoformans* de um ou mais espécimes clínicos que refletissem a origem do fungo sistemicamente, entre os quais líquidos orgânicos estéreis como sangue e líquido cefalorraquidiano (LCR);
- Presença de sinais e sintomas indicativos de infecção, como febre (temperatura  $\geq 37,8^{\circ}\text{C}$ ), tosse, cefaléia, sinais de irritação meníngea;
- Exames complementares sugestivos da doença, como alterações radiológicas em telerradiografia de seios da face, tórax e tomografia computadorizada de crânio; pesquisa do agente em locais habitualmente estéreis (sangue, LCR), pesquisa de soro reatividade para o agente - teste de látex, entre outros;
- Nos casos que tiveram estudo de necrópsia, a presença do parasita no tecido.

## 5 - RESULTADOS

### 5.1 - FASE 1

Colonização cutâneo-mucosa e/ou infecção pelo *Cryptococcus neoformans* em 100 indivíduos HIV-positivos, com ou sem síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS).

No período de maio de 1990 a dezembro de 1992, dos 100 indivíduos estudados, foram diagnosticados **três casos de colonização** (pacientes nº 20, nº 57 e nº 77), sendo o primeiro caracterizado como colonização transitória e os outros dois como colonização, em possível estágio inicial de infecção, devido ao baixo nível de CD<sub>4</sub> (< 200 céls/mm<sup>3</sup>) [Quadro 1, Anexo V] e **três casos de doença criptocócica disseminada** (pacientes nº 14, nº 15 e nº 74) [Quadro 2, Anexo VI].

Descrição detalhada dos casos de colonização e/ou infecção (Fase 1)

#### A. Colonização (3 casos)

O **paciente nº 20**, de 49 anos de idade, masculino, natural do RJ, agente de viagens, homossexual, estágio III de classificação pelo CDC (1989), com níveis de CD<sub>4</sub> maior que 300 células /mm<sup>3</sup>. Este, além de apresentar isolamento de *C. neoformans* de *swab* nasal, também apresentava em escarro, após investigação clínica e laboratorial, ficou demonstrado ausência de disseminação fúngica, uma vez que não foi encontrado o *C. neoformans* em qualquer outro sítio além da mucosa respiratória alta. Houve repetição da coleta de material de fossa nasal por quatro vezes consecutivas e todas foram negativas, corroborando colonização transitória por *C. neoformans*. O exame radiológico do tórax foi normal. Evoluiu para óbito, quatro anos após (6/01/1995), por distúrbio metabólico, sem nenhuma evidência de criptococose disseminada, segundo informações colhidas no prontuário.

Os **pacientes nº 57 e nº 77**, internados para investigação clínica e laboratorial rotineira de infecção oportunística, foram também submetidos ao presente protocolo de colonização cutâneo-mucosa por *C. neoformans*, o que permitiu verificar a presença desta levedura em amostra de escarro em ambos.

O **paciente nº 57**, de 37 anos de idade, masculino, natural do RJ, internado com síndrome febril, encontrava-se em fase evoluída, no estágio IV de AIDS, e apresentava também paracoccidiodomicose disseminada crônica, que em anos anteriores levava a extensa alteração morfológica e funcional de mucosa oro-nasal e brônquica de *C. neoformans* var *neoformans* Sorotipo A foi isolado de escarro, sendo a investigação do fungo em outros locais negativa, inclusive os testes sorológicos em LCR e soro, o que sugeriu que o paciente estivesse colonizado por *C. neoformans*. Por ser classificado em estágio IV de AIDS não foi possível distinguir colonização do estágio inicial de infecção por *C. neoformans*, ainda que tivesse CD<sub>4</sub> maior que 300 céls. / mm<sup>3</sup>, apresentava graves infecções oportunistas concomitantes.

O **paciente nº 77**, de 61 anos de idade, masculino, natural do estado da Paraíba foi internado para tratar leishmaniose tegumentar americana resistente ao glucantime e iria iniciar terapia com anfotericina B. Concomitantemente apresentava candidíase oral, isosporíase grave com desidratação e hanseníase *boderline* com presença de globias e estava sob tratamento com clofazimina. Apresentava CD<sub>4</sub> de 40 cels/mm<sup>3</sup> e CD<sub>8</sub> de 328 cels/mm<sup>3</sup>. Não apresentava manifestações respiratórias baixas nem anormalidades ao exame radiográfico do tórax. Entretanto, o exame radiológico dos seios da face revelou espessamento dos seios maxilares à direita e à esquerda, indicando sinusite assintomática. O líquido de lavagem dos seios paranasais foi negativo para fungo, mas o escarro colhido revelou a presença de *C. neoformans*. A investigação complementar neste caso com sorologias negativas, hemocultura e urina negativas sugeriu colonização de mucosa respiratória, entretanto devido ao perfil clínico e laboratorial do paciente não foi possível distinguir colonização do estágio inicial de infecção por *C. neoformans*. Evoluiu para óbito cinco meses após devido a causas metabólicas não especificadas e o estudo de necrópsia não revelou qualquer forma parasitária que sugerisse *C. neoformans*.

## **B. Infecção / doença criptocócica disseminada (3 casos)**

O **paciente nº 14**, de 40 anos de idade, masculino, natural do RJ, homossexual, após investigação clínica e laboratorial para confirmar o estado de colonização, foi demonstrado tratar-se de caso de criptococose disseminada, uma vez que o fungo foi isolado em outros sítios (urina, sangue e LCR) - Anexo VIII - Fig. 1B). Este paciente, estágio IV de AIDS, segundo classificação do CDC (1989), apresentava nível de CD<sub>4</sub> igual a 37 células/mm<sup>3</sup>.

Clinicamente apresentava síndrome febril, sinais e sintomas de sinusite, porém não foi possível a obtenção de material deste local. Embora tenha sido encontrado látex positivo para *C. neoformans* em LCR, não apresentou sinais clínicos de comprometimento do SNC, e os parâmetros citológicos e bioquímicos do LCR estavam normais. Foi tratado com anfotericina B e manteve-se em esquema profilático e até dois anos após a terapia não havia ocorrido reativação da doença, últimos resultados dos exames laboratoriais urinocultura, hemocultura, cultura do LCR foram negativos para *C. neoformans* até 22/12/1992. O óbito ocorreu por causa ignorada em 21/3/93.

O **paciente nº 15**, de 30 anos de idade, masculino, natural do RJ, copeiro e homossexual. Em maio de 1991 foi internado para investigar síndromes febril e diarreica, sendo também introduzido no estudo de colonização por *C. neoformans*. Foi diagnosticada criptococose disseminada sem alteração neurológica, a partir do isolamento de *C. neoformans* de urina e sangue. À ocasião tinha CD<sub>4</sub> de 44 células / mm<sup>3</sup>. O exame radiológico do tórax revelou infiltrado intersticial bilateral. Foi diagnosticada concomitantemente bacteremia por *Salmonella typhimurium*. Iniciada terapia antifúngica com anfotericina B e antibioticoterapia com cloranfenicol. Foi medicado também com anfotericina B, com dose acumulada de 2g. O paciente manteve urinocultura positiva para *C. neoformans* durante três meses. Evoluíu para o óbito em outubro de 1991, apresentando citomegalovirose disseminada. Em estudo de necropsia, não foi encontrado qualquer vestígio do *C. neoformans* em fígado, baço, medula óssea ou próstata. Contudo, há relato de comprometimento pulmonar por CMV (inclusão citomegálica), enfisema pulmonar, edema e hemorragia pulmonar, além de processo inflamatório crônico de natureza fúngica leveduriforme; entretanto, não obtivemos a lâmina da peça necropsiada para revisão, embora o Serviço de Anatomia Patológica não afirmasse uma etiologia para a levedura encontrada.

O **paciente nº 74**, de 46 anos de idade, masculino, natural do Amazonas, desenhista, grupo IV para AIDS (CDC, 1989), foi internado com síndrome febril no final do mês de julho de 1992 para investigar infecções oportunistas, sendo também incluído no protocolo de investigação de colonização por *C. neoformans*. Foi diagnosticada criptococose disseminada sem comprometimento neurológico, através do isolamento de *C. neoformans* de urina e de medula óssea. Não houve isolamento de *C. neoformans* de mucosa respiratória. Lavado bronco-alveolar foi positivo para *Pneumocystis carinii*. Evoluíu para o êxito letal em agosto de 1992. Estudo de necrópsia revelou como causa do óbito pneumocistose e criptococose

disseminada, sem comprometimento neurológico. Foi constatada a presença do fungo em próstata, medula óssea e fígado.

## 5.2 - FASE 2 -REVISÃO DOS PRONTUÁRIOS DOS 100 INDIVÍDUOS DA PRIMEIRA FASE.

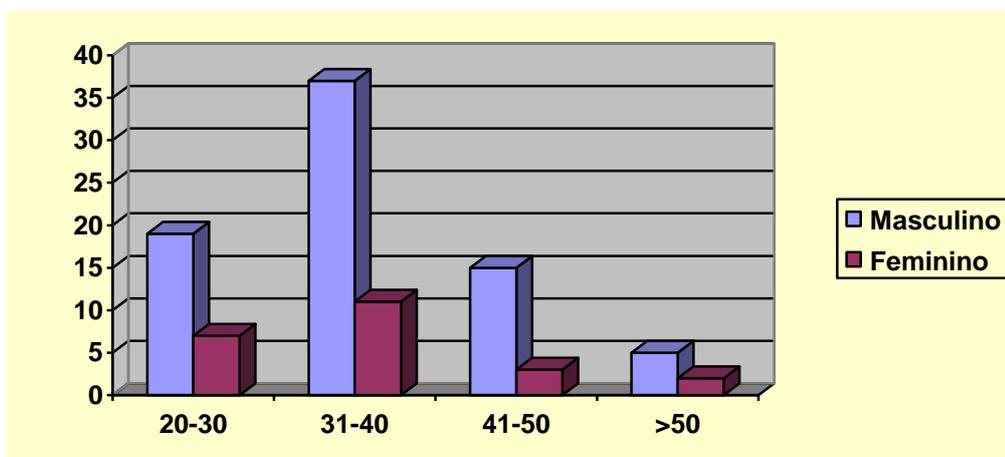
A Fase 2 trata da revisão dos prontuários e corresponde ao período compreendido entre maio de 1990 (início do protocolo) e março de 1996. Foram apurados 60 óbitos, dos quais 18 foram submetidos à necrópsia. Destas necrópsias, apenas 13 puderam ser revistas no presente estudo.

### A - Dados Epidemiológicos

#### A.1. Sexo e Faixa Etária

Dos 100 indivíduos que integraram a casuística deste estudo, 76 indivíduos eram do sexo masculino e 24 do feminino. A **média de idade** entre os indivíduos foi de 35,4 anos, a menor de 21 anos e a maior de 62, sendo o valor da mediana de 34,1 anos e o desvio padrão de 8,2 anos . Houve predomínio na faixa etária de 21 a 40 anos, totalizando 80%. A distribuição por faixa etária e sexo é apresentada no Gráfico 1.

**Gráfico 1 - Distribuição da casuística por sexo e idade.**



Fonte: SAME /HEC/FIOCRUZ/RJ

## A.2. - Raça

Com relação à raça, houve preponderância da cor branca, com 61 indivíduos, e 39 não brancos (pardos e negros).

## A.3. - Naturalidade e Procedência

Com relação à naturalidade dos pacientes envolvidos no estudo, observou-se que a maioria, 79%, nasceu na região Sudeste, dos quais 65% são do Rio de Janeiro (RJ), 17% nasceram nas regiões Norte/Nordeste, 2% na região Centro-oeste e 1 % na região Sul. Apenas um indivíduo era natural de outro país (Portugal) (**Tabela 1**). Quanto à procedência, todos os pacientes moravam no RJ, porem de naturalidade diversa.

**Tabela 1 - Distribuição dos 100 pacientes por Naturalidade**

<b>Naturalidade (Região)</b>	<b>Número</b>	<b>%</b>
<b>Norte</b>	3	3
<b>Nordeste</b>	14	14
<b>Sudeste</b>	79	79
<b>Sul</b>	1	1
<b>Centro-Oeste</b>	2	2
<b>Outros</b>	1	1
<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

Fonte: SAME / HEC / FIOCRUZ, RJ.

## A.4.- Fator e/ou Comportamento de Risco para aquisição da infecção pelo HIV.

Tendo como base o fator e/ou o comportamento de risco para a infecção pelo vírus HIV, pode ser observado que a principal forma de transmissão se deu por contato sexual. O que significou 79 % dos casos. A tabela 2, abaixo, lista a casuística apontada nesta questão.

**Tabela 2 - Distribuição e percentual da casuística segundo o fator e/ou comportamento de risco associado para aquisição da AIDS.**

<b>Comportamento de risco</b>	<b>Masculino</b>		<b>Feminino</b>		<b>Total</b>
	<b>no.</b>	<b>%</b>	<b>no.</b>	<b>%</b>	
<b>Homossexual</b>	31	40,8	0	0	31
<b>Bissexual</b>	18	23,7	0	0	18
<b>Heterossexual</b>	16	21,1	14	58,4	30
<b>Uso drogas ev(*)</b>	3	3,9	0	0	3
<b>Hemotransfusão</b>	0	0	5	20,8	5
<b>Fatores associados (**)</b>	6	7,9	5	20,8	11
<b>Ignorado</b>	2	2,6	0	0	2
<b>Total</b>	<b>76</b>	<b>100</b>	<b>24</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

Fonte: SAME / HEC / FIOCRUZ, RJ

(\*) Usuários de drogas endovenosas ilícitas

(\*\*) Fatores associados – Pacientes com mais de um fator de risco de aquisição de HIV.

Segundo o comportamento de risco entre sexo masculino e feminino, pode-se constatar que das 24 mulheres, dez tinham recebido transfusão de sangue antes de 1985. Destas, uma era parceira de indivíduo HIV positivo e usuária de drogas injetáveis; outras cinco eram parceiras de indivíduos HIV positivos. Entre os 76 indivíduos do sexo masculino, três homo/bissexuais eram também usuários de drogas e dois tinham sido hemotransfundidos antes de 1985. Um heterossexual havia recebido hemotransfusão antes de 1985.

## B.- Dados Clínicos

### B.1.- Perfil clínico da casuística em relação à infecção pelo HIV.

Dos 76 homens, 8 (10,5%) eram assintomáticos e 68 sintomáticos. Destes, 45 homens (59,3%) pertenciam ao grupo IV e 23 (30,2%) ao grupo III (10,5%). Das 24 mulheres que integraram a casuística, 6 (25%) eram assintomáticas e 18 sintomáticas, destas, 10 (41,7%) pertenciam ao grupo III e 8 (33,3%) ao grupo IV (Tabela 3).

**Tabela 3 – Distribuição dos indivíduos por sexo em relação ao critério de classificação do CDC de 1989.**

Sexo	Classificação do CDC			
	II *	III	IV	Total
	n°	n°	n°	n°
<b>Masculino</b>	<b>8</b>	<b>23</b>	<b>45</b>	<b>76</b>
<b>Feminino</b>	6	10	8	24
<b>Total</b>	14	33	53	100

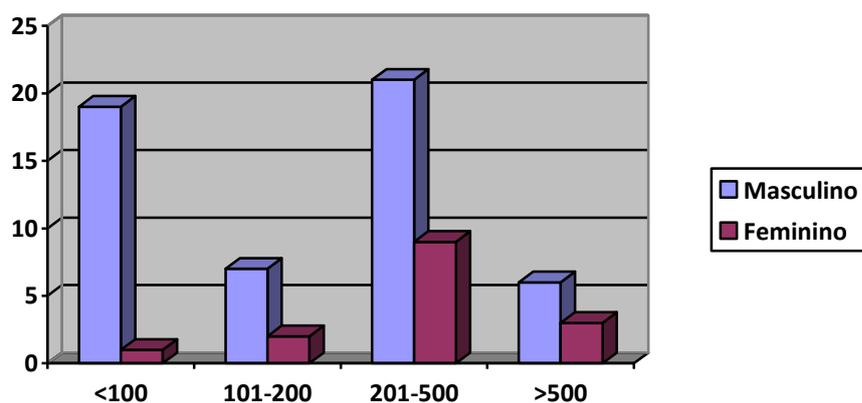
Fonte: SAME/ HEC/FIOCRUZ/RJ

\*Pertencentes ao grupo dos assintomáticos

### B.2 - Contagem dos níveis de CD<sub>4</sub>

Dos 100 indivíduos, 68 tiveram registro da contagem do nível basal de CD<sub>4</sub>; 30 destes apresentavam CD<sub>4</sub> menor que 200cél/mm<sup>3</sup>, 29 pacientes com CD<sub>4</sub> menor que 500 e maior que 200 células/mm<sup>3</sup> e em apenas 09 o CD<sub>4</sub> encontrava-se acima de 500cél/mm<sup>3</sup> (Gráfico 2).

**Gráfico 2 – Distribuição da casuística por sexo e contagem de CD<sub>4</sub>**



**Fonte: SAME/ HEC/ FIOCRUZ/ RJ**

### B.3.- Infecções oportunistas prévias e concomitantes

Dos 100 pacientes HIV positivo, 79 tiveram registro em prontuário das infecções oportunistas, 14 pacientes não tiveram infecções e outros não tinham qualquer registro. Descrevemos, na tabela 4, os números de infecções oportunistas/concomitantes por etiologia e/ou síndrome e a frequência.

**Tabela 4-Freqüência das doenças associadas que ocorreram em 79 pacientes HIV positivos da casuística.**

<b>Infecções Oportunisticas/ Concomitantes</b>	<b>Total</b>	
	<b>no.</b>	<b>%</b>
<b>Candidíase oral</b>	48	60,7
<b>Tuberculose/Micobateriose</b>	30	37,9
<b>Infecção herpética</b>	26	32,9
<b>Pneumocistose</b>	23	29,1
<b>Neurotoxoplasmose</b>	18	22,7
<b>Herpes simples</b>	17	21,5
<b>Citomegalovirose</b>	14	17,7
<b>Coccidiose</b>	14	17,7
<b>Sepse</b>	10	12,6
<b>Infecção do trato intestinal</b>	10	12,6
<b>Criptococose</b>	9	11,4
<b>DST (sífilis/ condiloma)</b>	8	10,1
<b>Sarcoma de Kaposi</b>	7	8,8
<b>Furunculose/abscesso</b>	4	5,1
<b>Estrongiloidíase</b>	4	5,1
<b>Salmonelose</b>	3	3,7
<b>Hepatite</b>	3	3,7
<b>Linfoma</b>	2	2,5
<b>Histoplasmose</b>	2	2,5
<b>Leishmaniose</b>	2	2,5
<b>Osteomielite</b>	2	2,5
<b>Molusco contagioso</b>	2	2,5
<b>Outros</b>	12	15,2

Fonte: SAME/ HEC/FIOCRUZ/RJ

### C. Estudo da frequência e principais causas dos óbitos na casuística até 1995

De maio de 1990 a dezembro de 1992, dos 100 indivíduos incluídos no protocolo, 25 (25%) evoluíram para o óbito, sendo que 2 destes indivíduos (8% de 25) tiveram criptococose disseminada como principal causa do óbito, conforme identificado na anatomia patológica.

De janeiro de 1993 a dezembro de 1995, mais 35 pacientes evoluíram para o êxito letal. Destes, 5 pacientes (n° 3, n° 21, n° 45, n° 51 e n° 78) apresentaram criptococose disseminada e, em 4 deles, a causa do óbito foi a criptocose (Quadro 2, Anexo VI).

Até dezembro de 1995, foram confirmados um total de 60 óbitos, dos quais 6 (10% de 60) tiveram como causa direta a criptococose, sendo três casos confirmados por necropsia e os outros três restantes foram confirmados por exames laboratoriais (microscopia direta com tinta nanquim, cultivo e sorologia de pesquisa de antígenos) ainda em vida.

Entre as causas mais frequentes de óbito destacamos micobacteriose atípica/tuberculose em 10 (15% de 60), septicemia em 11 (18,3% de 60), por diversos outros agentes, sendo três de natureza bacteriana confirmadas por hemoculturas, sendo duas por *Enterococcus* sp., uma por *Staphilococcus aureus* metilicina resistente (MRSA), neurotoxoplasmose em 6 (10%), criptococose em 6 (10%) e histoplasmose disseminada em dois (3,3%), citomegalovirose disseminada em 3 (5%), pneumocistose em 2 (3,3%). Outras causas foram variadas ou não definidas (Tabela 5).

**Tabela 5 - Distribuição das causas de 60 óbitos na casuística estudada até março de 1996.**

<b>Causas de óbito</b>	<b>Nº</b>	<b>Frequencia %</b>
<b>Septicemia</b>	11	18,4
<b>Micobacteriose/tuberculose</b>	9	15
<b>Neurotoxoplasmose</b>	6	10
<b>Criptococose</b>	6	10
<b>Síndrome neurológica</b>	4	6,7
<b>Citomegalovirose</b>	3	5
<b>Histoplasmose</b>	2	3,3
<b>Pneumocistose</b>	2	3,3
<b>Ignorada</b>	9	15
<b>Outras</b>	12	13,3
<b>Total</b>	60	100

Fonte: SAME/HEC/FIOCRUZ/RJ

Entre janeiro de 1996 e julho de 1997 ocorreram mais 5 óbitos. Destes, 2 foram por falência de múltiplos órgãos e os outros 3, por causa ignorada.

#### C.1. - Descrição dos casos de Criptococose no período: abril de 1990 a maio de 1999

A seguir, apresenta-se a descrição dos casos de Criptococose que ocorreram, fora do protocolo de investigação de colonização cutâneo-mucosa.

Foram apurados seis pacientes (nº 3, nº 21, nº 45, nº 51, nº 78 e nº 97) que tiveram criptococose no período compreendido entre abril de 1990 a maio de 1999.

O **paciente nº 3**, de 32 anos de idade, masculino, natural de MG, cabelereiro, era bissexual. Durante o protocolo realizado em maio de 1990 possuía dosagem de CD<sub>4</sub> com 340 cels/mm<sup>3</sup>, e os espécimes coletados não permitiram o isolamento de *C. neoformans*. Apresentou tuberculose pulmonar em outubro de 1991. Em janeiro de 1994, após 20 dias de cefaléia e febre, escotoma bilateral e fotofobia, foi diagnosticada criptococose disseminada através do isolamento do *C. neoformans* de sangue e LCR. Iniciada terapia com fluconazol, evoluiu para o óbito 24h após intituída terapia antifúngica. Não fazia uso de terapia anti-retroviral.

O **paciente nº 21**, de 50 anos de idade, masculino, natural do RJ, portuário, era heterossexual, com história de hemotransfusão antes de 1985. Em novembro de 1990 tinha níveis de CD<sub>4</sub> com 50 céls/mm<sup>3</sup>. Submetido ao protocolo em julho de 1991, não houve isolamento de *C. neoformans*. Iniciada terapia anti-retroviral com zidovudina (AZT) e didanosina (DDI) em fevereiro de 1993. Evoluiu com síndrome anêmica pelo AZT, sendo suspensa esta terapia, em janeiro de 1994, mantendo-se em monoterapia com DDI. Durante investigação de síndrome febril acompanhada de tosse seca, dispnéia, cefaléia frontal e retro-orbitária em maio de 1994, foi realizada punção líquórica isolando-se *C. neoformans* do LCR, embora o exame deste não apresentasse alterações citológicas ou bioquímicas, tendo diagnosticada criptococose disseminada. Instituída terapia com anfotericina B, foi feita dose acumulada de 1.350 mg. Foi reinternado por duas outras vezes no ano corrente, com recaída da criptococose, evoluindo para o óbito em dezembro de 1994. Estudo de necrópsia revelou criptococose disseminada e abscesso cerebral por *Nocardia* sp. (Quadro n.3 – Anexo VII).

O **paciente nº 45**, masculino, de 29 anos de idade, professor, homossexual, era natural do RJ. Em novembro de 1990 tinha dosagem de CD<sub>4</sub> com 62 cél/mm<sup>3</sup>. Iniciou terapia antirretroviral com AZT em janeiro de 1992. Realizado protocolo de investigação neste

mesmo mês, não sendo isolado *C. neoformans* de quaisquer espécimes cutâneo-mucosos coletados. Em setembro foi internado com síndrome febril e neurológica (cefaléia occipital) sem sinais de comprometimento de pares cranianos, realizada punção lombar a qual revelou meningite a líquido claro (citometria com 200 cél/mm<sup>3</sup> com 100% de células mononucleares sem relato de bioquímica em prontuário), o exame microscópico direto em tinta nanquim foi positivo para *C. neoformans*. Iniciada anfotericina B, evoluiu com flebite sendo trocado esquema anti-fúngico por fluconazol, não há relatos de dose acumulada de anfotericina B em prontuário. Teve alta em uso de fluconazol profilático. Evoluiu o para o êxito letal em setembro de 1994 com recaída da criptococose.

O **paciente nº 51**, masculino, de 40 anos de idade, gari, heterossexual, era natural do RJ. Submetido ao protocolo de investigação em março de 1992, sem isolamento de *C. neoformans* à ocasião, tinha candidíase oral e tuberculose ganglionar. Iniciado AZT em fevereiro de 1993 e profilaxia para pneumonia por *Pneumocistis carinii*. Em março de 1994 foi internado com síndrome febril e diarreia, apresentava também pansinusite. Exame radiológico dos seios da face revelou velamento das células etmoidais, com espessamento de mucosa em seios maxilares direito e esquerdo, sendo tratado como sinusite bacteriana com cefuroxime e clindamicina. Posteriormente foi isolado de urina e escarro *C. neoformans*. Antes que fosse instituída terapia antifúngica evoluiu com sinal de irritação meníngea, fotofobia, queda do estado geral e óbito. O estudo de necrópsia revelou criptococose disseminada com doença neurológica (Quadro n.3 – Anexo VII).

O **paciente nº 78**, masculino, bissexual, casado, 30 anos de idade, era natural do RJ, pedreiro. Em acompanhamento no ambulatorial pelo HEC desde março de 1992, quando foi submetido ao protocolo de investigação de colonização cutâneo-mucosa, não sendo isolado o fungo. Em 1992 apresentou tuberculose disseminada, em tratamento irregular, abandonou o hospital até 1995, quando foi internado com caquexia, síndrome febril sem sinais de irritação meníngea ou sinal neurológico focal. Evoluiu com insuficiência respiratória aguda e com menos de 24h de internação foi a óbito. Resultado de hemocultura foi positivo para *C. neoformans* no dia seguinte ao óbito. Tratava-se, assim, de diagnóstico tardio de criptococose disseminada.

A **paciente nº 97**, feminina, de 43 anos de idade, parceira de paciente HIV positivo usuário de droga, foi submetida ao protocolo de investigação em 1992, sendo negativa a investigação para *C. neoformans*. Em agosto de 1996 foi repetido o protocolo, isolando-se *C.*

*neoformans* var. *gattii* sorotipo B (Anexo IX, Figuras 2A e 2B; Anexo X, Figuras 3A e 3B) do escarro.

Em maio 1999 foi submetida a investigação de síndrome febril, quando foi diagnosticada criptococose disseminada por apresentar teste do látex positivo no sangue e hemocultura positiva para *C. neoformans* var. *neoformans*. Esta paciente será descrita em maiores detalhes no tópico seguinte (Fase 3).

### 5.3 FASE 3

#### **Colonização cutâneo-mucosa e/ou infecção por *Cryptococcus neoformans* em 28, dos 30 indivíduos remanescentes da casuística inicial (n=100).**

No período de abril de 1996 até julho de 1997, dos 100 indivíduos HIV positivo que constituíram a casuística inicial, 30 sobreviveram, 60 faleceram e dez foram considerados abandono de acompanhamento ambulatorial por perda total de contacto com os mesmos e seus familiares. Os 30 pacientes remanescentes foram contactados para repetir o rastreamento cutâneo-mucoso. Destes, dois não compareceram para reintegrar-se ao grupo de estudo. Dos 28 pacientes que integraram esta casuística, 19 eram do sexo masculino com idade variando entre 30 anos a 62 anos, a média de 40 anos, a mediana 37 anos e o desvio padrão 9,0; o CD4 entre os homens variou de 1 cél/mm<sup>3</sup> a 846 cél/mm<sup>3</sup>, com média de 234,0 cél/mm<sup>3</sup>, mediana 200,0 cél/mm<sup>3</sup> e desvio padrão 230,5 cél/mm<sup>3</sup>. As nove pacientes do sexo feminino, com a idade variando de 25 a 55 anos, a média foi de 39,8 anos, a mediana 40 anos e desvio padrão 9,1. A dosagem dos níveis basais de CD4 destas mulheres variou de 15 cél/mm<sup>3</sup> a 424 cél/mm<sup>3</sup>, média 238 cél/mm<sup>3</sup>, mediana 230 cél/mm<sup>3</sup> e desvio padrão 141,3 cél/mm<sup>3</sup>. Os níveis de CD4 entre homens e mulheres não mostraram diferença estatisticamente significativa.

#### **A - Descrição de caso: Colonização transitória**

A seguir são descritos os casos de **colonização transitória por *C. neoformans* var. *gattii* e Criptococose disseminada por *C. neoformans* var. *neoformans*.**

Em apenas um caso, **paciente nº 97**, houve isolamento de *C. neoformans* na fase 3, caracterizando **colonização transitória**. Tratava-se de uma mulher com história de sinusopatia crônica e seqüela de tuberculose pulmonar, tabagista e no momento do exame

clínico encontrava-se com sintomatologia de síndrome respiratória alta há cerca de um mês, acompanhada de tosse produtiva com expectoração amarelada.

Esta paciente, em outubro de 1991 foi submetida ao protocolo de rastreamento cutâneo-mucoso para detecção de *C. neoformans*, cujo resultado foi negativo. Nesta ocasião apresentava CD<sub>4</sub> de 225 cels/mm<sup>3</sup> e estava assintomática.

Em agosto de 1996, quando tinha 39 anos de idade, foi repetido o protocolo (fase 3), isolando-se *C. neoformans* var. *gattii* sorotipo B (Anexo IX, Figuras 2A e 2B; Anexo X, Figuras 3A e 3B) do escarro. Clinicamente a paciente referia um mês de persistente estado gripal, astenia, acompanhado de tosse produtiva com expectoração amarelada, perda ponderal de dois quilos e ausência de febre. O exame físico não evidenciou anormalidades. Exames complementares revelaram anemia, leucopenia e contagem de CD<sub>4</sub> 234 cels/mm<sup>3</sup>. O exame radiológico do tórax evidenciou traves fibrosas em ápice de pulmão direito, seqüela de tuberculose pulmonar e exame radiológico dos seios da face mostrou espessamento laminar da mucosa em seio maxilar direito e concêntrico em maxilar esquerdo.

Devido ao isolamento de *C. neoformans* var. *gattii* de escarro, foram realizadas mais três coletas deste espécime, além de urina, sangue, material de lavagem dos seios da face e LCR, não se repetindo o isolamento fúngico e ou bacteriano em quaisquer destas amostras subseqüentes. A antígenemia também foi negativa. A punção dos seios da face também não revelou crescimento fungico. Como a paciente referiu atraso no ciclo menstrual, foi realizado teste imunológico de gravidez (TIG), sendo confirmado gravidez. Face à persistência da sintomatologia respiratória alta optou-se pelo início de tratamento com ampicilina e, em virtude da numerosa contagem de colônias de *C. neoformans* no escarro da primeira amostra, optou-se pelo início do tratamento com anfotericina B, o que foi recusado pela paciente.

Foi observada a regressão do quadro respiratório apenas com a antibioticoterapia e apesar da recusa ao tratamento com o anti-fúngico proposto, o fungo não foi mais isolado de mucosa respiratória nem de qualquer outro sítio, repetido consecutivamente por mais três vezes em 11 meses de acompanhamento; o exame do teste de látex para evidenciação de antígeno criptocócico em sangue e LCR resultou negativo, caracterizando-se então o caso como sendo caso de **colonização transitória por *C. neoformans* var. *gattii***. A gravidez, gemelar, transcorreu sem problemas. A paciente permaneceu assintomática, com CD<sub>4</sub> de 306 cels/mm<sup>3</sup> até maio de 1999, quando, em vigência de uso irregular de medicação anti-retroviral, foi internada com sintomas respiratórios altos (sinusite) e síndrome febril, sendo solicitados exames complementares, através dos quais obteve-se o isolamento de *C.*

*neoformans* var. *neoformans* de sangue, além da sorologia do teste do látex também estar positiva. O escarro solicitado não evidenciou presença do fungo e os níveis de CD<sub>4</sub> mantinham-se acima de 200 cels/mm<sup>3</sup> (212 células por mm<sup>3</sup>). Confirmado o diagnóstico laboratorial de **criptococose disseminada** por *C. neoformans* var., *neoformans*, foi iniciada terapia anti-fúngica.

## **B - Frequência de isolamento de *C. neoformans* por espécime clínico**

Quanto à frequência de isolamento do *C. neoformans* por espécime clínico obtivemos seis isolamentos de urina, cinco de escarro, cinco de hemoculturas, três de LCR e dois de secreção nasal. De seis pacientes obteve-se isolamento de mais de um espécime clínico; destes, 5 apresentavam doença criptocócica disseminada, em um destes pacientes houve isolamento de *C. neoformans* de mucosa nasal, brônquica, sangue e urina (Quadros 1 e 2 (Anexos V e VI).

### 5.4 - FASE 4

A fase 4 trata do acompanhamento dos pacientes após a consecução dos estudos realizados nas fases anteriores e culminam no processo de discussão.

## **6 - DISCUSSÃO**

O perfil epidemiológico da casuística reflete aquele observado em casuísticas similares mundiais, considerando-se o período em que foi constituída. A principal forma de transmissão do HIV foi por contato sexual, sendo expressiva a predominância do homossexualismo e bissexualismo como fatores de risco. Observamos o predomínio do sexo masculino sobre o feminino numa razão de 3:1, o que está de acordo com a época do início do protocolo em 1990, atualmente a proporção de mulheres infectadas pelo HIV é maior. Quanto à naturalidade e procedência a grande maioria dos indivíduos da nossa casuística é da região sudeste, basicamente do Rio de Janeiro, aspecto esperado e decorrente da área de cobertura de serviço de referência para AIDS do Hospital Evandro Chagas.

Quanto ao perfil clínico a maioria dos indivíduos já apresentavam AIDS (79%), com baixos níveis de CD<sub>4</sub>, o que relaciona-se com o considerável número de óbitos ocorridos em 5 anos, numa época em que ainda não havia uma terapia anti-retroviral ou apenas iniciava-se

a monoterapia com AZT. Este perfil da casuística mostra que o estudo de colonização pelo *C. neoformans* cobriu principalmente estágios de imunodepressão acentuada e também a transição para estes estágios.

Com relação a outras infecções oportunistas chama a atenção a expressiva mortalidade por sepsis bacteriana, tuberculose e micobacteriose atípica, seguida da pneumocistose e neurotoxoplasmose, enquanto que a morbidade foi relacionada principalmente à candidíase oral e infecção herpética, entre outros. A histoplasmose esteve relacionada à mortalidade, ocorrendo em 3,3% de nossa casuística. A criptococose, com uma frequência de 10%, foi a terceira maior causa de morte, como observado em outras séries, com exceção da África, onde observa-se até 20 a 30% de criptococose associada à AIDS (Van de Perre et al., 1984; Swinne et al., 1991).

Observamos que no grupo estudado, inicialmente com 100 indivíduos, seis destes apresentaram isolamento de *C. neoformans* var. *neoformans*, refletindo diferentes tipos de relações parasita - hospedeiro. Em um deles (paciente nº 20) ocorreu colonização de mucosa respiratória (escarro e secreção nasal) de forma transitória, evidenciada pela negatização de coletas subsequentes, correlacionando-se com estado imunitário deste paciente que, embora infectado pelo vírus HIV, apresentava ainda estado imunitário pelo menos parcialmente preservado, a julgar pela avaliação do CD4 periférico. Esta breve colonização não parece ter tido repercussão quanto à evolução clínica e risco de adoecer com criptococose, uma vez que este paciente veio a falecer 4 anos mais tarde por outra causa e em nenhum outro momento o fungo foi reisolado. Levando em conta a significativa prevalência da variedade *neoformans* em poeira domiciliar, bem como em outros materiais orgânicos, em torno de 13 a 15% no Rio de Janeiro (Passoni 1999; Lazera, 1993), podemos supor que indivíduos residentes na cidade do Rio de Janeiro exponham-se cotidianamente a esta variedade, eventualmente apresentem colonização transitória, como evento menor de curta duração que só teria um potencial de risco de infecção em indivíduos com evidente imunodepressão. E mesmo no caso em questão, o paciente aparentemente conseguiu eliminar ou reduzir significativamente os elementos fúngicos na mucosa respiratória, o que reforça o caráter essencialmente oportunístico da variedade *neoformans* e a importância da integridade imunológica do hospedeiro.

A segunda situação de isolamento da variedade *neoformans* de mucosa respiratória (escarro) ocorreu em paciente (nº 57) já com evidente déficit da barreira mecânica e imunológica da mucosa oro-nasal e brônquica, embora com CD4 acima de 200 e estado imunológico sistêmico parcialmente preservado. Apresentava como doença de base bem

anterior ao surgimento da AIDS uma forma disseminada crônica de paracoccidiodomicose, que por si só, além do dano à mucosa respiratória, tem papel potencial de imunodepressão celular. Recente relato sugere que a paracoccidiodomicose predisponha à infecção criptocócica (Bernard et. al. 1996). Havia, portanto, duas condições predisponentes à colonização seguida de invasão e disseminação por *C. neoformans* no momento do isolamento do fungo do escarro, embora não houvesse qualquer indício clínico de infecção disseminada. Nesta situação de fragilidade do hospedeiro frente a um agente já instalado em seu organismo, a distinção de cada uma destas fases pode ser extremamente difícil por ser limítrofe e porque a passagem do estado de colonização para invasão pode ser súbita e clinicamente imperceptível. Assim, por experiência pessoal e baseada em dados da literatura, estes casos específicos, mesmo que assintomáticos, devem ser tratados com antifúngico, sendo interpretados como estágio inicial de infecção criptocócica em AIDS. Este paciente veio a falecer de outra causa, um ano depois, sem evidência do fungo à necrópsia.

No terceiro caso (paciente 77) de colonização de mucosa respiratória (escarro), já havia imunodepressão celular significativa relacionada ao AIDS e também duas outras doenças – leishmaniose tegumentar americana e hanseníase – ambas também relacionadas à deficiência de imunidade celular. A gravidade da imunodepressão neste caso reflete-se na multiplicidade de infecções oportunistas associadas, incluindo sarcoma de Kaposi. A análise deste caso revela situação semelhante ao anterior, não sendo possível distinguir colonização de infecção progressiva.

Ainda como reflexão, devemos considerar que foi obtido isolamento de *C. neoformans* de mucosa respiratória, com provável dano funcional, nos dois últimos casos analisados (pacientes 57 e 77). Estudos anteriores evidenciam colonização por *C. neoformans* em indivíduos com DPOC, onde a barreira mucosa respiratória está comprometida (Randhawa & Paliwal, 1979). Com base em nossos achados e de outros relatos podemos especular que dano de mucosa respiratória facilitaria a sua colonização (Bernard et. al. 1996).

No quarto caso (paciente nº 14) o encontro do fungo no escarro e na secreção nasal (Figura 1A) pelo protocolo surpreendeu uma forma de criptococose disseminada (isolamento de *C. neoformans* de urina, secreção nasal e LCR- Figura 1B) que foi então tratada supressivamente com anfotericina B. O óbito ocorreu um ano após, relacionado clinicamente a outra causa, mas não foi realizada necrópsia. Tratava-se de um caso de forma grave de criptococose disseminada em paciente que não reverteu seus baixos níveis de CD<sub>4</sub>, mesmo em uso de antirretroviral, que naquela época era basicamente monoterápico.

O quinto caso (paciente nº 15) correspondeu a uma forma de criptococose disseminada identificada através da rotina do protocolo. Diferente dos quatro anteriores, não apresentou *C. neoformans* em amostras do trato respiratório, inclusive no nasal, porém apresentou resultado positivo em urina. Em seguida, diante do resultado positivo na urina, outros espécimes foram investigados, obtendo-se o isolamento de *C. neoformans* de sangue. Os dados clínicos referentes a infecções oportunistas apontam para comprometimento do trato gastro intestinal, particularmente sua mucosa, pois este paciente também apresentava strongiloidíase e salmonelose persistente. No entanto, poucos meses após, sob terapêutica antifúngica, evoluiu para óbito e a necrópsia revelou formas fúngicas suspeitas apenas no tecido pulmonar. Neste caso pode-se especular sobre a patogenia da micose, relacionada a foco endógeno pulmonar, uma vez que não houve isolamento de mucosa respiratória alta, contudo não há como descartar também, uma outra possível via de infecção, o trato gastro intestinal, como fonte exógena. Embora não haja evidências de comprometimento do trato gastrointestinal por *C. neoformans* em estudo de necrópsia, é possível especular esta outra via de infecção. Estudo em animal imunodeficiente a administração do *C. neoformans* encapsulado por via oral bem como instilação nasal mostrou a possibilidade de disseminação a partir dessas duas vias (Salkowski *et. al.*; 1987, Anderson & Sagha, 1988).

Em contrapartida, nos casos anteriores é possível especular-se quanto à infecção exógena precedida de colonização do trato respiratório alto.

Os dois mecanismos propostos, endógeno e exógeno, podem ocorrer. Porém, estudos epidemiológicos, mesmo com marcadores moleculares, não permitem distinguir tais situações no momento.

O sexto caso (paciente nº 74), de isolamento de *C. neoformans* de urina, apresenta um perfil bastante semelhante ao caso anterior, com forma disseminada de criptococose e não isolamento do agente de mucosa respiratória. Todos os outros espécimes investigados, inclusive lavado bronco-alveolar, resultaram negativos. Foi interpretado como criptococose disseminada pelo achado de *C. neoformans* em urina e pela baixa imunidade, razão pela qual recebeu terapia antifúngica supressiva. Embora não apresentasse meningoencefalite por *C. neoformans*, cerca de um mês depois evoluiu para óbito, com observação do fungo na necrópsia em próstata, medula óssea, fígado, baço e linfonodos, não sendo encontrado em cortes de sistema nervoso central. A causa diretamente relacionada à morte foi a pneumocistose, mas a presença do fungo nos diversos órgãos indica persistência da infecção

fúngica. Infelizmente não foi feita a dosagem CD<sub>4</sub>, cujos níveis possivelmente estariam baixos.

Em resumo, os aspectos básicos da relação *C. neoformans* com hospedeiro infectado por HIV são expressos pelas situações acima descritas, como fases de um processo dinâmico iniciado por **colonização transitória**, **colonização seguida de infecção progressiva** e **doença disseminada**. A progressão ou não de cada uma destas fases depende da complexa interação parasito-hospedeiro. A imunidade celular, avaliada pela contagem de CD<sub>4</sub>, parece exercer papel fundamental na contenção da disseminação da criptococose nos pacientes estudados. Os pacientes colonizados por *C. neoformans* a contagem de CD<sub>4</sub> foi maior que 200 céls/mm<sup>3</sup> e os pacientes que tiveram infecção criptocócica disseminada a média da contagem de CD<sub>4</sub> foi menor que 100 céls/mm<sup>3</sup> (excetuando-se a paciente nº 97, a qual estava em uso de antirretroviral), estes dados confirmam dados de literatura que relacionam a criptococose disseminada com contagem de CD<sub>4</sub> abaixo de 100 céls/mm<sup>3</sup> (Crowe *et. al.* 1991).

Na fase de interrupção do protocolo, de 1993 a 1995, mais 5 casos de criptococose foram apurados neste mesmo grupo, que no início deste período contava com 75 sobreviventes. Estes casos da micose foram identificados por investigação clínica do médico que os acompanhava. Correspondem a formas disseminadas com acometimento do SNC, em sua maioria com níveis de CD<sub>4</sub> abaixo de 50 céls/mm<sup>3</sup> e foram todos por variedade *neoformans* sorotipo A. Portanto, o diagnóstico foi realizado em fase grave e avançada da micose, sendo que nos dois casos submetidos a necrópsia, havia evidência de doença ativa e disseminada.

Na fase três, duas situações distintas foram detectadas numa única paciente (nº 97). A primeira, de **colonização transitória** por variedade *gattii* sorotipo B. Trata-se de um achado inesperado, ainda não registrado na literatura em seres humanos. O único relato paralelo e próximo corresponde à descrição de colonização de mucosa respiratória em coala, animal originário da Austrália (Connolly *et al.*, 1999). Esta paciente é natural do Rio de Janeiro, mas tem história de viagem, um ano antes, para o estado da Paraíba, nordeste brasileiro. Sabe-se que esta região, particularmente o Meio-Norte, é área de ocorrência de casos humanos de criptococose causada por *C. neoformans* var. *gattii*, e não se pode excluir a possibilidade de que a paciente tenha entrado em contato com este agente nesta região (Cavalcanti, 1997). Na suposição de que o contágio ocorreu um ano antes, na sua visita ao nordeste, poder-se-ia especular, ainda, a ocorrência de uma infecção regressiva ou então, uma colonização persistente. Contudo, houve um período relativamente longo até a detecção da colonização,

que logo após deixa de ser observada, uma vez que uma série de coletas seriadas subsequentes foram negativas. O fungo não parecia estar colonizando seios paranasais, cujo material coletado foi negativo. Deve-se considerar também que pode ocorrer exposição ocasional à variedade *gattii* no Rio de Janeiro, uma vez que esta já foi isolada de fezes de morcego em sótão no bairro do Humaitá (Lazera, 1993). Infelizmente, a paciente não permitiu visita à sua residência para possível investigação ambiental local. Consideramos o achado como colonização porque não foi evidenciada a presença do fungo em qualquer outro sítio, inclusive através de método sensível, como a detecção de antígeno polissacáride no soro e no líquido da paciente. Mas, deve-se notar que a densidade do fungo na secreção brônquica foi muito elevada (figuras 2A, Anexo IX e figura 3A, anexo X), com isolamento de pelo menos 50 colônias de pequeno volume de escarro, o que de antemão exclui contaminação externa.

Ainda em relação ao caso da paciente 97, é possível que o estágio de colonização não tenha evoluído para infecção progressiva devido a imunidade celular parcialmente preservada, com CD<sub>4</sub> acima de 200 céls/mm<sup>3</sup> (Crowe *et. al.* 1991). Outro fator que poderia afetar a imunidade de maneira negativa seria a gravidez em curso, concomitante ao isolamento do fungo. A gravidez humana tem sido associada ao aumento da susceptibilidade a numerosas doenças infecciosas e ao agravamento do quadro clínico (Lea & Calder, 1997). Talvez essa relação não possa ser feita no caso específico de colonização de mucosas pelo *C. neoformans*, uma vez que outros fatores poderiam ter um papel mais importante tal como a lesão prévia da mucosa por outro agente infeccioso, neste caso a infecção prévia por *Mycobacterium tuberculosis* poderíamos correlacionar com outros dados que relacionam a outra micose sistêmica que afeta predominantemente mucosa, a paracoccidiodomicose, que parece predispor à criptococose (Bernard *et. al.* 1996). Outro aspecto importante a considerar é que mesmo em áreas endêmicas, com clara exposição à variedade *gattii*, os casos de criptococose em AIDS por esta variedade são raros (Saag *et. al.*, 1995). A situação observada no caso desta paciente pode refletir processo de colonização transitória sem evolução para doença criptocócica em paciente com AIDS. No entanto, os mecanismos implicados neste caso não estão claros. O tratamento para paciente foi indicado com anfotericina B, pelo risco potencial de disseminação do fungo em virtude dos fatores de morbidade que poderiam predispor à disseminação fúngica. A medicação indicada foi a anfotericina B por ser de escolha para pacientes grávidas, já que há relatos de teratogenia pelo fluconazol (Pursley *et.al.* 1996).

Três anos depois, apesar de manter CD<sub>4</sub> nos mesmos níveis e em uso irregular de terapia antirretroviral tripla, esta paciente n° 97 foi encontrada com criptococose por *C.*

*neoformans* var. *neoformans*. Portanto, a doença não poderia ter evoluído a partir do estágio inicial de colonização causada por outra variedade do fungo. A possibilidade de mudança genética da variedade *gattii* para *neoformans* já foi aventada, mas rejeitada por especialistas no assunto (Kwon-Chung & Bennett, 1984). Outra possibilidade é a de colonização mista por ambas as variedades, mas só a variedade *gattii* foi identificada no procedimento. Seria necessário o estudo individual de colônias do fungo encontradas no mesmo espécime clínico positivo. É possível também que os dois eventos na mesma paciente não estejam relacionados entre si.

Como visão conjunta de nossos achados relacionados à criptococose e seu agente, dentre os 100 pacientes originais, em 11 foi isolado *C. neoformans* var. *neoformans* e, no 12º paciente *C. neoformans* var. *neoformans* e *C. neoformans* var. *gattii* foram encontrados em momentos diferentes, correspondendo a situações diferenciadas da relação parasita-hospedeiro. Portanto, tivemos **2% de colonização transitória** por *C. neoformans*, sendo um caso por var. *neoformans* e outro por var. *gattii*; **2% de colonização fase inicial de infecção** e **9% de criptococose disseminada** por *C. neoformans* var. *neoformans*. Observamos que no período inicial do estudo de colonização com 100 indivíduos, 6% apresentaram isolamento do fungo. De 1993 a 1995 ocorreram mais cinco casos de criptococose nos 75 sobreviventes (6,6%), todas eram formas disseminadas, reveladas pela revisão dos prontuários. Nesta fase intermediária, entre 1993 e 1995, em que o protocolo de colonização não foi aplicado, é possível que outros casos de colonização não tenham sido identificados, subestimando-se este evento no período.

Na terceira fase, em que voltou-se a aplicar o protocolo de rastreamento do fungo em 28 dos 30 pacientes remanescentes da casuística original, detectou-se um evento de colonização transitória (3,5%) e outro de criptococose disseminada (3,5%), num mesmo paciente, o que em termos de isolamento do fungo daria 7%. Teria a terapia antirretroviral influenciado a expressão da micose neste grupo de 28 pacientes, que em sua maioria fez uso de antirretroviral em esquema isolado ou combinado? Acreditamos que, a longo prazo, como já observado pela redução da mortalidade global em AIDS, haja redução da incidência de criptococose disseminada nestes indivíduos. No entanto, o mesmo não se pode afirmar com relação à colonização e talvez aos estágios iniciais de infecção por *C. neoformans*, que apresentariam um potencial de regressão em indivíduos com a imunidade parcialmente restaurada. O caso da paciente nº 97 reflete, a nosso ver, esta possibilidade.

O grupo analisado não evidenciou qualquer situação de colonização cutânea por *C. neoformans*, sequer algum achado causado por contaminação externa. Diferindo por completo dos achados de McGinnis *et. al.* (1975) que encontrou 18% de colonização cutânea, só que em indivíduos hígidos. Portanto, a colonização cutânea por este fungo não parece relevante neste grupo estudado.

A urina e o escarro foram os espécimes clínicos a partir dos quais obtivemos a maior frequência no isolamento de *C. neoformans*. O isolamento do fungo da urina esteve principalmente relacionado a doença disseminada, enquanto do escarro esteve relacionado a colonização de mucosa respiratória. Dos 13 casos relatados em seis dos pacientes com isolamento do fungo da urina, todos tinham doença disseminada e síndrome febril, enquanto que em cinco pacientes com isolamento a partir do escarro, dois apresentavam colonização transitória e outras duas colonizações / fase inicial de infecção, apenas um apresentava doença disseminada. Estudo retrospectivo de 10 anos de criptococose associada a AIDS realizado no Hospital Evandro Chagas no período de dezembro de 1987 a dezembro de 1997 revelou que espécime clínico que obteve maior rendimento para o diagnóstico de criptococose disseminada foi também a urina, com 33 (65%) dos 61 pacientes (Galhardo, 1998). Em 1989, Staib já havia relacionado a detecção do *C. neoformans* em urina e a importância deste material clínico no diagnóstico e patogênese da criptococose reforça o autor a importância do diagnóstico precoce desta micose para o sucesso da terapia. Logo, a busca regular do fungo em amostras de secreções do trato respiratório e na urina deve ser introduzida na rotina de acompanhamento destes pacientes, independente de manifestações clínicas, principalmente aqueles que tenham outros fatores de lesão de mucosa associados como tuberculose, paracoccidiodomicose, leishmaniose (Bernard *et. al.*, 1996).

## 7 – CONCLUSÃO

A conclusão da pesquisa apresenta-se em tópicos. Esta exposição permite observar resultados da pesquisa acerca da colonização cutâneo-mucosa e / ou infecção por *Cryptococcus neoformans* em indivíduos infectados pelo HIV, com e sem síndrome de imunodeficiência adquirida, por meio de estudo prospectivo e evolutivo de corte interrompida.

1. A **colonização transitória** por *C. neoformans* ocorreu em 2% dos pacientes analisados, uma por *C. neoformans* var. *neoformans*, sorotipo A e outra por *C. neoformans* var. *gattii* sorotipo B, ambos com imunidade parcialmente preservada.
2. A **colonização fase inicial de infecção** por *C. neoformans* ocorreu em 2% da mesma casuística, causada por *C. neoformans* var. *neoformans* sorotipo A, em indivíduos imunodeprimidos.
3. A **criptococose disseminada** foi identificada em 9% da casuística, todos por *C. neoformans* var. *neoformans*, (sorotipo A) em imunodeprimidos.
4. Não foi detectada colonização cutânea por *C. neoformans* na casuística.
5. O estado de **colonização transitória** não se correlacionou com risco tardio de adoecer de criptococose, no grupo analisado.
6. A frequência de isolamento de *C. neoformans* no grupo estudado foi de 13%, correspondendo a 12% de indivíduos.
7. O espécime clínico onde *C. neoformans* foi isolado com maior frequência foi o escarro, não tendo havido isolamento de mucosa orofaríngea.
8. Ambas as variedades podem colonizar a mucosa traqueobrônquica.

A partir dos resultados obtidos, com base nos dados clínicos dos pacientes que comporam a casuística, pode-se alavancar outros estudos com relação a colonização de *criptococcus neofarmans* em indivíduos com deficiência imunológica, abrindo uma nova perspectiva para avaliação de risco e evolução clínica da criptococose.

## 8-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham M, Mathews V, Ganesh A *et. al.*, Case report Infection caused by *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* serotype B in AIDS patient in India. *J Med Vet Mycol* 5: 283-284, 1997.
- Anderson A & Sagha H M . Persistence of infection in mice inoculated intranasally with *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathol.* 104: 163 –169. 1988
- Ajello L. The Medical mycology iceberg. International Symposium om Mycoses PAHO Sc Publ ed. 205:3-12. 1970
- Arachevala A I, Robles A M, Negroni R *et. al.*, Valor de los metodos directos e indirectos de diagnostico en las micosis sistemicas asociadas al SIDA. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 35: 163-169. 1993
- Baker R D;. The primary pulmonary lymph node complex of cryptococcosis. *Am J Clin Pathol* 65: 83-92. 1976
- Barraviera B, Machado J M, Meira D A. Criptococose. *ARS CVRANDI* 30: 96-106. 1985
- Badillet, G. *et al.*, Les levedures du genre *Cryptococcus* en dermatologie, *Bull. Soc. Fr. Mycol. Med, Paris*, v. 15 p. 65-70, 1986.
- Bernard G, Gryscek R C B, Duarte A J S & Shikanai-Yasuda M A. Cryptococossis as na opportunistic infecton in immunodeficiency secondary to Paracoccidioidomycosis. *Mycopathol*, 133: 65-69. 1996
- Bennett J E & Hasernnclever H F. *Cryptococcus neoformans* polysaccharide : Studies of serologic properties and role in infection . *J Immunol* 94 : 916-920. 1965
- Beyt B E & Waltman S R,. Cryptococccal endoththalmitis after corneal transplantation. *N Eng J Med*, 298: 825-826. 1978

- Bezerra C C F, Wanke B, Cavalcanti M A S *et. al.*,. *Cryptococcus neoformans* var *neoformans* e var *gattii* isolados de *Eucalyptus camaldulensis* no Brasil. In: II Congresso Brasileiro de Micologia. Rio de Janeiro: 183 (Abstract G45). 1998
- Bhattacharjee A K, Bennett J E & Glaudemans P J,. Capsular polysaccharides of *Cryptococcus neoformans*. Rev Infect Dis 6: 619-624. 1984
- Buchanan K L & Murphy J W,. What makes *Cryptococcus neoformans*? Emerg Infect Dis 4: 1-17. 1998
- Bunting L A, Neilson J B & Bulmer G S,. *Cryptococcus neoformans* gastronomic delight of a soil ameba. Sabourandia 17: 225-232. 1979
- Butler W T, Alling D W, Spickard A & Utz J,. Diagnostic and prognostic value of clinical and laboratory findings in cryptococcal meningitis. N Engl J of Med, 270: 59-67. 1964
- Blumer G S, . Twenty-five years with *Cryptococcus neoformans*. Mycopathol 119: 111-122, 1990
- Brustein R, Almeida T M A, Daher G A. *et. al.*,. Meningite criptocócica em gato doméstico – Relato de caso. In: II Congresso Brasileiro de Micologia, Rio de Janeiro: 189 (Abstract H05). 1998
- Callejas A, Ordonez N, Rodriguez M C & Castaneda E,. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var *gattii*, serotype C, from the environment in Colombia, Med Mycol 36 : 341-344. 1998
- Calvo M B. Correspondence – Variedades y serotipos de *Cryptococcus neoformans* em pacientes com SIDA y neurocriptococosis en São Paulo, Brasil. Rev Inst Med Trop, São Paulo 32: 480-482. 1990
- Cavalcanti M A S. Criptococose sistêmica endêmica pela variedade *gattii* no Meio Norte do Brasil, Teresina – Piauí , FIOCRUZ, Tese de doutorado. 1997.

- Casadevall A. *Cryptococcus neoformans*: Ecology and Pathogenesis. Cliniguide to Fungal Infection 4 : 1-5. 1993.
- Castañón-Olivares L R, Lopez – Martinez R, Barriga-Angulo G & Ríos-Rosas C., *Cryptococcus neoformans* var *gattii* in na AIDS patient: first observation in Mexico. J Med Vet Mycol 35 : 57-59. 1997
- Cameron M L, Bartlett J A, Gallis H A & Waskin, H A, Manifestations of pulmonary Cryptococis in patients with acquired immuno deficiency syndrome. Rev Inf Dis 12: 64-67. 1991
- Campbell C K, Payne A L, Teall A J *et. al.*. Cryptococcal latex antigen test positive in patient with *Trichosporon beigelii* infection. Lancet ii: 43-44. 1985
- Center for Control and Prevention. Revision of the CDC surveillace case definition for acquired immunodeficiency syndrome. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 1987. 36 (Suppl): S1-S15.
- Center for Control and Prevention. Revised classifications system for hiv infection and expanded surveillace case definition for AIDS among adults. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 1992. 41: RR-17. 1993
- Clark R A, Greer D, Athiknson W, Valainis G T & Hyslop N. Spectrun of *Cryptococcus neoformans* infection in 68 patients infected with human immunodeficiency virus. Rev Inf Dis 12: 768-777. 1990.
- Chang Y C, Penoyer L A & Kwon-Chung K J. The second capsule gene of *Cryptococcus neoformans* CAP64, Is essential for virulence. Infect Immun 64: 1977-1983. 1996.
- Chuck, S.L. & Sande, M.A. .Infection with *Cryptococcus neoformans* in the acquired immunodeficiency syndrome. N Engl J Méd .21: 794-799. 1989

- Chakrabarti A., Jatana M., Kumar P *et al.*, . Isolation of *Cryptococcus neoformans* var *gattii* from *Eucalyptus camaldulensis* in India. *J Clin. Microbiol* 35: .3340-3342. 1997
- Charnock S J, Toltzis P. & Wilson C. . Crossing-reactivity between *Stomatococcus mucilaginosus* and latex agglutination for cryptococcal antigen. *Lancet* 342: 1119-20. 1993.
- Civila , E & Conti-Diaz , I .A aislamiento de *Cryptococcus neoformans* de excretos secas de palomas em la ciudad de Montevideo. *Rev. Uruguay Pat. Clin y Microbiol.* 14:. 41-48. 1970
- Cohen D.B. & Glasgow B.J. Bilateral optic nerve Cryptococcosis in sudden blindness in patients with acquired immune deficiency syndrome. *Ophthal.* 100:1689-1694. 1993
- Connoly J H, Krockenberger M B, Malik R et al., Asyntptomatic carriage of *Cryptococcus neoformans* in the nasal cavity of Koala (*Phascolarctos cinereus*) *Med Mycol* 37:331-338.1999.
- Corrêia, M. P. S., Pardal, P. P. O., Severo, L.C., Oliveira, F. — Criptococose na infância, no Estado do Pará. In: II Congresso Brasileiro de Micologia. Rio de Janeiro. 1998: 70. (Abstract A54)
- Currie, B. P. & Casadevall, A., Estimation of the prevalence of cryptococcal infection among patients infected with the human immunodeficiency virus in New York, *Clin. Infect. Dis.*, v. 19, n. 2, p.1029-1033, apr., 1994.
- Currie, B.P.; Freundlich, L. H. , Soto, M. A. & Casadevall, A. , — False negative cerebrospinal fluid cryptococcal latex agglutination tests for patients with culture positive cryptococcal meningitis, *J. Clin. Microbiol*, v.31, n.9, sept, p.2519-2522, 1993.
- De Repentigny, L. ; Kaufman, L. ; Cole,G.T.; Kruse, D.; Latgé, J.P. & Matthews, R. C. ,— Immunodiagnosis of invasive fungal infection , *J.Med. Vet. Micol.*, v.32, suppl.1, n. , p.239-252, 1994.

- Dominguez, C. C. *et al.*, . Infection por *Cryptococcus neoformans* en pacientes com síndrome de imunodeficiencia adquirida. Aspectos clínicos, paraclínicos y terapêuticos. **Rev. Med. Inst. Mexicano del Seguro Social.**, Mexico. V. 27, n.3, 1989.
- Emmons, C. W. Natural occurrence of opportunistic fungi . *Lab Invest.*11: 1026-1032, 1962.
- Flatland, B., Greene, R.T. & Lappin, M.R. , Clinical and serologic evaluation of cats with cryptococcosis. , **J. Am. Vet. Med.A.** , v.209,n.6, sept., p1110-1113, 1996.
- Fiorillo, A. M. *et al.*, Meningite criptocócica: aspectos clínicos evolutivos e histopatológicos seguindo condição predisponente. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, São Paulo, v. 31, n.1, p.19-25, 1990.
- Finazzi, R. , Unusual presentation of cryptococosis in a patient with AIDS , *Clin Infect. Dis.* , Chicago, v. 22, n.4, apr., p. 709, 1996.
- Fromtling, R. A. , Abruzzo, G.K. & Bulmer, G.S., *Cryptococcus neoformans* : comparisons of in vitro antifungal susceptibilitises of serotypes AD and BC. , **Mycopath.**, Dordrecht, v.94, n. , p.27-30, 1986
- .
- Gal, A. A. , Koss, M. N. & Hawkins, J. et al.,, The pathology of pulmonary cryptococcal infections in the acquired immunodeficiency syndrome. **Arch Pathol. Lab. Med.**, n.110, n. , p.502, 1986.
- Garza-Garza, D., Buendia-Uribe, J. L., Martinez-Cruz, E *et al.*, Caracterización de cepas de *Cryptococcus neoformans* aisladas de pacientes com síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). , **Rev. Lat. Amer. Microbil.** , (Mexico) , v.37, n.3, jul-sep, 1995.
- Gezuele, E., Calegari, L., Sanabria, A . et al.,. Isolation in Uruguay of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from a next of the wasp *Polybia occidentalis*. **Rev. Iber. Micol.** V.10, n. , p.5-6, 1993.
- Goldman, M. & Pottage, J.C. , Cryptococcal infection of the breast , **Clin Infect. Dis.**, v.21, n. , nov, p.1166-1169, 1995.

- Gonçalves, A.J. R. *et al.*, , Criptococose - O grande iceberg clínico e micológico. , **Rev. Bras. Neurol.**, Rio de Janeiro, v.19, n.4, p.97-100, 1983.
- Gonçalves, A. J. R. *et al.*,, Criptococose no Estado do Rio de Janeiro - Apresentação de 10 casos e revisão da literatura fluminense , Rio de Janeiro, **Arq. Bras. Med.**, v.62, n.6, p.395-398, 1988.
- Gonçalves, A. J. R., Mudanças dos padrões epidemiológicos e clínicos das doenças infecciosas nos últimos 35 anos., Rio de Janeiro, **Arq Bras. Med.**, v.69,n.1, p.3-10 , 1995.
- Gonçalves, A. J. R. , Pinto A.M. , Lazera, M. L. *et al.*, , Criptococose- considerações sobre envolvimento respiratório , **Arq Bras Med.** , v. 58, n.5, p.329-334. 1994.
- Gezuele, E. ,Calegari, L., Sanabria, A . *et al.*,. Isolation in Uruguay of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from a nest of the wasp *Polybia occidentalis*. **Rev. Iber. Micol.** v.10, n. , p.5-6, 1993.
- Graybill, J.R., Overview of management of fungal infections : Part 2 , **Clin. Infect. Dis.** , Chicago,. 17, suppl.2, p. S513-4, 1993.
- Gray, L.D. & Roberts, G. D., Experience with the use pronase to eliminate interference factors in the latex agglutination test for cryptococcal antigen, **J. Clin.Microb.**, nov., v.26, n.11,p.2450-2451, 1988.
- Gray, L.D. & Roberts, G.D., — Laboratory diagnosis of systemic fungal diseases, **Infect. Dis. Clin. Of North. Am.** , v.2, n.4, dec, p779-803, 1988.
- Gross, N. T., Nessa, K. , Camner,P. *et al.*,, Interection between *Cryptococcus neoformans* and alveolar macrophages, **J.Med. Vet. Mycol.**, v.35, n., p.263-269, 1997.
- Gurevitz, O., Goldschhmied-Reuven, A., Block, C. *et al.* Case Report - *Cryptococcus neoformans* vertebral osteomyelitis, **J.Med. Vet. Mycol.**, v. , n.32, p.315-318, 1994.

- Hammerman, K. J. *et al.* Pulmonary Cryptococcosis: Clinical forms and treatment. , *Am. Rev. Resp Dis.* , New York, v. 108, p.1116- 1121, 1973.
- Heath, C.H., Lendrum, J. L. , Wetherall, B.L. , *et al.* , Invasive cryptococcosis in a family with epidermodysplasia verruciformis and idiopathic CD4 cell depletion , *Clin. Infect. Dis.* , v.25, 1997.
- Hajjeh, R. A., Brandt, M. E. & Pinner, R.W., Emergence of Cryptococcal Disease: Epidemiologic Perspectives 100 Years after Its Discovery, *Epidemiol. Rev.*, v.17.n.2, 1995.
- Howard, D. H. — The commensalism of *Cryptococcus neoformans*, *Sabouraudia*, London, v.11, part2 , p.173-174, 1973.
- Hogan, L. H. , Klein, B. S. & Levitz, S. M., Virulence factor of medically important fungi ., *Clin. Microbiol. Rev.*, oct, p. 469-488, 1996.
- Huffnagle, G. B. ; Yates, J.L. & Lipscomb, M. F. , Immunity to a pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection requires both CD4 and CD8 T cells , *J. Exp. Med.* , apr., v. 173, n. , p.793-800, 1991.
- Ibrahim, A S.; Filler, S.G.; Alcouloume, M.S *et al.* Adherence to damage of endothelial cells by *Cryptococcus neoformans* in vitro: Role of the capsula., *Infect. Immunity* , p.4368-4374, vol. 63,n.11 ,1995.
- Ikeda, R. Shinoda, T., Morita, T. & Jacobson, E. S. , Characterization of phenol oxidase from *Cryptococcus neoformans* var *neoformans*. *Microl. Immunol.* ,v.37, n.10, p. 759-764 , 1993.
- Jacobson, E.S. & Compton, G. M. , Discordant regulation of phenoloxidase and capsular polysaccharide in *Cryptococcus neoformans* , *J. Med. Vet. Mycol.* , v.34, n.4, jan, p.289-291, 1996.
- James, P. G. & Cherniak, R. , Galactoxylomannans of *Cryptococcus neoformans* , *Infect. Immun.* , v.60, n.3, p.1084 - 1088, 1992.

- Jimenez-Lucho, V., Gissburg, V. & Krivan, H.C., *Cryptococcus neoformans, Candida albicans*, and other fungi bind specifically to the glycosphingolipid lactosylceramide, a possible adhesion receptor for yeast, *Infect. Immun*, v.58,n.7, jul., p. 2085-2090, 1990.
- Johnson,L.B., Bradley,S.F & Kauffman, C.A., Fungaemia due to *Cryptococcus laurentii* and a review of non-neoformans cryptococcaemia. *Mycoses*, v.41, n7/8, set/out, 1997.
- Katlama, C. *et al.*, Acquired Immunodeficiency Syndrome - (AIDS) in africans, *Ann Soc. Belg. Méd. Trop*, Antwerpen., v. 64, p.379-389, 1984.
- Kestelyn, P. , Taelman, H. , Bogaerts, J.. *et al.*, Ophthalmic manifestations of infections with *Cryptococcus neoformans* in patients with the Acquired Immunodeficiency Syndrome, *Am. J. Ophth.* , v. , n.116, p.721-727, 1993.
- Kerkering, T.M., Duma, R.J. & Shadomy, S., The evolution of pulmonary Cryptococcosis , *Ann. Inter. Med.* , v.94, n. , p. 611-616, 1981.
- Kilani, B. , Goubontini, M., Gastli, M. *et al.*, Cryptococose neuro-méningée et infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) , *J. Mycol. Méd.* , v. ,n.7 , p.97-99,1997.
- Kimura,M., Kauffaman,L. , Maehkura, S. *et al.*, Pulmonary cryptococcosis deu to a capsule-deficient strain confused with metastatic lung cancer, *Mycopathol.*, v.140, n.2, p.65-68 , 1998.
- Kleinbaun, D. G. , Kupper, L. L. & Morgenstern, H. , in **Epidemiologic Research – Principles and quantitative methods** , Van Nostrand Reinhold Ed., chp.5, p.62-93, 1982.
- Kovacs, J. A. *et al.*, Cryptococcosis in the acquired immunodeficiency syndrome., *Ann. Intern. Med.* , Philadelphia, v. 103. , p.533-538, 1985.

- Kordosis,T., Avlami, A., Velegraki, A. *et al.*, First report of *Cryptococcus laurentii* meningitis and a fatal case of *Cryptococcus albidus* cryptococcaemia in AIDS patients. *Med. Mycol.* , v.36, n.5, out, 1998.
- Kozel, T. R.. & Gotschlich, E.C. The capsule of *Cryptococcus neoformans* passively inhibits phagocytosis of the yeast by macrophages; *J. Immunol.*, 129:1675-1680., 1982.
- Kozel, T. R. , Virulence factors of *Cryptococcus neoformans*, *Trends in Microbiology*, v.3. n.8, aug. , p. 295-298 , 1995.
- Kwon -Chung, K. J. & Bennett, J. E. - Epidemiologic differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Am. J. Epidemiol.*, Baltimore, v.120, p.123-130, 1984.
- Kwon-Chung, K. J. *et al.* Taxonic studies on Filobasidiella species and their anamorphs. Antonie van Leeuwenhoek, *J. Microbiol.*, Amsterdam, v. 48, p.25-38, 1982.
- Kwon-Chung, K.J. & Rhodes, J. C., Encapsulation and melanin formation as indicators of virulence in *Cryptococcus neoformans*, *Infect. Immunity.* Jan.,v. 51, n.1, p218-223, 1986.
- Kwon-Chung, K. J. *et al.*, Recent advances in biology an immunology of *Cryptococcus neoformans.*, *J. Med Vet. Micol.*, Dordrecht, v.30,suppl.1, p.133-142, 1992.
- Kwon – Chung, K. J., Morphogenesis of *Fillobasidiella neoformans*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans*, *Mycol.* , v.68, n. , p. 821-833, 1976.
- Kwon-Chung, K. J., A new genus, Filobasidiella, the perfect state of *Cryptococcus neoformans*, *Mycol.* , v.67, n. , p.1197-1200, 1975.
- Kwon-Chung, K.J., Polacheck, I. , & Bennett, J. E., Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (Serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (Serotypes B and C)

- Kwon-Chung, K.J.; Pfeiffer, T. *et al.*, Molecular biology of *C. neoformans* and therapy of cryptococcosis, **J. Med Vet. Mycol.**, v. 32, n. , suppl 1, p.404-415, 1994.
- Kohl, K.H.; Hof, H.; Scherettenbrunner *et al.*, *Cryptococcus neoformans* var *gattii* in Europe, **Lancet**, v. , n.8444, p.1515, jun., 1985.
- Lacaz, C. S. & Rodrigues, M. C. — Sorotipagem de *Cryptococcus neoformans* **Rev. Bras. Med.**, Rio de Janeiro, v.40,p. 293 -300, 1983.
- Larsen, R. A.; Bozzette, S.;Mccutchan, J. A *et al.* Persistent *Cryptococcus neoformans* infection of the prostate after successful treatment of meningitis, **Annals Int. Med.** , v.111, n. , p.125-128, 1989.
- Laureson, I. F. *et al.*, *Cryptococcus neoformans* in Papua New Guinea: a common pathogen but an elusive source, **J. Med. Vet. Mycol.** , v. 35, p. 437-440, 1997.
- Lazera , M. S. *et al.* Isolation of both varieties of *C. neoformans* from saprophytic sources in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **J. Med. Vet. Mycol.**, Abingdon, v.31, n.9, p. 449-454, 1993.
- Lazera, M.S. *et al.*, Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in decaying wood forming hollows in living trees , **J. Med.Vet. Micol.**, v.34, oct, p.127-133, 1996.
- Littman, M. L. & Borok, R. Relation of the pigeon to cryptococcosis: natural carrier state, heat resistance and survival of *Cryptococcus neoformans* . **Mycopath**, v. 35, n. , p.324-345, 1968.
- Londero, A. T. & Gonçalves, A. J. R., Criptococose. **J.Bras. Med.**, Rio de Janeiro, v.55, n.5/6, p.83-95, 1988.

- López-Martínez, R., Soto-Hernández, J. L., Ostrosky-Zeichner, L. *et al.* *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* among patients with cryptococcal meningitis in Mexico. First observations, **Mycopath**, v.134, n.2, p.61-64, 1996.
- Malik, R. , Dill-Mackay, E. Martin, P. *et al.* Cryptococcosis in dogs : A retrospective study of 20 consecutive cases, **J. Med. Vet. Micol.**, 1995,v.33, p.291-297,.
- Malik,R. ,Wigney, D.I., Muir, D.B. & Love, D. N., Assymptomatic carriage of *Cryptococcus neoformans* in the nasal cavity of dogs and cats. **J. Med. Vet. Micol.** 1997,v.35, p.27 – 31,.
- Melo, N.T., Lacaz, C.S., Caharbel, C.E., *et al.* Quimiotipagem do *C. neoformans*. Revisão de literatura novos dados epidemiológicos sobre a criptococose nossa experiência com o emprego do meio C.G.B. no estudo daquela levedura, **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, 1993,v.35, n.5, p.469-478, set/out,.
- Min, K.H. & Kwon-Chung, J.K. , The biochemical basis for the distinction between the two *Cryptococcus neoformans* varieties with CGB medium , **Sbl. Bakt. Hyg. A**, Germany, 1986.v.261, n 4, p471-480,
- Moosa, M.Y.S. & Coovadia, Y.M., Cryptococcal meningitis in Durban, South Africa: A comparison of clinical features, laboratory findings, and outcome for human immunodeficiency virus (HIV) — Positive and HIV – Negative Patients. **Clin. Infect. Dis.**, 1997 v. , n.24, p.131-134,.
- Murphy, J.W., Mosley, R.L., Cherniak, R *et al.* Serological e eletrophoretic and biological properties of *Cryptococcus neoformans* antigens. **Infect. Immun.** v. , n.56, p.424-431.
- Murphy, J.W. & Mc Daniel, O., In vitro reactivity of natural killer (NK) cells against *Cryptococcus neoformans*, **J. Immunol.** 1982, v.128, n.4, p.1577-1583,.
- McGinnis, M. R. & Cols., Micotic flora of the interdigital spaces of the human foot: a preliminary investigation. **Mycopathol.**, The Hague, 1975,v. 55, p.47 - 52,.

- McGinnis, M. R. & Ajello, L. - Conceptual basis for Hyalohyphomycosis In: Microbiology and Microbial Infections . Medical Mycology, 9 ed. London, Arnold, 1998, vol.4, chap.26, p. 499-502,.
- Mitchell, D.H. & Sorrell, T.C. Pancoast's syndrome due to pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*, *Clin Infect. Dis.*, 1992, 14 : 1142-1144,.
- Minamoto, G. Y. & Rosemberg, A. S., Fungal infection in AIDS patients with acquired immunodeficiency syndrome in Management of HIV- infected patient, part II , *Med . Clin. North Am.*, , 1997. 81(2): 381-411
- Montagna, M.T. et al. *Cryptococcus neoformans* var *gattii* en Italie Note I. Premier cas autochtone de méningite à sérotype B chez um sujet VIH positif, *J. Mycol. Méd.*, , 1997. 7:90-92
- Montagna, M. T. et al., *Cryptococcus neoformans* var *gattii* in Italy – Note II Enviromental investigation related to na autochtonoius clinical case in Apulia, *J. Mycol. Méd.* , 7, 1997.
- Moore, R.D. & Chaisson, R.E. — Natural history of opportunistic in na HIV infected urban clinical cohort, *Ann. Intern. Med.*, 1996, 124 (7):633-642,.
- Narisawa, Y.; Kojima, T.; Iriki, A.; Masaki, J. & Kohda, H., Tissue changes in criptococcosis : histologic alteratiion form gelatinous to suppurative granulomatous tissue response with asteroid body . *Mycopathol.*, 1989, 106:113-119,.
- Nichols, L. ; Florentine, B. ; Lewis, W. *et al.* , Bone marrow examination for the diagnosis of mycobacteriae and fungal infections in the acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Pathol. Lab Med.*, 115(11):1125-1152, 1991.
- Negrioni, R.; Cendoya, C.; Arechavala, A. I. et al. Detection fo *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide antigen in asymptomatic HIV-infected patients, *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 1995, v.37, n.5, p.385-389, set-out.

- Niehaus, W. G. & Flynn, T., Regulation of mannitol and degradation by *Cryptococcus neoformans* **J. Bacteriol.**, 1994, v. 176, n. 3, p. 651-655,.
- Oliveira-Neto, I.C., Machado, C. C., Wagner, M. B. & Severo, L.C., Meio século de criptococose no Brasil. Revisão de 308 casos, *Âmb. Hosp.* 1993, v.7, p 5-16,.
- Ooi, B. , Chen, B.T.M. , Lim, C.H. , Khoo, O . T., Chan, K.T. Survival of a patient transplanted with a kidney infected with *Cryptococcus neoformans*. *Transplantation* 1978,11:428-429,.
- Passoni, L.F.C., Wood animal and human being as reservoirs for human *Cryptococcus neoformans* infection, *Rev. Iberoam. Micol.*, Bilbao, , 1999, jun, v.16, n.2, p. 77-81.
- Passoni, L.F.C. ; Wanke, B. ; Nishikawa, M.M. & Lazéra, 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. Mycol.**, 1998, v.36, n.5, out,
- Perfect, J. R., Wong, B., Chang, Y. C., Kwon-Chung, K. J. & Williamson, P. R., — *Cryptococcus neoformans*: Virulence and host defences. **Med. Mycol.**, 1998, v.36, suppl.1, p.79-86,.
- Pessôa, S.B. & Martins, A. V. *Pessôa Parasitologia Médica*. 11ed., Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 1982.
- Pfeiffer, T. J. & Ellis, D.H. Environmental isolations of *Cryptococcus neoformans* var *gattii* from California. **J.Infect. Dis.** 1991, v.163, n.4, p.929-930,.
- Pfeiffer, T. J. & Ellis, D. Environmental isolation of *C. neoformans* var. *gattii* from *Eucalyptus tereticornis* . **J. Med. Vet. Micol.**, Dordrecht 1992, v. 30, n.5, p.407-408,.
- Pfeiffer, T. J. & Ellis, D.H. Short communication – Serotypes of Australian environmental and clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*, **J. Med. Vet. Mycol**, 1993., v.31, p. 401-404,.

- Piot P, Quim T. C., Telman H et al., Acquired immunodeficiency syndrome in heterosexual population in Zaire, *Lancet* 1984, ii:65-58,
- Powderly, W.G *et al.*, A controlled trial of fluconazol or amphotericina B to prevent relaps of cryptococcal meningitis in patiets with the acquired immunodeficiency syndrome, *N. Engl. J. Med.* 1992, v.326, n.12, mar.
- Powderly, W. G., Recents advances in the management of cryptococcal meningitis in patients with AIDS, *Clin Infect. Dis* 1996., v. 22, n., (suppl.2), p.s119-23,.
- Powell, K.E. ; Dahl, B.A . , Weeks, R.J. & Tosh.F.E. , Airborne *Cryptococcus neoformans* : Particles form pigeon excrets compatible with alveolar deposition , **J. Infect. Dis.**, Chicago, 1972,v.125, n.4, apr., p.412-415,.
- Polacheck, I. , Kwon-Chung, K.J. , Canavanina resistance in *Cryptococcus neoformans*, **Antimicrobiol. Agents chemot.**, v.29,n.1, p.468-467, 1986.
- Pursley, T. J. *et al.*, Fluconazol – Induced congenital anomalies in three infants , **Clin Infect. Dis**, Chicago, 1996.,v. 22, n. , p336- 400l , jul.,
- Quadriarello, V. J. ; Viscoli, C. & Horwitz, R. , Primary prevention of cryptococcal meningitis by fluconazol in infected patient , *The Lancet*, 1995, v. 345, n. , mar. , p 548-552,.
- Queiroz-Telles, F., Nassif, A. E., Muro, M. D. et al. Tentativa de isolamento de *Cryptococcus neoformans* , a partir de fontes ambientais da região metropolitana de Curitiba, Paraná. Resultados preliminares In: II Congresso Brasileiro de Micologia. Rio de Janeiro, 1998: 184 (Abstract G46).
- Randhawa, H. S. & Paliwal, D. K., Survey of cryptococcus neoformans in the respiratory tract of patients with bronchopulmonary disorders and in the air, *Sabauraudia*, 1979, v. , n.17, p.399-404,.

- Randhawa, H. S. & Paliwal, D. K., Occurrence and significance of *Cryptococcus neoformans* in the oropharynx and on the skin of a healthy human population. *J. Clin Microbiol.*, London, 1977, v.6, p.325-327,
- Reiss, F. & Szilagy, G., Ecology of yeast-like fungi in a hospital population *Arch. Dermat.*, Chicago, 1965, v.91, p. 611-614,.
- Reiss, E., Cherniak, R., Eby, R. & Kaufman, L., Enzyme immunoassay detection of IgM to galactoxylomanan of *Cryptococcus neoformans*. *Diagn. Immunol.*, 1984, v., n.2, p.109-115,.
- Rippon, J. W., Cryptococcosis. In: Medical Mycology. The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia, W.B. Saunders Co, 1988, p.582-609,.
- Rivaldi, M. G. *et al.*, Sorotypes of *Cryptococcus neoformans* in patients with AIDS, *J.Infect Dis.*, Chicago, 1986. v.153, p642,
- Rozembaum, R.; Gonçalves, A. J. R. ; Wanke, B. *et al.* *Cryptococcus neoformans* varieties as agent of Cryptococcosis in Brazil, *Mycopath.* 1992, v.119, n. 2, p133-136,.
- Rozembaum, R., Gonçalves, A. J. R., Wanke, B. & Vieira, W., *Cryptococcus neoformans* var *gattii* in a Brazilian AIDS patient, *Mycopath.* 1990, v.112, n. 1, p.33-34,.
- Ruiz, A., Fromtling, R. A. & Bulmer, G. S., Distribution of *Cryptococcus neoformans* in a natural site, *Infect. Immun*, 1981, v31, n.2, p. 560-563,.
- Ruiz, A., Neilson, J. B. & Bulmer, G. S. Control of *Cryptococcus neoformans* by biotia factori, *Sabourandia*, 1982, v.20, n.1, p21-29,.
- Ruiz, A. Velez, D. & Fromtling, R. A. Isolation of saprophytic *Cryptococcus neoformans* from Puerto Rico: distribution and variety, *Mycopathol.* 1989, v.106, n.3, p.167-170,

- Saag, M.S. *et al.*, Comparison of anfotericin B with fluconazole in the treatment of acute AIDS- associated cryptococcal meningitis , v.326, n.2,jan., 1992.
- Saag, M. S., Editorial response : Clinical and Host differences between infections with the two varieties of *Cryptococcus neoformans* ,***Clin. Infect. Dis***, 1995., v. 21, n. , p35-36.
- Salkin, I. F. & Hurd, N. J., New medium for differentiation of *Cryptococcus neoformans* serotypes pairs , ***J. Clin. Microbiol.*** 1982., v.15, n. 1, p.169-171,
- Salkowski, C. A. *et al.*, Colonization and pathogenesis of *Cryptococcus neoformans* in gnotobiotic mice , ***Infect. Immun***, Washington, , 1987v. 55, n.9, p.2000-2005 , sept.
- Scaffner, A. , Experimental basis for the clinical epidemiology of fungal infections. A review., ***Mycoses***, 1990, v.32, n. 10, p.499-515,.
- Schecheter, M. & Marangoni, D. V. Doenças Infecciosas: conduta diagnóstica e terapeutica, Guanabara Koogan, 2<sup>a</sup> ed, p674. , 1998.
- Sorrell, T. C. , Chen, S. C. A., Ruma, P. et al., Concordance of clinical and envaironmental isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* by random amplification of polymorphic DNAanalysis and PCR fingerprint , ***J.Clin. Micribiol.*** V.34, n. , p.1253-1260,1996.
- Sugar, A . M. , Overview: Cryptococcosis in the patient with AIDS . ***Mycopathol.***, 114:153-157, 1991.
- Seaton, R. A., Hamilton, A . J.; Hay, R. J. & Warrell, D. A. , Exposure to *Cryptococcus neoformans* var *gattii* — a seroepidemiological study , ***Transact. Royal Soc. Trop. Med Hyg.***, London , v.90, n.5, sept-oct, 1996.
- Severo, V.; Severo, M.M.S.; Rache, L.S. *et al.* Criptococose uma micose em expansão, Rio de Janeiro, ***J.B.M.***, v,65, n.2, p.125-140, ago. , 1993.
- Speed, B. & Dunt, D. , Clinical and host differences between infectious with two varieties of *Cryptococcus neoformans* , ***Clin. Infect. Dis.***, v. 21, n. , p. 28-34, 1995.

- Staib, F., New concepts in the occurrence and identification of *Cryptococcus neoformans*, *Mycopath.* Mycol Appl. , v.19, n.1-4, p.143-145, 1963.
- Staib F, Grave B, Altmann L *et. al.* Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* Mycopathol 65: 73-76. 1978.
- Staib F. & Seibold M. Use of the membrane filtration technique and Staib agar for the detection of *Cryptococcus neoformans* in the urine of AIDS patients – A contribution to diagnosis, therapy and pathogenesis of cryptococcosis. *Micoses* 32 : 63-72. 1989.
- Speed B R, Strawbridge L & Ellis D H. *Cryptococcus neoformans* var *gattii* meningitidis in an Australian patient with AIDS. *J.Med Vet Mycol* 31: 395-399. 1993.
- Speed B & Dunt D. Clinical and host differences between infections with two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Infect Dis* 21:28-34. 1995.
- Swinne-Desgain D . *Cryptococcus neoformans* of saprophytic origin. *Sabouraudia*. 13: 303-308. 1975.
- Swinne D, Kayembe K & Niyimi M . Isolation of saprophytic *Cryptococcus neoformans* var . *neoformans* in Kinshasa, Zaire. *Ann Soc Belg Med trop* 66: 57-61.1986.
- Swinne D, Deppener M , Maniratunga S *et. al.*. AIDS – Associated cryptococcosis in Bujumbura Burundi : na epidemiological study. *J Med Vet Mycol* 29: 25-30, 1991.
- Vanbreuseghen R & Takashio M . An atypical strain of *Cryptococcus neoformans* (SAN FELICE) Vuillemin 1899. Part II: *Cryptococcus neoformans* var *gattii*, var. *neof.* *Ann Soc Belg Med Trop* 50: 695-702, 1970.
- Van Der Horst C.M *et. al.*, Treatment of cryptococcal meningitis associated with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 337: 15-21. 1997
- .Van DE Perre P, Lepage P, Kestelyn P *et. al.*, Acquired immunodeficiency syndrome in Rwanda. *Lancet* ii:65-68. . 1984

- Vergara T R C, Almeida R M M, Gonçalves A J R, Basílio-DE-Oliveira C A & Vieira A R M . Síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS-SIDA) . Revisão da literatura e apresentação de casos de necrópsia da cidade do Rio de Janeiro. Arq Bras Med 61: 65-88, 1987.
- Viscoli C, Castagnola E, Van Lint M T, Moroni *et. al.* . Melanin “ghosts” and melanin composition in *Cryptococcus neoformans*. Infect Immun 64: 2420-2424, 1996.
- Warr W, Bates J H & Stone A . The spectrun of pulmonary Cryptococcosis. Ann Int Med 69: 1109-1116, 1968.
- Weinke T, Rögler G., Sixt C *et. al.*. Cryptococcosis in AIDS patients: observations concerning CNS involvement. J Neurol 236: 38-42,1989.
- White M H & Armstrong D . Cryptococcosis. Infect Dis Clin Nor Am 8: .383-398, 1994.
- Tortorano A M *et al.*. Prevalencie of s erotiype D in *Cryptococcus neoformans* isolates from HIV positive and HIV negative patients in Italy. Mycoses 40:.297-392, 1997.
- Tynes B *et. al.*. Variant formas of pulmonary cryptococcosis. Ann Intern Med 69: 117-1125, 1968.
- Wang Y, Aisen P & Casadevall, A.. Melanin, melanin “ghosts” and melanin composition in *Cryptococcus neoformans*. Infect Immun 64: 2420-2424, 1996.
- Ward W, Bates J H, FACP & Stone A . The spectrun of Pulmonary Cryptococcosis. Ann. Intern. Med 69: 1109-1116, 1968.
- Weinke T, Rögler G, Sixt C *et. Al.*, 1989. Cryptococcosis in AIDS patients observations concerning CNS involvement. J Neurol 236: 38-42, 1989.

White M H & Armstrong D. Cryptococcosis. *Infect Dis Clin of North Am* 8: .383-398, 1994.

Wong B, Perfect J R, .Begg S & Wright K. Production of the hexitol d-mannitol by *Cryptococcus neoformans*. In vitro and in rabbits with experimental meningitis. *Infect Immun* 58: 1664-1670, 1990.

Zanon U & Marangoni DV. *In* Complicações infecciosas hospitalares. Cap4, Doenças Infecciosas: Condutas diagnóstica e terapeutica. Guanabara Koogan. 2º ed. Rio de Janeiro, 1998.

## ANEXO I

### Isolamento primário de *C. neoformans*

#### Meio Niger Ágar Simples com Cloranfenicol (NSA) (Staib&Seibol) (modif.), 1989)

##### 1 – Material:

- Semente de niger (*Gyizotia abyssinica*) ----- 200 miligramas (mg)
- Água destilada ----- 1000 mililitros (ml) qsp (quantidade suficiente para)
- Ágar ----- 20 gramas (g)
- Cloranfenicol ----- 300 mg

##### 2 – Preparo:

As sementes de niger foram submetidas a cozimento por 30 minutos em 500ml de água destilada, sendo posteriormente trituradas e filtradas em gaze. O filtrado do extrato de niger foi colocado em proveta calibrada para 2000 ml e acrescentado água destilada qsp 1000 ml. Após ter sido medido pH (6 – 8), foi acrescentado o antibiótico cloranfenicol. Autoclavada à 110 ° C por 15 minutos. Foram distribuídos 15 ml do meio liquefeito em placas de Petri, assepticamente e estas deixadas à temperatura ambiente para solidificação do meio e posteriormente em estufa à 36° C por 24 h como teste de esterilidade.

##### 3 – Interpretação e fundamento:

Este meio é empregado no diagnóstico de materiais clínicos contaminados como escarro, urina, lavado bronco-alveolar e não contaminados como LCR. A suplementação do meio com antibiótico inibe o crescimento de bactérias da microbiota normal e patogênica que possam interferir com o crescimento do fungo. A enzima 3-4 dihidroxifenilalaninafenoloxidase ligada a membrana celular do fungo conferem a capacidade de na presença de substâncias o-difenol encontrada na semente de niger, formar pigmentos de melanina. E entre 1 a 5 dias em média as colônias de *Cryptococcus neoformans* adquirem cor marrom escura, tornando fácil de distingui-las entre outras leveduras .

## ANEXO II

### Estudo de Variedade através do meio canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB) (Kwon-Chung, Polachek & Bennett, 1982)

1 – Preparo do meio:

Solução estoque A:

- Sulfato de L – canavanina ----- 30 mg
  - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ----- 1 g
  - H<sub>2</sub>O<sub>7</sub>MgSO<sub>4</sub> ----- 1 g
  - Cloridrato de tiamina ----- 10 microlitros (µl)
- (Benerva Roche ou similar)
- Água deionizada ----- 100 ml

Após homogeneização manual, o pH foi corrigido para 5,6. A solução foi esterelizada por filtração (Sistema Millipore , com pré –filtro e filtros de 0,45 e 0,22 mm) e conservada na geladeira a 4° C .

Solução estoque B:

- Azul de bromotimol sódico ----- 0,4 g
- Água deionizada ----- 100 ml qsp

Após homogeneização manual, a solução foi guardada em geladeira a 4°C.

Preparo de 500 ml de meio :

- Água deionizada ----- 440 ml
- Solução estoque B ----- 10 ml
- Ágar (Bacto ágar – Difco) ----- 10 g

As substâncias foram misturadas e autoclavadas em Erlemmayer por 15 minutos a 120°C. Em banho-maria, a solução foi resfriada até atingir 55°C. Foram acrescentados 50 ml da solução A sob agitação manual constante em câmara de fluxo laminar. Em seguida, foram dispensados assepticamente 5ml do meio em tubos de vidros rosqueados, que eram colocados em repouso sobre a bancada em semi – inclinação. A coloração final do meio era amarelo esverdeado claro e o pH entre 5,8 ± 0,1.

Cada cepa a ser testada foi repicada em meio NSA e após 48 h uma colônia marrom escura era retirada com alça de platina estéril e semeada na parte central da superfície do meio centro do tubo. Os tubos semeados eram mantidos à temperatura ambiente até por 5 dias. Cepas padrão foram usadas como controle positivo e negativo.

### 3- Interpretação do resultado:

A primeira leitura era feita após 2 dias e a segunda e última, no máximo no 5º dia. A interpretação positiva foi baseada na mudança de coloração do meio original (amarelo esverdeado, pH  $5,8 \pm 0,1$ ) para azul cobalto (pH  $- 7,0$ ) em 2 a 5 dias após o repique da cepa em meio CGB. A manutenção da cor original ou a mudança para tom esverdeado ou verde forte em torno do inóculo foi considerada negativa.

### 4- Fundamento:

A base bioquímica para distinção entre as duas variedades de *C. neoformans* foram baseadas na utilização da glicina como fonte de carbono e nitrogênio pela cepa *C. neoformans* var. *gattii* e sua total resistência ao análogo de arginina, L-canavanina. O azul de bromotimol sódico foi usado como indicador do pH o qual em pH neutro a alcalino adquire coloração azul cobalto. O meio CGB tem pH entre  $5,8 \pm 0,1$  (ácido) . Logo ocorre a alcalinização do meio quando há crescimento de *C. neoformans* var *gattii* e isto parece ser devido a liberação de amônia durante a metabolização da glicina pela glicina descarboxilase. (Min & Kwon-Chung, 1986).

**ANEXO III**  
**PROTOCOLO I (2ª Fase)**

**Cryptococcus neoformans: Colonização vs Infecção em HIV ⊕**

**01 - Identificação:**

1-Nome: \_\_\_\_\_ 2-Nº Caso: \_\_\_\_\_  
 3-Nº Reg.: \_\_\_\_\_  
 4-Data Nasc.: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ 5 - Sexo: (M) (F) 6-Cor: (B) (N) (Pdo) (A)  
 7-Naturalidade: \_\_\_\_\_ 8-Est.Civil: (S) (C) (D) (O)  
 9-Endereço: \_\_\_\_\_ 10-Tel.: \_\_\_\_\_  
 11- Bairro: \_\_\_\_\_ 12-Cidade: \_\_\_\_\_ 13-UF: \_\_\_\_\_  
 14- Ocupação Atual/Anterior: \_\_\_\_\_ 15-Escol.: (Fund) (1º) (2º) (3º)

**02 - História Social:**

1-Tipo: \_\_\_\_\_ 2-Nº Cômodos: \_\_\_\_\_ 3-Piso: \_\_\_\_\_ 4-Parede: \_\_\_\_\_  
 5-Cobertura: \_\_\_\_\_ 6-Animais Perid.: (S) (N) quais \_\_\_\_\_  
 7-Água: (S) (N) 8-Esgoto: (S) (N) 9-Luz: (S) (N)  
 10-Animais Intrad: (S) (N) quais \_\_\_\_\_  
 11-Tabagista (S) (N) \_\_\_\_\_ 12-Etilista (S) (N) \_\_\_\_\_

**03 - Situação de risco para infecção pelo HIV:**

1-HMS ( ) 2-BI ( ) 3-HTS ( ) 4-US Droga EV ( ) 5-Politransf. ( )  
 6-Hemof. ( ) 7-Desc ( ) 8-Outros ( ) \_\_\_\_\_

**04 - Grupo CDC: ( I ) ( II ) ( III ) ( IV )**

**05 - Sorologia p/HIV:**

Data / Nº		
ELISA:		
IF:		
IB:		

**06 - Classificação Seg. nº CD4:**

<b>A</b>	( 1 )	( 2 )	( 3 )
<b>B</b>	( 1 )	( 2 )	( 3 )
<b>C</b>	( 1 )	( 2 )	( 3 )

**07 – HPP – (Ano)**

**08 – Ex. Físico**

**9 - Espécimes Coletados (Rotina)**

Localização/Data				
1. Interdígito Podal				
2. Interdígito de Mão				
3. Ventral de língua				
4. Swab nasal				
5. Escarro				
6. Urina				

**10 - Reavaliação da Imunidade Celular:**

Data / N°				
Leuc.Total				
Linf.Total				
CD4				
CD8				
CD4/CD8				

**11 - Investigação do paciente HIV ⊕:**

	Data	Microscopia	Cultura	LX
1. Escarro (N) (S)	___/___/___	(+) (-)	(+) (-)	
2. L B A (N) (S)	___/___/___	(+) (-)	(+) (-)	
3. Urina (N) (S)	___/___/___	(+) (-)	(+) (-)	(+) (-)
4. Sangue (N) (S)	___/___/___	(+) (-)	(+) (-)	(+) (-)
5. L C R (N) (S)	___/___/___	(+) (-)	(+) (-)	(+) (-)
6. Biopsias (N) (S)	___/___/___	(+) (-)	(+) (-)	
7. M.O (N) (S)	___/___/___	(+) (-)	(+) (-)	

8. RX Torax (N) (S) \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

- ( ) Normal
- ( ) Adenomegalia mediastina
- ( ) Nódulo ou massa (U) (M)
- ( ) Derrame pleural (U) (B)
- ( ) Cavitação (U) (M)
- ( ) Inf. Alv. (D) (E)
- ( ) Inf. Intest. (D) (E)
- ( ) Inf Misto. (D) (E)

**.9- LCR**

Data	N°	PMN	MN	PTN	GLI	PL/SO

12 - Estudo da Variedade: (N) (S)  
 neoformans (A) (D)  
 gattii (B) (C)

13 - Uso de Antifúngicos: (S) (N)

Anf B ( ) Azóis ( ) \_\_\_\_\_ Outros ( )  
 Dose \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_  
 Obs: \_\_\_\_\_

14 - Uso de Anti-retroviral: (S) (N)  
 AZT ( ) DDI ( ) DDC ( ) Outros ( )

15 - Colonização ( ) Infecção ( )

16 - Evolução Clínica Atual: em acompanhamento ( ) óbito ( ) data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

17 - Necrópsia: (S) (N) N°: \_\_\_\_\_

**ANEXO III – a**

**Protocolo II (2ª fase)  
Óbitos com necrópsia**

Nº Caso: \_\_\_\_\_  
Nº Reg.: \_\_\_\_\_  
Nº Anat. Pat.: \_\_\_\_\_

**1 – Identificação:**

**1.1 – Nome:** \_\_\_\_\_

**1.2 – Idade:** \_\_\_\_\_

**2 – Óbito em:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ **3- Causa Mortis:** \_\_\_\_\_

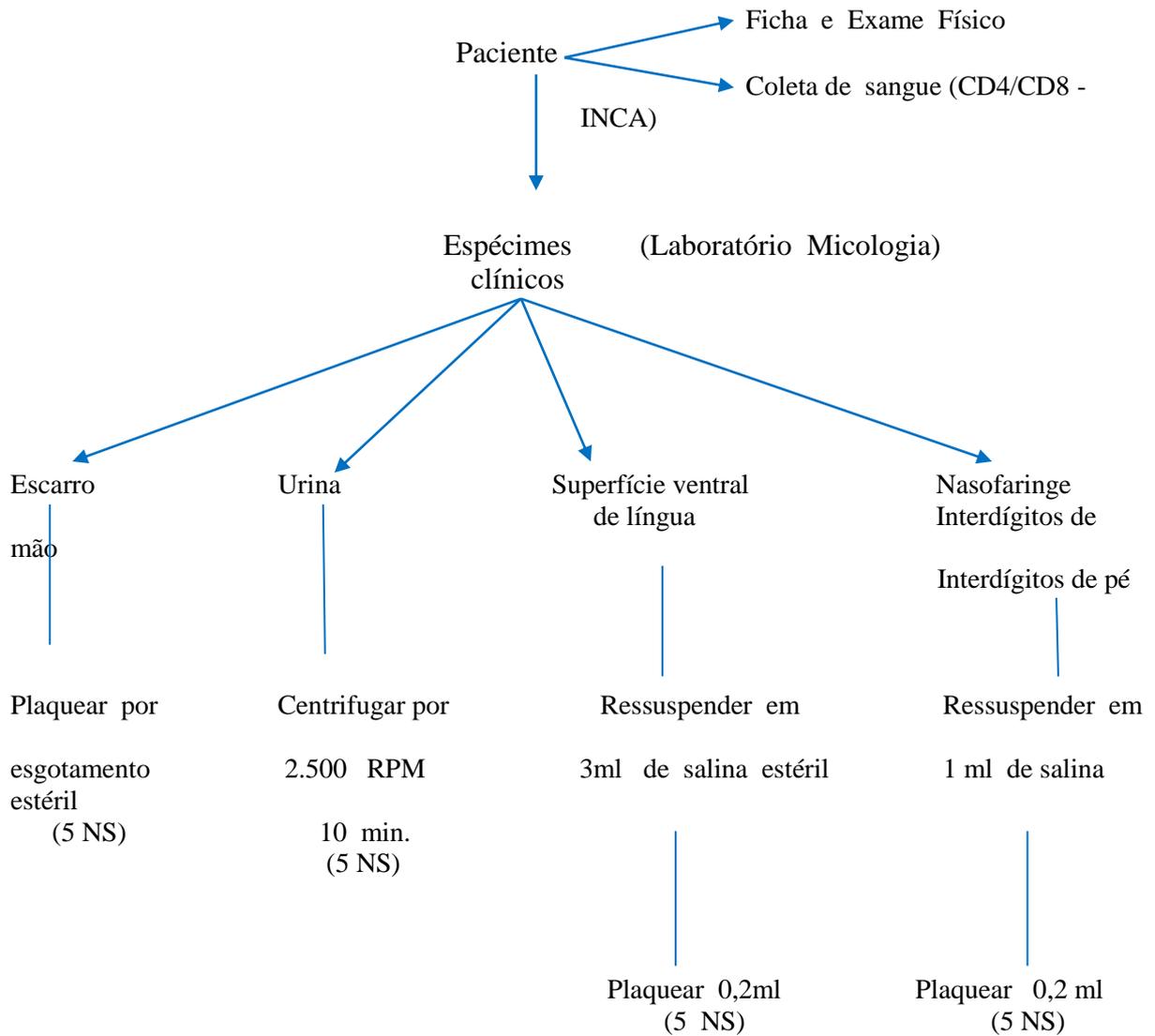
**4 –Aparelhos e Sistemas:**

<b>Aparelhos e Sistemas</b>	
<b>ACV</b>	
<b>Ap. Respiratório</b>	
<b>A.G.U.</b>	
<b>S.R.E.</b>	
<b>S.G.I.</b>	
<b>Pele e Fanêros</b>	
<b>S.N.C.</b>	
<b>Observações</b>	

## ANEXO IV

### Projeto Colonização

(Às terças-feiras pela manhã)



**Por paciente:** 05 (cinco) frascos de salina estéril com 3 ml  
30 (trinta) placas de Niger  
01 (um) Swab estéril  
01 (uma) placa de Petri estéril (para separar o escarro)

**Uso comum:** 1 (uma) cureta.

## ANEXO V

### Quadro 1

Casos de colonização cutâneo-mucosa pelo *Cryptococcus neoformans* em 100 indivíduos HIV positivos, com e sem AIDS  
Realizado no período de maio de 1990 a dezembro de 1992 (fase I) e de abril de 1996 a agosto de 1997 (fase III)  
Hospital Evandro Chagas – IOC- FIOCRUZ – RJ

Nome	Sexo	Idade	Nat.	Classif. CDC	CD4	Material Clínico	Variedade de <i>C. neoformans</i> sorotipo	Quadro Clínico	Evolução Clínica	Doenças Concomitantes	Situação	Fase
A.C.C Nº 77	M	61	PB	IV	40	Escarro	<i>neoformans</i> A	Sinusite	Negativo após tratamento		Colonização Bronquica Fase inicial infecção	I
N.H.A Nº 57	M	37	RJ	IV	317	Escarro	<i>neoformans</i> A	Síndrome Pulmonar	Tratamento. Boa Evolução	CMV, Pb ganglionar, BK Pulmonar	Colonização Bronquica Fase inicial infecção	I
A.L.S Nº 20	M	49	RJ	III	315	Secreção Nasal e Escarro	<i>neoformans</i> (RN)	Assintomático	Assintomático	Assintomático	Colonização Bronquica Transitória	I
R.L.M Nº 97	F	39	RJ	III	217	Escarro	<i>gattii</i> B	Síndrome Gripal, Sinusite	Assintomático	Assintomático	Colonização Transitória/ Infecção pulmonar inicial regressiva	III

\* Classificação CDC

\*\*Nº = Número de entrada do paciente no trabalho

NR = Não Realizado

Fonte: SAME- HEC

## ANEXO VI

### Quadro 2

Casos de colonização cutâneo-mucosa pelo *Cryptococcus neoformans* em 100 indivíduos HIV positivos, com e sem AIDS  
Realizado no período de maio de 1990 a dezembro de 1992 (fase I) e de dezembro de 1995 a maio de 1997 (fase II e IV)  
Hospital Evandro Chagas – IOC- FIOCRUZ – RJ

Nome	Sexo	Idade	Nat.	Classif. CDC	CD4	Material Clínico	Variedade e sorotipo	Quadro Clínico	Evolução Clínica	Doenças Concomitantes	Situação	Fase
B.G.L Nº 14	M	40	RJ	IV	37	Urina, LCR, Secreção Nasal	<i>neoformans A</i>	Síndrome Febril	Doença Criptocócica disseminada	Candidose oral	Criptococose disseminada em doença neurológica	I
D.C.P Nº 15	M	30	RJ	IV	<50	Urina, Sangue	<i>neoformans A</i>	Síndrome Febril Séptica	Resposta ao tratamento	CMV, Salmonelose, Estrongiloidíase	Criptococose disseminada em doença neurológica	I
A.K.V.M Nº 74	M	45	RJ	IV	NR	Urina	<i>neoformans A</i>	Síndrome Febril	Doença Criptocócica	Candidose oral, PCP, SK, CMV	Criptococose disseminada em doença neurológica	I
C.L Nº 03	M	32	RJ	III	NR	Urina, Sangue	<i>neoformans NT</i>	Síndrome Febril, Cefaléia, ALT. Pares Cranianos	Doença Criptocócica	Retinite CMV, BK pulmonar	Criptococose disseminada em doença neurológica	II
A.M.P Nº 21	M	50	RJ	IV	50	Urina, LCR, Sangue	<i>neoformans A</i>	Síndrome Meningea, Pulmonar, Febril	Doença Criptocócica	BK pleuro- pulmonar, TO, CNC, ITU por BNG	Criptococose disseminada em doença neurológica	II
F.J.M Nº 45	M	27	RJ	IV	123	LCR	<i>Neoformans NT</i>	Síndrome Febril, Cefaléia	Doença Criptocócica	candidose oral	Criptococose disseminada em doença neurológica	II
S.C.P Nº 51	M	40	RJ	IV	NR	Urina, Escarro	<i>Neoformans NT</i>	Síndrome Meningea, e Febril, Sinusite, H.I.C.	Doença Criptocócica	candidose oral, Criptosporidíase, Sinusite	Criptococose disseminada em doença neurológica	II
R.L Nº 78	M	30	RJ	IV	NR	Sangue	<i>Neoformans NT</i>	Síndrome Febril, Hemoptóico	Doença Criptocócica	BK Ganglionar e Pulmonar, H. Zoster	Criptococose disseminada em doença neurológica	II
R.L.M Nº 97(*)	F	41	RJ	IV	315	Sangue	<i>Neoformans A</i>	Síndrome Febril, Sinusite	Doença Criptocócica	BK Pulmonar, Sinusite Crônica	Criptococose disseminada em doença neurológica	III/IV

Media de Idade: 40 anos / (\*) Incluída após o período que foi realizado o protocolo

\* Classificação CDC/ \*\*Nº = Número de entrada do paciente no trabalho

NR = Não Realizado NT = Não Testado

Fonte: SAME- HEC/FIOCRUZ/RJ

## ANEXO VII

### Quadro 3

Achados de necropsia nos casos onde houve isolamento de *Cryptococcus neoformans*  
Hospital Evandro Chagas – IOC- FIOCRUZ – RJ

<b>Aparelho Cardiovascular</b>	<b>Aparelho Respiratório</b>	<b>Aparelho Genito/Urinário</b>	<b>Sistema Fagocítico mononuclear</b>	<b>Sistema Nervoso Central</b>	<b>Sistema Gastro-Intestinal</b>	<b>Pele</b>	<b>Causa Mortis</b>
Cardiomegalia Cardiopatía Focal	Infecção por Acantamoeba sp e/ou zigomicose	Cistite Glandular	Adenopatia Mesentérica	Sem Registro	SK, Candidose Oral, Esofagiana, CMV, Criptosporídio	LTA,SK,Herpes Cutâneo	Metabólica não especificada
Sem Registro	SK, PCP	Próstata com <i>C. neoformans</i>	Medula óssea, fígado, baço e linfonodo com <i>C. neoformans</i>	Sem Registro	Sem Registro	SK	Criptococose disseminada e PCP
Derrame Pericárdico leve	BK pleuropulmonar, Asbetose, Broncopneumonia Criptocócica	Próstata com <i>C. neoformans</i>	Fígado, baço e linfonodo com <i>C. neoformans</i>	Múltiplos abscessos por <i>Nocardia sp</i>	Esofagite leve, gastrite crônica inespecífica	Sem registro	Criptococose disseminada, Abscesso cerebral por <i>Nocardia sp</i>
Miocardite aguda	Pulmão com CMV e <i>C. neoformans</i>	Pielonefrite crônica, adrenalite aguda inespecífica	Esteatose hepática e BK Hepática	Meningoencefalite por CMV	Colite por CMV	Sem registro	Sepsis não especificada (CMV)..
Sem Registro	Criptococose pleuropulmonar	Criptococose Renal	Linfonodo com <i>C. neoformans</i>	Meningoencefalite criptocócica	Criptococose em intestino grosso	Sem registro	Criptococose disseminada
Sem Registro	CMV, pleurite crônica e broncopneumonia	adrenalite por CMV, prostatite inespecífica aguda	sem registro	Neurotoxoplasmose (cisto antigo)	Colite focal inespecífica cirrose micronodular	Sem registro	Leucoencefa- lopatia multifocal.

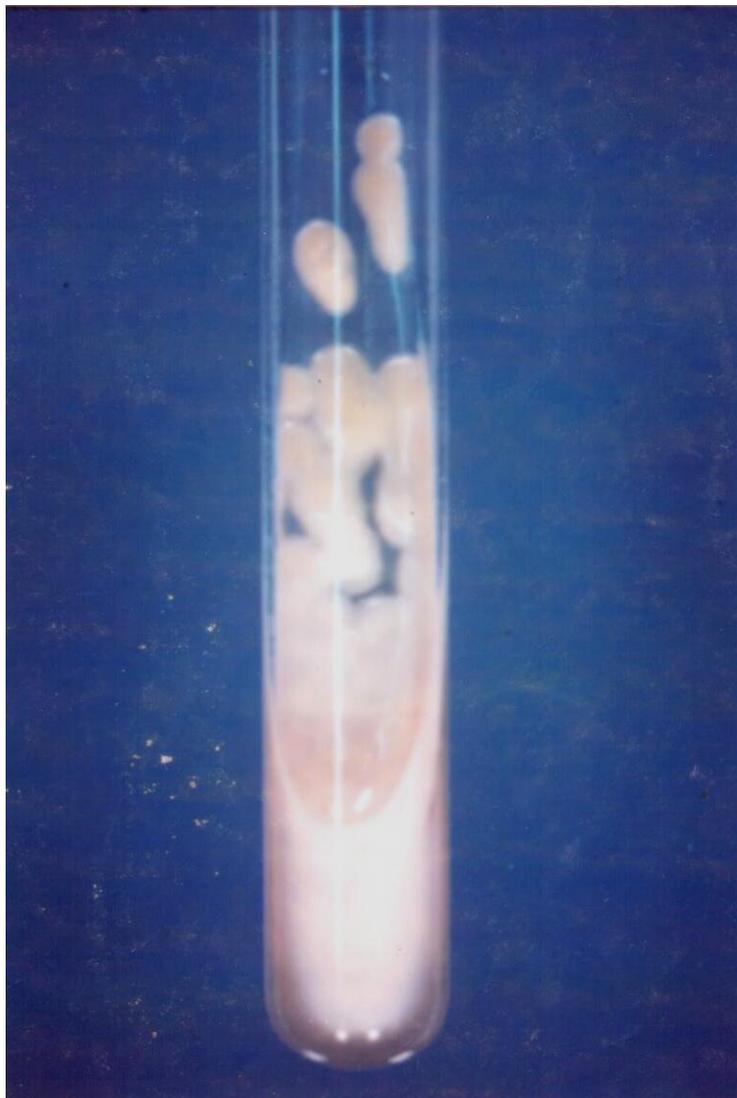
Fonte: SAME- HEC/FIOCRUZ/RJ

## ANEXO VIII

**Figura 1 A - Cultura de swab nasal em meio Níger do paciente n° 14 (BLG), evidenciando colônias fenol oxidase positivas, identificadas como *C. neoformans*.**

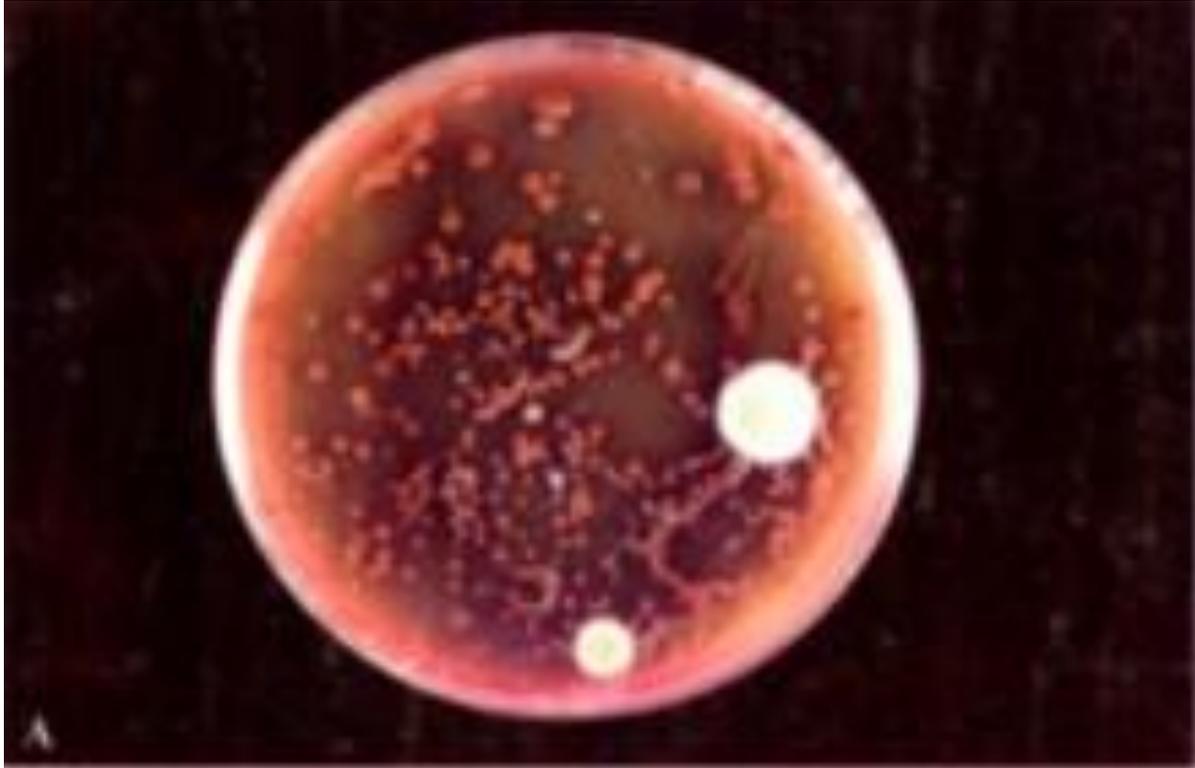


Figura 1 B Isolamento de *C. neoformans* do LCR do paciente nº 14 (BLG), em meio Sabouraud.

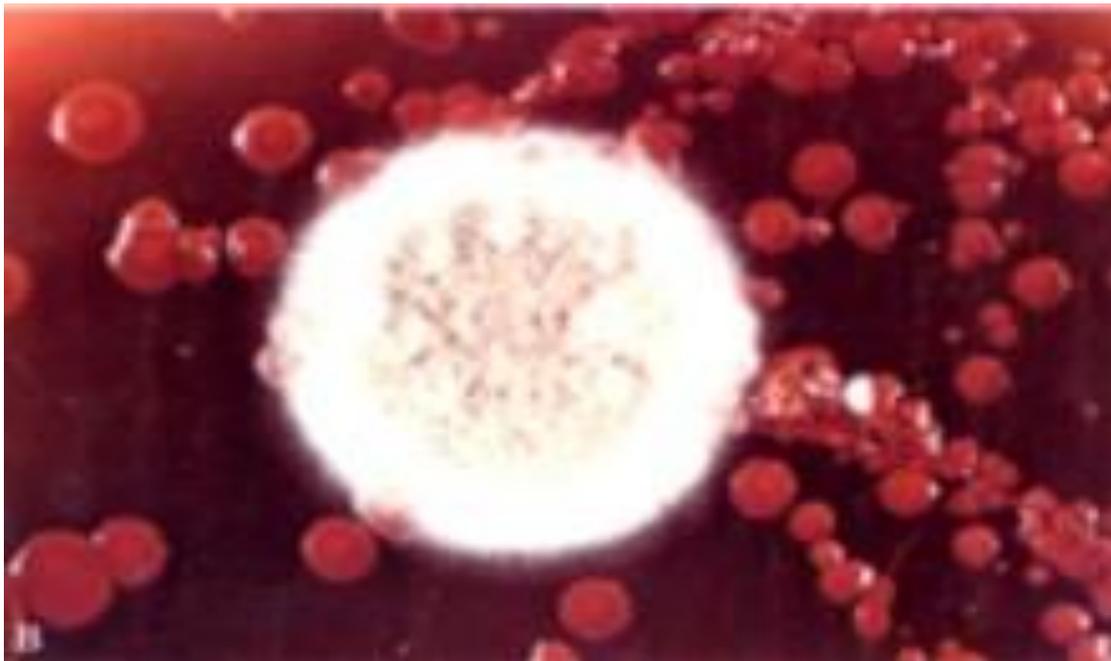


## ANEXO IX

**Figura 2 A** Cultura do escarro da paciente nº 97 em meio Níger, evidenciando inúmeras colônias fenol oxidase positiva. Identificadas posteriormente como *C. neoformans* var. *gatti*.

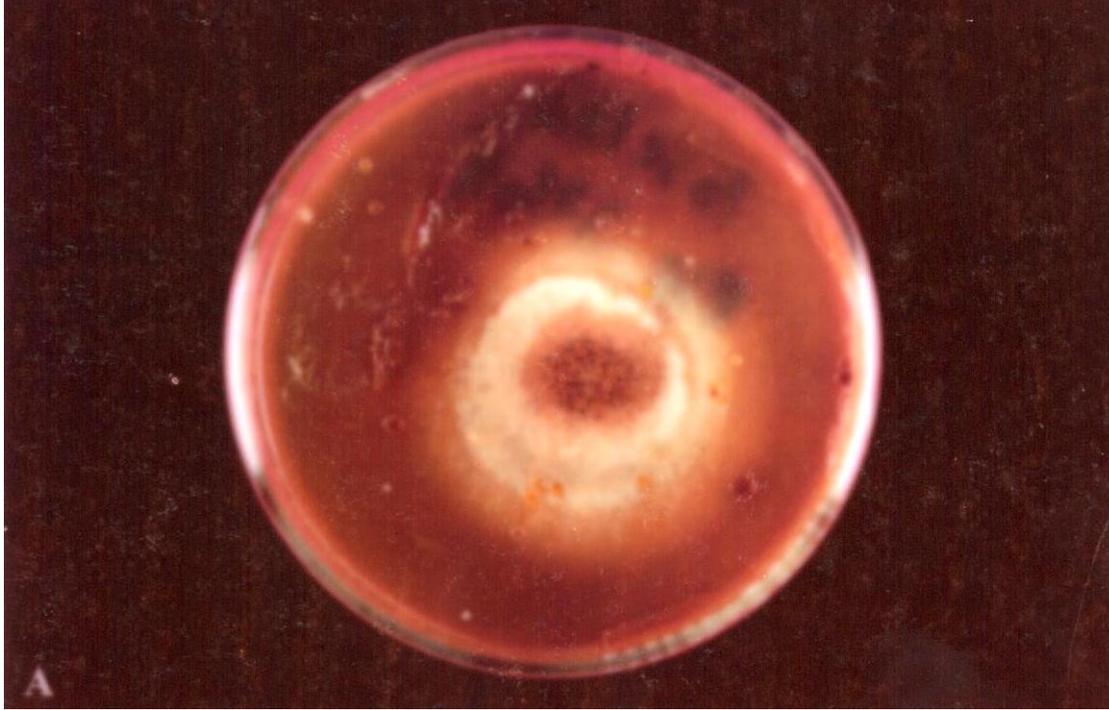


**Figura 2 B:** Detalhe da cultura do escarro da paciente nº 97, evidenciando colônias fenol oxidase positivas junto a fungo filamentoso.



## ANEXO X

**Figura 3 A:** Detalhe da cultura do escarro da paciente nº 97 em meio Níger, evidenciando inúmeras colônias fenol oxidase positiva. Identificadas posteriormente como *C. neofarmans* var. *gatti*.



**Figura 3 B:** Detalhe da cultura do escarro da paciente nº 97, evidenciando colônias fenol oxidase.

