

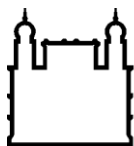
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO LEONIDAS E MARIA DEANE

Doutorado em Ciências – Cooperação IOC-ILMD  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical - PGM-T

CRÍPTOCOCOSE EM PACIENTES COM HIV/AIDS DIAGNOSTICADOS  
EM UNIDADE DE REFERÊNCIA NO AMAZONAS: GENÓTIPOS DE  
*CRYPTOCOCCUS* ENVOLVIDOS, CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-  
EPIDEMIOLÓGICAS DOS PACIENTES E AVALIAÇÃO DO AMBIENTE  
DOMICILIAR COMO FONTE DE INFECÇÃO

MARLA JALENE ALVES

Rio de Janeiro - RJ  
Maio de 2022



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE**  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical**

*MARLA JALENE ALVES*

Criptococose em pacientes com HIV/Aids diagnosticados em unidade de referência no Amazonas: genótipos de *Cryptococcus* envolvidos, características clínico-epidemiológicas dos pacientes e avaliação do ambiente domiciliar como fonte de infecção.

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Medicina Tropical

**Orientador (es):** Prof. Dr. Márcia dos Santos Lazera – IO/FIOCRUZ  
Prof. Dr. Ani Beatriz Jackisch Matsuura – ILMD/FIOCRUZ

**RIO DE JANEIRO**

**Maio de 2022**

Alves, Marla Jalene .

Criptococose em pacientes com HIV/Aids diagnosticados em unidade de referência no amazonas: genótipos de *Cryptococcus* envolvidos, características clínico-epidemiológicas dos pacientes e avaliação do ambiente domiciliar como fonte de infecção / Marla Jalene Alves. - Manaus, 2022.

99 f.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2022.

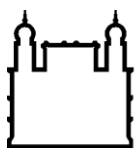
Orientadora: Marcia dos Santos Lazera.

Orientadora: Ani Beatriz Jackisch Matsuura.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. *Cryptococcus*. 2. Criptococose. 3. MLST. 4. Isolados ambientais. I. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/Icict/Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Igor Falce Dias de Lima - CRB-7/6930.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE**  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical**

**AUTOR: MARLA JALENE ALVES**

**CRÍPTOCOCOSE EM PACIENTES COM HIV/AIDS DIAGNOSTICADOS EM  
UNIDADE DE REFERÊNCIA NO AMAZONAS: GENÓTIPOS DE *CRYPTOCOCCUS*  
ENVOLVIDOS, CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICAS DOS  
PACIENTES E AVALIAÇÃO DO AMBIENTE DOMICILIAR COMO FONTE DE  
INFEÇÃO**

**ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Márcia dos Santos Lazera – IOC/FIOCRUZ**  
**Prof. Dr. Ani Beatriz Jackisch Matsuura – ILM/D/FIOCRUZ**

**Aprovada em: 18 \_\_\_ / 05 \_\_\_ / 2022 \_\_\_**

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dr. Marco Aurélio Pereira Horta - Presidente (IOC/FIOCRUZ)**  
**Prof. Dr. Ricardo Pereira Igreja - Membro titular (UFRJ)**  
**Prof. Dr. Andre Moraes Nicola - Membro titular (UNB)**  
**Prof. Dr. Mauro de Medeiros Muniz - Membro suplente (INI/FIOCRUZ)**  
**Prof. Dr. Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo - Membro suplente (UFPE)**

## **AGRADECIMENTOS**

*Meu mais sincero agradecimento a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização desse projeto.*

*A minha orientadora Dra. Ani Matsuura por ter acreditado em mim, pela amizade, paciência, apoio e dedicação sempre.*

*A minha orientadora Dra. Márcia Lazera que mesmo de forma remota sempre se fez presente, sendo atenciosa e prestativa durante todo o processo da execução da tese.*

*A Dra. Katia Cruz e toda a equipe do laboratório de micologia pela parceria, ajuda e disponibilização dos dados e isolados utilizados.*

*Ao Dr. João Vicente e Silviane Pinheiro pela parceria e auxílio.*

*A Dra. Luciana Trilles e Felipe Almeida por toda a instrução e atenção durante minha estadia no INI e orientação quanto a análise do MLST.*

*As minhas co-orientandas e amigas Izabella Sadalla e Victoria Menescal por toda a ajuda na execução do projeto e parceria.*

*A minha amiga Lizandra Menescal por todo o suporte durante o início do projeto, pelo carinho e suporte pessoal.*

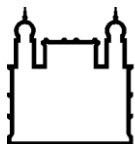
*A Maria Eduarda Grisolia pela amizade e pela ajuda sempre.*

*Aos meus divertidamente Clarice Goiabeira, Maria Julia Brandão, Dandara Brandão, Thaís Moreira, Carolina Maia, Claudia Nayara e Carlos de Oliveira por me darem força e tornarem minha rotina mais leve durante todo esse período.*

*Aos meus colegas do Doutorado pela parceria, especialmente Valdinete Alves, Emanuelle Farias e Victor Souza.*

*A minha família, especialmente a minha mãe que torna tudo sempre possível na minha vida.*

*A minha prima Agnes Arielle, minha maior perda durante esses últimos anos, mas que foi uma das minhas principais incentivadoras e sei que continua sendo onde quer que ela esteja.*



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE

**CRIPCOCOCOSE EM PACIENTES COM HIV/AIDS DIAGNOSTICADOS EM UNIDADE DE REFERÊNCIA NO AMAZONAS: GENÓTIPOS DE *CRYPTOCOCCUS* ENVOLVIDOS, CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICAS DOS PACIENTES E AVALIAÇÃO DO AMBIENTE DOMICILIAR COMO FONTE DE INFECÇÃO**

### RESUMO

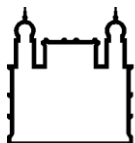
#### TESE DE DOUTORADO EM MEDICINA TROPICAL

Marla Jalene Alves

A criptococose é uma infecção grave que acomete principalmente indivíduos com HIV/Aids, predominando o quadro de meningite criptocócica e tendo o óbito como desfecho frequente. A infecção ocorre quando há exposição desses pacientes ao ambiente contaminado com propágulos infectantes do fungo. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar os agentes fúngicos da criptococose em pacientes com HIV/Aids atendidos em uma Unidade de Referência no Amazonas no período de 2017 a 2019 e investigar o ambiente domiciliar como fonte de exposição para a infecção/reinfecção de *Cryptococcus*. As características clínico-epidemiológicas foram analisadas através de revisão de prontuário. Foi realizada coleta ambiental de solo, excreta de pombos, poeira domiciliar e ar no domicílio dos pacientes com HIV/Aids e poeira domiciliar em dois domilios vizinhos para cada paciente. Os isolados clínicos e ambientais foram submetidos a análise micro e macromorfológica, Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (PCR-RFLP), Multi-locus sequence typing (MLST) e E-test. Foram analisadas as características clínico-epidemiológicas de 55 pacientes e caracterizados 75 isolados clínicos. No grupo de pacientes 98,2% (n = 54/55) apresentaram a neucryptococose, resultando em 38,1% (n = 21/55) óbitos, dos quais 21,8% (n = 12/55) tiveram óbito precoce, com menos de um mês após serem diagnosticados com criptococose. *C. neoformans* VNI (n = 68/75), foi o principal responsável pelos casos de criptococose, seguido de *C. gattii* VGII (n = 3/75), *C. gattii* VGI (n = 3/75) e *C. neoformans* VNB (n = 1/75). Infecção mista foi observada em dois pacientes, um por *C. neoformans* VNI e VNB e outro por *C. neoformans* VNI e *C. gattii* VGI. *C. neoformans* VNI foi detectado em três (n= 3/51) domicílios, sendo um de um paciente (n= 1/17) e dois domicílios vizinhos (n= 2/34). Trinta isolados de *C. neoformans*, correspondentes a 24 pacientes e os três isolados ambientais foram analisados por MLST e E-test. Foram identificados os subtipos moleculares (STs) 93 86,6% (n=26/30), ST5 6,6% (n=2/30), ST32 3,3% (n=1/30) e *C. neoformans* VNB com ST 232 3,3% (n=1/30).

Os isolados ambientais foram identificados como *C. neoformans* VNI com ST93 (n= 3/3). 96,6% (n= 29/30) isolados se mostraram sensíveis a Anfotericina B, mas houve variação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). 60% (n=18/30) apresentaram CIM acima dos ECVs propostos para um ou mais antifúngicos. Todos os isolados ambientais foram sensíveis aos antifúngicos testados. *C. gattii* VGI foi observado pela primeira vez no estado do Amazonas, assim como *C. neoformans* VNB. O MLST mostrou que há uma importante relação de *C. neoformans* VNI com ST93 com indivíduos com HIV/Aids, inclusive nos isolados ambientais analisados, mas esse ST não é exclusivo em associação a HIV/Aids na região. A Anfotericina B se mostrou o melhor medicamento de escolha para o tratamento da maioria dos pacientes. Além disso, a mortalidade observada reflete a importância do diagnóstico precoce, e evidencia a criptococose como doença definidora de AIDS e importante problema de saúde pública na região. O ambiente domiciliar mostrou-se uma fonte potencial de infecção/reinfecção por *C. neoformans* VNI com ST93.

Palavras-chave: *Cryptococcus*, Criptococose, MLST, isolados ambientais.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO/TESE (em inglês)

### ABSTRACT

#### TESE DE DOUTORADO EM MEDICINA TROPICAL

**Marla Jalene Alves**

Cryptococcosis is a serious infection that mainly affects individuals with HIV/AIDS, with a predominance of cryptococcal meningitis and death as a frequent outcome. Infection occurs when these patients are exposed to an environment contaminated with infective propagules of the fungus. The present study aimed to characterize the fungal agents of cryptococcosis in patients with HIV/AIDS treated at a Reference Unit in Amazonas from 2017 to 2019 and to investigate the household environment as a source of exposure for *Cryptococcus* infection/reinfection. The clinical-epidemiological characteristics were analyzed through a review of medical records. Environmental collection of soil, pigeon excreta, household dust and air was carried out in the residences of HIV/AIDS patients and household dust in two neighboring households for each patient. Clinical and environmental isolates were submitted to micro and macromorphological analysis, Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP), Multi-locus sequence typing (MLST) and E-test. The clinical-epidemiological characteristics of 55 patients were analyzed and 75 clinical isolates were characterized. In the group of patients, 98.2% (n = 54/55) had neurocryptococcosis resulting in 38.1% (n = 21/55) deaths, of which 21.8% (n = 12/55) died early, less than a month after being diagnosed with cryptococcosis. *C. neoformans* VNI (n = 68/75) was the main responsible for cases of cryptococcosis, followed by *C. gattii* VGII (n = 3/75), *C. gattii* VGI (n = 3/75) and *C. neoformans* VNB (n = 1/75). Mixed infection was observed in two patients, one with *C. neoformans* VNI and VNB and the other with *C. neoformans* VNI and *C. gattii* VGI. *C. neoformans* VNI was detected in three (n=3/51) residences, one of a patient (n=1/17) and two neighboring households (n=2/34). Thirty *C. neoformans* isolates, corresponding to 24 patients and the three environmental isolates were analysed by MLST and E-test. Sequence types (STs) 93 86.6%



(n=26/30), ST5 6.6% (n=2/30), ST32 3.3% (n=1/30) and *C. neoformans* VNB with ST 232 were identified. 3.3% (n=1/30). Environmental isolates were identified as *C. neoformans* VNI with ST93 (n=3/3). 96.6% (n= 29/30) isolates were sensitive to Amphotericin B, but there was variation in Minimum Inhibitory Concentration (MIC). 60% (n=18/30) had MICs above the proposed ECVs for one or more antifungals. All environmental isolates were sensitive to the tested antifungals. *C. gattii* VGI was observed for the first time in the state of Amazonas, as well as *C. neoformans* VNB. The MLST showed that there is an important relationship of *C. neoformans* VNI with ST93 with individuals with HIV/AIDS, including in the environmental isolates analyzed, but this ST is not unique in association with HIV/AIDS in the region. Amphotericin B proved to be the best drug of choice for the treatment of most patients. In addition, the observed mortality reflects the importance of early diagnosis, and highlights cryptococcosis as an AIDS-defining disease and an important public health problem in the region. The household environment proved to be a potential source of infection/reinfection by *C. neoformans* VNI with ST93.

Keywords: *Cryptococcus*, Cryptococcosis, MLST, environmental isolates

## ÍNDICE

RESUMO .....	vi
ABSTRACT .....	viii
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
1.1 Agentes da criptococose .....	15
1.2 A criptococose e suas formas clínicas .....	21
1.3 Criptococose: epidemiologia e associação com a Síndrome da Imunodeficiência Humana - Aids .....	22
1.4 Fontes ambientais da criptococose .....	25
1.5 Diagnostico da criptococose .....	28
1.6 Tratamento da criptococose .....	33
<b>2. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>36</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>37</b>
3.1 Objetivo Geral .....	37
3.2 Objetivos específicos .....	37
<b>4. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS .....</b>	<b>38</b>
<b>5. CAPÍTULO 1: Criptococose em pacientes com HIV/AIDS no norte do Brasil: aspectos clínicos, tipos moleculares e isolamento de agentes de amostras ambientais associadas a pacientes .....</b>	<b>39</b>
<b>6. CAPÍTULO 2: Suscetibilidade antifúngica e MLST do complexo <i>C. neoformans</i> de pacientes com meningite criptocócica associada ao HIV em Manaus, Amazonas- Brasil .....</b>	<b>35</b>
<b>7. DISCUSSÃO .....</b>	<b>51</b>
<b>8. CONCLUSÕES .....</b>	<b>54</b>
<b>9. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>55</b>
<b>10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....</b>	<b>56</b>
<b>11. ANEXOS .....</b>	<b>66</b>
<b>12. APÊNDICE A: ARTIGO 1: <i>Cryptococcal meningitis in non-HIV patients in the State of Amazonas, Northern Brazil.</i> .....</b>	<b>71</b>
<b>13. APÊNDICE A: ARTIGO 2: <i>New ST623 of Cryptococcus neoformans isolated from a patient with non-Hodgkin's lymphoma in the Brazilian Amazon.</i> .....</b>	<b>89</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Agentes da criptococose, complexo <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> , sorotipos e tipos moleculares.....	16
--	----

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Rota da infecção causada por <i>Cryptococcus neoformans</i> .....	18
Figura 2. Célula de <i>Cryptococcus</i> sp. e seus fatores de virulência.....	20
Figura 3. Migração do <i>Cryptococcus</i> sp. para o SNC através da parede hematoencefálica.....	20
Figura 4. Incidência anual da meningite criptocócica por país no ano de 2014.....	23
Figura 5. Micromorfologia de <i>Cryptococcus</i> sp. em tinta nanquin, macromorfologia em em agar semente de niger (NSA) e diferenciação em meio ágar canavanina-glicina-azul e bromotimol (CGB).....	29
Figura 6. Ilustração da identificação histopatológica feita através das técnicas histoquímicas, Hematoxilina-eosina (H&E) e Gomori-Grocott (GMS), Mucicarmim de Mayer (MM) e Fontana-Masson (FM).....	30
Figura 7. Cryptococcal Antigen Lateral Flow Assay (CRAG-LFA).....	31

## LISTA DE SIGLAS, ABREVIACÕES E SÍMBOLO

Aids	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
AFLP	Polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado
AM	Amazonas
AMB	Anfotericina B
BHI	Infusão Cérebro-Coração
CAP59	Cápsula mucopolissacarídica
CGB	Canavanina-glicina-azul e bromotimol
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
CRAG-LA	Teste de aglutinação de látex
CRAG-LFA	Cryptococcal Antigen Lateral Flow Assay
<i>C. neoformans</i> / CN	<i>Cryptococcus neoformans</i>
<i>C. gattii</i> / CG	<i>Cryptococcus gattii</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECVs	Valores de corte epidemiológicos
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
FCZ	Fluconazol
FM	Fontana-Masson
FMT	Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado
GalXM	Galactoxilomanano
GMS	Gomori-Grocott
GPD1	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
HAART	Highly active antiretroviral therapy
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
H&E	Hematoxilina-eosina
IGS1	Espaçador intergênico do RNA ribossômico
ISHAM	Sociedade Internacional de Micoses Humanas e Animais
kg	kilograma
LAC1	Gene associado a lacase
LCR	Líquido cefalorraquidiano

MATa	Mating Type alfa
MAT $\alpha$	Mating type $\alpha$
mg	Miligrama
MLST	Multi-locus sequence typing
MM	Mucicarmim de Mayer
MOPS	Ácido 3NMorfolinopropanossulfônico
NaCL	Cloreto de sódio
NSA	Semente de Niger
pH	Potencial hidrogeniônico
PLB1	Gene associado à fosfolipase B1
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RFLP	Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição
SNC	Sistema Nervoso Central
STs	Sequence types / subtipos moleculares
SOD1	Gene associado à cobre-zinco superóxido dismutase
TARV	Terapia anti-retroviral
T CD4	Linfócitos TCD4
URA5	Orotidina-monofosfato pirofosforilase
WHO	World Health Organization
XGM	Glucuronoxilomanano
5-FC	5-Fluocitosina / Flucitosina

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Agentes da criptococose

Sanfelice et al. (1894) <sup>(1)</sup> relatou o isolamento de uma levedura semelhante a *Saccharomyces* em suco de pêssago, denominando essa levedura de *Saccharomyces neoformans*. Já em 1901, Jean-Paul Vuillemin deu o nome de *Cryptococcus neoformans*, porque diferentemente do gênero *Saccharomyces* esta levedura não produzia ascósporos e fermentação de açúcar <sup>(2)</sup>. Em 1905 houve o primeiro relato de meningite criptocócica <sup>(3)</sup>. No final do século 19 *C. neoformans* foi identificado pela primeira vez como um patógeno humano, mas uma causa incomum de doença humana <sup>(4)</sup>. A criptococose foi considerada uma infecção rara até 1970. Conforme o aumento das populações vulneráveis, na década de 1980, especialmente relacionada a infecção do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), a criptococose se tornou uma infecção de importância global <sup>(4,5)</sup>. Na década de 1990, *C. gattii* se estabeleceu como um agente etiológico da criptococose na Colúmbia Britânica, Canadá e, posteriormente, no noroeste do Pacífico dos Estados Unidos <sup>(6)</sup>.

Anteriormente os agentes da criptococose eram classificados em *C. neoformans* variedade *neoformans* (sorotipos A, D e AD) e *C. neoformans* variedade *gattii* (sorotipos B e C), cuja fase teleomórfica é *Filobasidiella neoformans* e *Filobasidiella bacillispora* <sup>(7)</sup>.

Na classificação taxonômica atual, os agentes da criptococose estão inseridos no filo *Basidiomycota*, classe dos *Tremellomycetes*, ordem *Tremellales*, família *Tremellaceae*, gênero *Cryptococcus* <sup>(5)</sup>. A criptococose tem como agentes principais *Cryptococcus neoformans* (*C. neoformans*) e *Cryptococcus gattii* (*C. gattii*), que em virtude da diversidade genética passaram a ser considerados complexos de espécies. *C. neoformans* inclui os sorotipos A e D e *C. gattii* inclui os sorotipos B e C (tabela 1). *C. neoformans* possui os tipos moleculares VNI, VNII, VNIII e VNIV <sup>(8)</sup>, e mais

atualmente o tipo VNB <sup>(9)</sup>. Já *C. gattii* possui os tipos moleculares VGI, VGII, VGIII, VGIV <sup>(8)</sup>, e os recém-identificados VGV e VGVI <sup>(10)</sup>.

Recentemente, Hagen et al. (2015) <sup>(11)</sup>, com base na análise filogenética de 115 isolados, propuseram uma nova nomenclatura, na qual *C. neoformans* var. *grubii* e *C. neoformans* var. *neoformans* se apresentam como espécies separadas, além de cinco espécies dentro de *C. gattii* (*Cryptococcus gattii*, *Cryptococcus bacillisporus*, *Cryptococcus deuterogattii*, *Cryptococcus tetragattii* e *Cryptococcus decagattii*). No entanto, de acordo com Kwon-Chung et al. (2017) <sup>(8)</sup>, apesar deste estudo contribuir a respeito da diversidade genética e estrutura populacional de agentes da criptococose, essa nomenclatura ainda é considerada prematura, pois genótipos publicados de 2.606 cepas já revelaram maior diversidade, então nomear cada clade como uma espécie pode gerar uma instabilidade nomenclatural contínua.

Tabela 1. Agentes da criptococose, complexo *C. neoformans* e *C. gattii*, sorotipos e tipos moleculares.

<b>COMPLEXO CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS</b>					
<b>Espécie</b>	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>			AD híbrido	<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>
<b>Sorotipo</b>	A			AD	D
<b>Gnotipagem por PCR-RFLP do gene URA5</b>	VNI	VNB	VNII	VNIII	VNIV
<b>Nomenclatura proposta por Hagen et al. (2015)</b>	<i>C. neoformans</i>			<i>C. neoformans</i> / <i>C. deneoformans</i> híbrido	<i>C. deneoformans</i>
<b>COMPLEXO CRYPTOCOCCUS GATTII</b>					
<b>Espécie</b>	<i>Cryptococcus gattii</i>				
<b>Sorotipo</b>	A/C				
<b>Gnotipagem por PCR-RFLP do gene URA5</b>	VGI	VGII	VGIII	VGIV	
<b>Nomenclatura proposta por Hagen et al. (2015) <sup>(11)</sup></b>	<i>C. gattii</i>	<i>C. deuterogattii</i>	<i>C. bacillisporus</i>	<i>C. tetragattii</i>	VGIV/VGIII - <i>C. decagattii</i>

Os tipos moleculares VGV e VGVI não estão incluídos nesta tabela.



Um estudo realizado por Litvintseva et al. (2011) <sup>(12)</sup> apresenta evidências de que *C. neoformans* pode ter geneticamente evoluído de uma população diversificada no Sul da África e que algumas dessas linhagens foram globalmente dispersas pela migração de pombos selvagens (*Columbia livia*), usados como reservatório ambiental do fungo. Já *C. gattii* tem origens a partir da Austrália e da América do Sul <sup>(13)</sup>.

As células criptocócicas tem dois tipos de acasalamentos possíveis, MATa e MAT $\alpha$  <sup>(14,15)</sup>. As células MAT $\alpha$  parecem ser mais virulentas que as células MATa. A esporulação pode ocorrer de forma sexuada e assexuada. Na reprodução sexuada o estado teleomórfico é formado <sup>(15)</sup>. *C. neoformans* e *C. gattii* são tidos como anamorfos (assexuados) <sup>(7)</sup>. Apesar da morfologia primária de *C. neoformans* ser de levedura em brotamento, os esporos são exclusivamente formados a partir da fase hifa. Mas embora haja a fase de hifa e a fase leveduriforme, a fase de hifa raramente é observada em tecido e o *Cryptococcus* não é considerado um fungo dimórfico <sup>(16)</sup>.

A infecção é adquirida pela inalação de propágulos infectantes a partir de uma fonte ambiental presente na natureza <sup>(17)</sup>, como pode ser observado na figura 1. Pode ocorrer a infecção na primeira infância e exposição frequente ao fungo em determinado ambiente. Esta infecção pode ser controlada por resposta imune do hospedeiro sem a apresentação de sintomas, e o *Cryptococcus* pode entrar em estado latente no pulmão, mas deficiências imunológicas podem levar a disseminação da infecção <sup>(18)</sup>. A disseminação pode ocorrer por via hematogênica podendo acometer órgãos como a pele, linfonodos, ossos e principalmente o Sistema Nervoso Central (SNC) <sup>(19)</sup>.

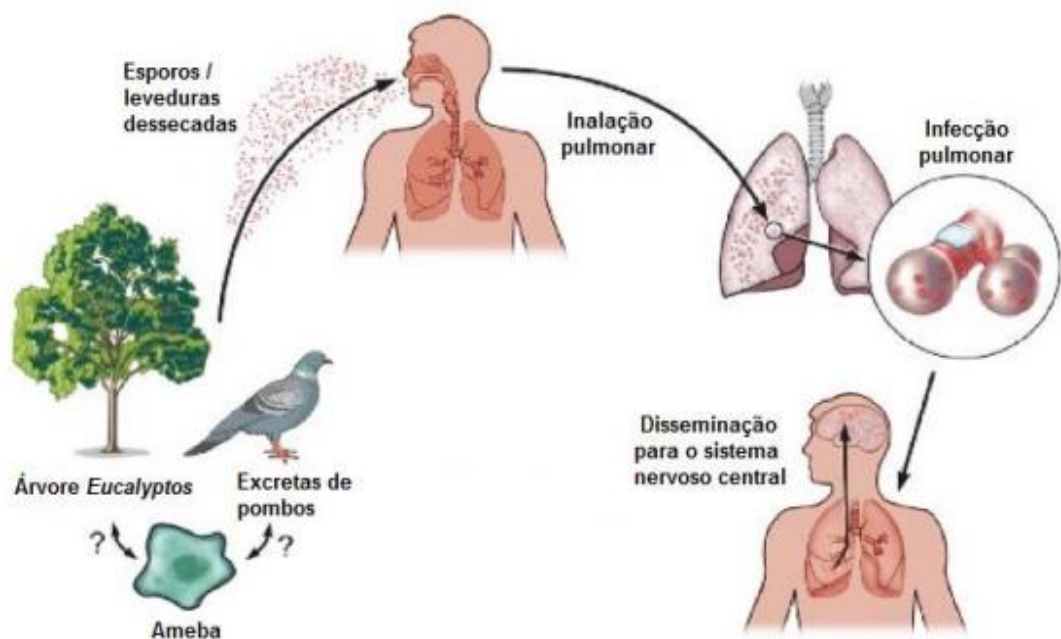


Figura 1. Rota da infecção causada por *Cryptococcus neoformans*. Fonte: Grodsky J. Generation of intersectin homolog Cin1 isoform-specific mutants in pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. Tulane Undergraduate Research Journal. 2014; 1.

*C. neoformans* é considerado um fungo patogênico oportunista por estar relacionado a infecção em indivíduos com algum tipo de comprometimento imune, em particular pessoas vivendo com HIV, enquanto *C. gattii* é considerado patógeno primário de populações imunocompetentes <sup>(20)</sup>. A interação entre o fungo e o sistema imunológico são determinantes para o desfecho da infecção. *C. neoformans* e *C. gattii* possuem características que facilitam sua interação e adaptação no hospedeiro, tal como interações com células fagocíticas que facilitam a sobrevivência intracelular, disseminação para o sistema nervoso central (SNC) e fuga e adaptações morfológicas e genômicas. *C. neoformans* desenvolveu mecanismos que facilitam sua adaptação ao nicho celular e neutralizar a resposta imune do hospedeiro, assim como a ação de antifúngicos <sup>(18)</sup>.

A termotolerância, os componentes da parede celular e da cápsula, a capacidade de adesão, os receptores de hormônios e a produção de enzimas são importantes fatores de virulência <sup>(21)</sup>. A célula fúngica é envolta de polissacarídeos composto de glucuronoxilomanano (GXM) e galactoxilomanano (GalXM) e contribui

na patogenicidade do fungo <sup>(20)</sup>. Os polissacarídeos da cápsula com sua capacidade antigênica conseguem inibir a fagocitose, consumir complemento e bloquear a quimiotaxia de neutrófilos e monócitos <sup>(19)</sup>.

Há genes essenciais para a formação da cápsula, sendo alguns desses o CAP59, CAP64, CAP60 e CAP10, no entanto ainda não se sabe o papel desses genes na síntese, montagem e secreção da cápsula. O CAP59 foi o primeiro gene associado ao fenótipo de virulência da cápsula e encontra-se presente em todas as variedades de *C. neoformans* <sup>(22)</sup>. Leveduras acapsuladas também podem causar a doença em indivíduos com sistema imune mais debilitado, no entanto linhagens capsuladas podem induzir uma resposta mais significativa no pulmão e disseminar mais facilmente ao cérebro <sup>(23)</sup>.

A produção de fenoloxidade é outro fator patogênico. A Melanina, um polímero marrom ou preto depositado na parede celular do fungo é resultante da atividade catalítica da enzima lacase em substratos como a L-dopamina <sup>(20)</sup>. A melanina pode proteger o fungo de radicais livres tóxicos produzidos pelo sistema imune do hospedeiro <sup>(24)</sup>.

A enzima fosfolipase B (Plb1) facilita a introdução do fungo no tecido pulmonar do hospedeiro, contribuindo com a disseminação hematogênica. A lacase media a integridade da parede celular, enquanto a uréase potencializa a invasão do fungo no SNC ao catalisar a formação de amônia a partir da ureia <sup>(25)</sup>. Os fatores de virulência do *Cryptococcus* podem ser observados na figura 2.

A disseminação das células fungicas para a corrente sanguínea e a invasão pela barreira hematoencefálica para atingir o SNC são as etapas principais para a ocorrência da meningite criptocócica <sup>(26)</sup>.

A barreira hematoencefálica (figura 3) mantém o microambiente neural regulando possíveis atrações dos níveis de moléculas no sangue e protege o cérebro contra toxinas e microrganismos circulando no sangue, que podem cruzar essa barreira transcelularmente (por endocitose direta de células endoteliais microvasculares cerebrais sem interrupção da junção apertada intercelular), paracelularmente (penetrando entre as células de barreira através da junção apertada solta podendo ou não levar a ruptura da junção apertada) e/ou em fagócitos infectados

(mecanismo de cavalo de Tróia: ocorre a penetração microbiana fagocitária das células de barreira usando transmigração dentro de fagócitos infectados) (26).

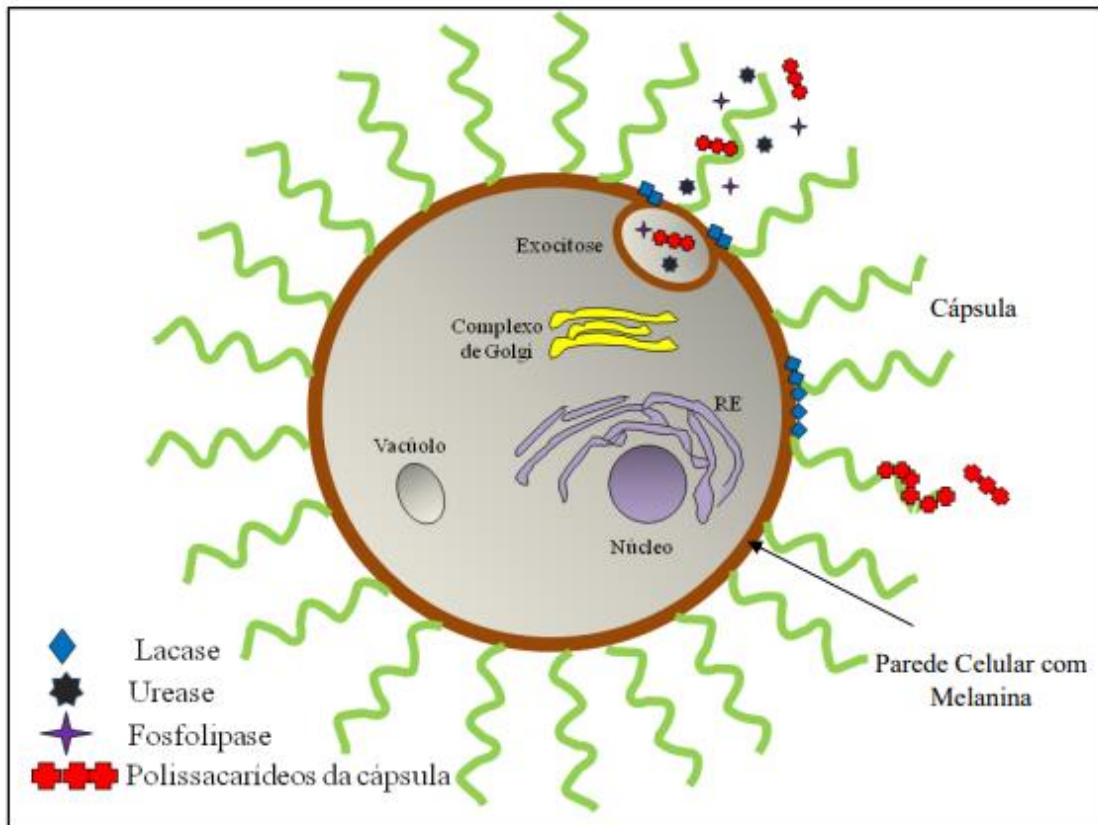


Figura 2. Célula de *Cryptococcus* sp. e seus fatores de virulência. Fonte: Krosntad et al. (2011) (20), adaptado por Pinheiro SB. Aspectos clínicos e moleculares da criptococose em pacientes não HIV no Estado do Amazonas, Brasil. 2019. Dissertação de Mestrado (Ciências farmacêuticas).

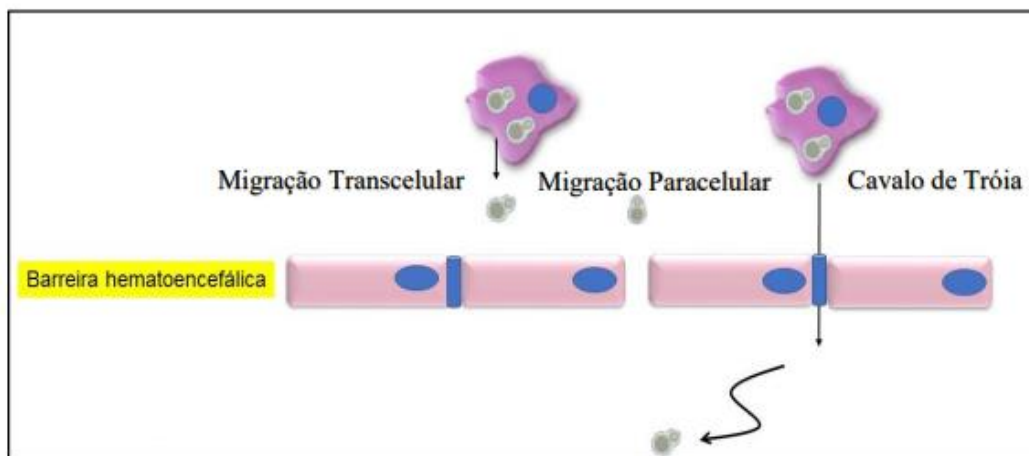


Figura 3. Migração do *Cryptococcus* sp. para o SNC através da parede hematoencefálica. Fonte: Liu, Perlin & Xue (2012) (26), adaptado por Pinheiro SB. Aspectos clínicos e

## 1.2 A criptococose e suas formas clínicas

A Criptococose é uma infecção fungica causada por fungos do complexo *C. neoformans* e *C. gattii*, cuja porta de entrada ao organismo do hospedeiro é inalatória. Do ponto de vista clínico e epidemiológico a criptococose se apresenta de forma oportunista em indivíduos com comprometimento imune, sendo cosmopolita e causada por *C. neoformans*, já a forma primária em indivíduos imunocompetentes, que é endêmica em áreas tropicais e subtropicais tem como agente etiológico o *C. gattii* <sup>(27)</sup>. Apesar da disponibilidade antifúngica, a letalidade relacionada a criptococose é alta. Em casos de pacientes refratários ou com recidivas frequentemente ocorrem sequelas neurológicas <sup>(28)</sup>.

A criptococose pulmonar pode se apresentar de forma assintomática a pneumonia grave com insuficiência respiratória <sup>(29)</sup>. O comprometimento pulmonar afeta principalmente indivíduos imunocomprometidos, mas tem sido cada vez mais observado em indivíduos imunocompetentes <sup>(30)</sup> e é a segunda forma mais frequente de criptococose <sup>(27)</sup>. Devido a limitação no diagnóstico, esta infecção ainda pode ser subdiagnosticada por se assemelhar a outras infecções pulmonares, como tuberculose pulmonar e pneumonia bacteriana <sup>(30)</sup> e outras infecções fúngicas tal qual a histoplasnose. Frequentemente ocorre a infecção subpleural assintomática em virtude do tamanho dos propágulos, basidiósporos depositados nos alvéolos pulmonares <sup>(27)</sup>.

Em hospedeiros com comprometimento imune pode se observar várias anormalidades radiológicas, como nódulos simples ou múltiplos que podem evoluir para consolidação segmentar, broncopneumonia bilateral, derrame pleural e linfonodomegalias <sup>(31)</sup>.

A meningite criptocócica é a infecção fúngica mais comum que acomete o Sistema Nervoso Central (SNC) estando associada principalmente com pacientes

com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Aids) <sup>(32)</sup>. O início da infecção tem curso lento com sintomas de aumento da pressão intracraniana <sup>(33)</sup>. A meningite criptocócica deve ser sempre considerada em indivíduos com Aids que apresentam quadro de cefaléia e febre sem causas aparentes, demência progressiva e confusão mental. A meningite criptocócica pode evoluir com sequelas e déficits neurológicos, sendo a redução da capacidade mental e visual, paralisia permanente de nervos cranianos e hidrocefalia as mais frequentes <sup>(27)</sup>. A predileção do fungo pelo SNC ocorre pela presença de nutrientes como tiamina, glutamina, carboidratos, e pela baixa resposta inflamatória e baixa atuação do sistema complemento <sup>(34)</sup>.

A lesão tumoral ou criptococoma se manifesta na encefalite e se caracteriza pela formação de uma massa intracraniana de células leveduriformes aparecendo mais comumente nos gânglios, cerebelo, lobo parietal e mais raramente aparece na área intra-espinhal <sup>(35)</sup>. São fatores associados a um pior prognóstico da meningite criptocócica: carga fungica elevada, alterações sensoriais, ausência de resposta inflamatória no LCR, manifestações clínicas fora do SNC, imunocomprometido crítico ( $CD4+ < 50 \text{ cels/mm}^3$ ) <sup>(27)</sup>.

A criptococose também pode se disseminar para outros órgãos, como a medula espinhal, pele, rins, próstata, fígado e ossos <sup>(36)</sup>. A lesão cutânea ocorre de 10 a 15% dos casos de criptococose sistêmica <sup>(19)</sup>. A criptococose cutânea geralmente é secundária e está associada a disseminação hematogênica, caracterizando-se por lesões cutâneas confinadas a uma determinada região do corpo <sup>(37)</sup>, como rosto, pescoço e extremidades superiores, com lesões nodulares, granulomatosas, ulcerações com prurido e dor <sup>(38)</sup>.

### **1.3 Criptococose: epidemiologia e associação com a Síndrome da Imunodeficiência Humana - Aids**

A criptococose é considerada uma doença definidora de Aids por estar associada a baixas contagens de linfócitos T CD4 no sangue (abaixo de 100 células) <sup>(39,40)</sup>. A infecção pelo HIV é mundialmente a mais importante doença de base

responsável pelo desenvolvimento da criptococose, estando envolvida em 80-90% dos casos. A meningite criptocócica é a principal forma observada em indivíduos com Aids <sup>(41)</sup>. Em 2014 a incidência anual global da meningite criptocócica foi estimada em 223,100 (95% CI 150 600–282 400) casos sendo responsável por 15% de todas as mortes relacionadas à Aids (IC 95% 10–19). Depois da tuberculose, a criptococose é classificada como a segunda principal causa de mortes associadas a Aids em adultos <sup>(42)</sup>.

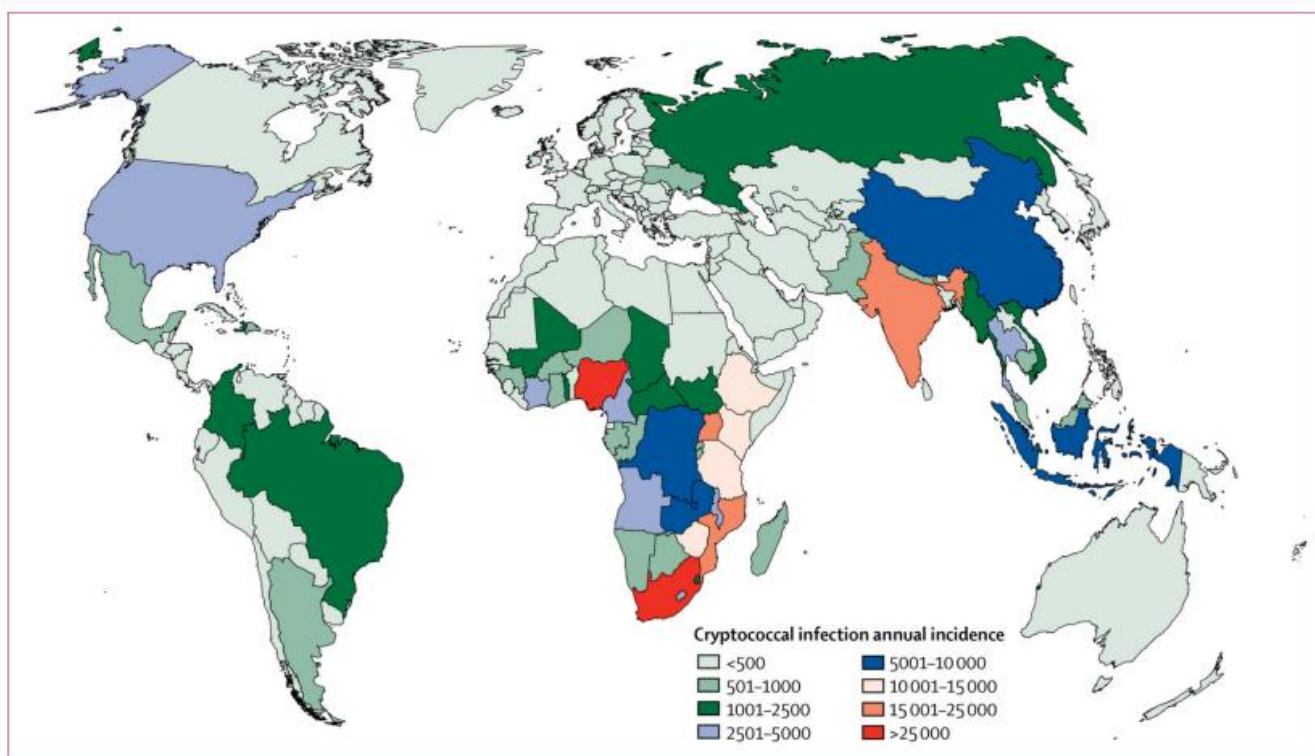


Figura 4. Incidência anual da meningite criptocócica por país no ano de 2014. Fonte: Rajasingham et al. (2017) <sup>(42)</sup>.

*C. neoformans* tem distribuição global e *C. gattii* é mais encontrado na América, Austrália e África Subsaariana <sup>(43)</sup>. Em todo o mundo o tipo molecular VNI é dominante, com exceção da Austrália e Nova Guiné onde o VGI é mais observado <sup>(45)</sup>. Na África subsaariana, a meningite criptocócica é uma infecção subdiagnosticada que afeta principalmente indivíduos com HIV/Aids jovens do sexo masculino, representando 75% das mortes pela doença no mundo <sup>(44,45)</sup>. Infecções por *C. gattii* são pouco comuns. Na África Ocidental, na Costa do Marfim, e na África do Sul o tipo molecular VGIV é o mais observado <sup>(45)</sup>.

Na China as infecções por *C. gattii* também são mais raras, mas VGI é o principal tipo molecular <sup>(46)</sup>. Na China a maioria dos relatos de criptococose estão associados a pacientes imunocompetentes <sup>(43)</sup>. No Japão e na Coreia a população de indivíduos infectados pelo HIV é menor em relação a outros países, e *C. neoformans* VNI com ST5 é o mais observado, assim como na China <sup>(47,48)</sup>.

Em Madagascar, a criptococose em indivíduos com HIV costuma ser fatal <sup>(49)</sup>. Na Europa, *C. neoformans* é predominantemente encontrado na Europa Ocidental <sup>(50)</sup>. A Columbia Britânica, Canadá, tem a maior população com infecção por *C. gattii* no mundo, incluindo um pequeno número de casos associados ao HIV <sup>(51)</sup>.

Nos Estados Unidos e em outros países desenvolvidos a criptococose em indivíduos com HIV/Aids reduziu por causa da disponibilidade antirretroviral de alta atividade, e a letalidade chegou a 12% <sup>(44)</sup>. Isso se deve principalmente ao início precoce da Terapia anti-retroviral (TARV). No entanto ainda há uma preocupação relacionada a criptocose no país <sup>(52)</sup>.

Em países latino-americanos, assim como ocorre no mundo todo, *C. neoformans* é responsável por mais de 90% dos casos de criptococose, acometendo principalmente indivíduos com HIV. Na Colômbia, na população infectada pelo HIV, a criptococose é estimada em 3.000-3.300 casos por 1 milhão de habitantes. Na Colômbia a prevalência de *C. gattii* VGII e VGI é semelhante, já no México VGIII é o tipo molecular mais isolado, depois de *C. neoformans* VNI. Na Argentina e no Brasil, apenas *C. gattii* VGIV parece estar ausente <sup>(53)</sup>. O *C. neoformans* VNI com subtipo molecular (ST) 93 é o subgenótipo mais prevalente em toda a América Latina, seguido do ST77, ST2, ST5 e ST23 <sup>(54)</sup>.

A criptococose é a infecção sistêmica que mais acomete indivíduos imunocomprometidos no Brasil <sup>(55)</sup>. A criptococose associada a AIDS apresenta-se como primeira infecção oportunista em 4,4% dos casos diagnosticados no Brasil. São estimados 1,000,000 casos e 250,000 mortes anualmente <sup>(56)</sup>. Trilles et al. (2008) <sup>(57)</sup> realizaram um estudo multicêntrico, analisando a distribuição dos tipos moleculares de *C. neoformans* e *C. gattii* nas regiões brasileiras por meio de AFLP e PCR RFLP do gene URA5. Foram analisados 443 isolados, observando-se todos os principais tipos moleculares já identificados, com exceção do VGIV. Este foi o primeiro relato da presença dos tipos moleculares VNI e VGII no estado do Amazonas. Já em um



trabalho realizado em Porto Alegre, no sul do Brasil, foi observada maior predominância do tipo molecular VNII em pacientes HIV positivos com meningite criptocócica <sup>(58)</sup>.

No Amazonas, a criptococose é prevalente em indivíduos com HIV sendo relacionada principalmente a *C. neoformans* VNI. *C. gattii* VGII é o principal responsável pela criptococose em pacientes imunocompetentes, mas também é o tipo molecular de *C. gattii* mais identificado nos pacientes com HIV/Aids <sup>(59-61)</sup>. *C. neoformans* VNII também foi observado em Manaus-AM por Freire et al. (2012) <sup>(59)</sup>.

Souto et al. (2016) <sup>(62)</sup> ao realizarem uma investigação multicêntrica com a caracterização do ST de 145 isolados de origem clínica e ambiental em 8 estados, incluindo o Amazonas, observaram diversidade genética, principalmente na região nordeste. Os Sts 40, 20 e 5 foram os mais prevalentes. Este estudo foi o primeiro a realizar a subtipagem de isolados clínicos de VGII no Amazonas. Ferreira-Paim et al. (2017) <sup>(63)</sup>, em Minas gerais, observaram maior prevalência do ST93 e ST77.

Com o panorama de distribuição mundial dos tipos moleculares, a diferença na diversidade genotípica entre os continentes tornou-se evidente, demonstrando que as diferentes condições ambientais e climáticas podem influenciar na biologia, evolução e mecanismos de dispersão desses fungos possibilitando a seleção e estabelecimento de espécies mais bem adaptadas a essas condições <sup>(64)</sup>.

#### 1.4 Fontes ambientais da criptococose

*C. neoformans* e *C. gattii* apresentam diferentes distribuições geográficas e nichos ambientais, enquanto *C. neoformans* tem distribuição mundial e frequentemente é isolado de excretas de pombos, *C. gattii* é mais relatado em regiões tropicais e subtropicais, sendo mais observado em árvores e madeira em decomposição <sup>(46,66)</sup>.

Na África Ocidental a origem ambiental das espécies de *Cryptococcus* foi especialmente a partir de excrementos de pombos <sup>(66)</sup>. Nweze et al. (2015) <sup>(67)</sup>, realizou a primeira triagem em larga escala de *C. neoformans* em excretas de pombos

na Nigéria observando isolados principalmente em pombais e mercados com presença de pombos. Outro reservatório de *C. neoformans* foi identificado na África do Sul, a árvore mopan (*Colophospermum mopane*), que na economia local contribui como fonte de madeira e remédios <sup>(12)</sup>. Na África do Sul *C. neoformans* foi isolado de árvore <sup>(31)</sup>. No Brasil, *C. neoformans* VNB foi identificado em isolados ambientais por Andrade-Silva et al. (2018) <sup>(68)</sup>.

As novas linhagens de *C. gattii* VGV e VGVII, identificadas por Farrer et al. (2019) <sup>(10)</sup>, foram provenientes de ambientes como montanhas e oco de árvores, associados a um pequeno mamífero chamado hyrax Africano, em florestas centrais de Miombo da Zâmbia, na África.

Samarasinghe et al. (2019) <sup>(69)</sup>, isolaram *C. neoformans* VNIV pela primeira vez, em clima desértico, na Arábia Saudita (Oriente Médio), a partir de amostras de solo. O isolamento neste ambiente, caracterizado por alta temperatura, vegetação escassa e baixa umidade representa uma nova expansão para o nicho ecológico atualmente conhecido desta espécie.

Na China as excretas de pombos também são um importante reservatório natural de *Cryptococcus*, mas a taxa média de isolamento foi de 12,9%, que é significativamente menor que a observada em outros países <sup>(46)</sup>. Li et al. (2012) <sup>(70)</sup> realizou um estudo em amostras de excretas de pombos e amostras de árvores coletadas em 10 cidades na China, *C. neoformans* foi recuperado de excretas de pombos e não houve amostra positiva para *C. gattii*.

Na Austrália, *C. gattii* foi encontrado especialmente associado às árvores de *Eucalyptus camaldulensis*, árvore originária da Austrália e que cresce em regiões com clima tropical <sup>(71)</sup>. Na Índia, *C. gattii* também foi isolado de *Eucalyptus camaldulensis* <sup>(72)</sup>. Grover et al. (2007) <sup>(73)</sup> isolaram *C. gattii* a partir de madeira em decomposição de cavidades de árvores na Índia Central, relatando pela primeira vez as árvores *Pithecolobium dulce* e *Mangifera indica* como habitat natural de *C. gattii*.

Cogliati et al. (2016) <sup>(74)</sup> realizaram um levantamento ambiental de 2012 a 2015, com amostras de 12 países, a fim de elucidar a distribuição de *C. neoformans* e *C. gattii* na Bacia do Mediterrâneo, identificando *C. neoformans* VNI principalmente, e *C. neoformans* VNIV e VNIII de árvores (*Ceratonia*, *Olea*, *Platanus*, *Prunus*) distribuídas por toda a Bacia do Mediterrâneo. Além de *C. gattii* VGI principalmente, e um único

isolado de VGIV, a partir de Eucalipto, Ceratonia, Pinus e Oleas na Grécia, sul da Itália e Espanha.

*C. gattii* emergiu na Colúmbia Britânica, no Canadá, particularmente na Ilha de Vancouver, como um patógeno primário de humanos e animais. *C. gattii* foi isolado da superfície de árvore, solo (geralmente ácido, baixa umidade e baixo teor de carbono orgânico), ar, água doce e água do mar de diferentes áreas. *C. gattii* VGIIa foi o mais isolado, mas também VGIIb e VGI <sup>(75)</sup>.

Na América Latina, os excrementos de aves são o reservatório ambiental predominante para *C. neoformans* e *C. gattii* é mais observado em espécies arbóreas <sup>(54)</sup>. Na Colômbia *C. gattii* tem sido recuperado principalmente de árvores do gênero *Eucalyptus* spp. Isolados ambientais na Colômbia tem sido recuperados de locais úmidos, com pouca insolação e temperaturas frias ou temperadas <sup>(65)</sup>. Vélez & Scandon (2017) <sup>(76)</sup> isolaram *C. neoformans* VNI e *C. gattii* VGIII de diferentes espécies de árvores, revelando *Tabebuia guayacan* e *Roystonea regia* como novos nichos na Colômbia.

No Brasil, Lazera et al. (2000) <sup>(77)</sup>, identificaram *C. neoformans* e *C. gattii* compartilhando o mesmo biótopo natural, uma árvore. Em Manaus, Amazonas, há relatos de *C. neoformans* isolados a partir de excretas de pombos <sup>(78,79)</sup>, excrementos de aves em cativeiro <sup>(79)</sup> e em solo <sup>(80)</sup>. A variedade *C. gattii*, também foi encontrada em oco de árvore <sup>(79)</sup>, em amostras de água da Reserva Florestal Adolpho Ducke e Rio Negro <sup>(80)</sup>, além de poeira domiciliar em habitações do município de Santa Izabel do Rio Negro e Iranduba <sup>(81, 82)</sup>.

O isolamento de *C. neoformans* e *C. gattii* a partir de amostras coletadas em ambiente domiciliar sugere a possibilidade de infecção adquirida neste ambiente. Alves (2016) <sup>(82)</sup> ao analisar amostras de poeira domiciliar em moradias de uma comunidade rural do Amazonas, observou que todas as residências onde houve isolamento de *Cryptococcus neoformans* e/ou *C. gattii* localizavam-se na região mais central da comunidade, onde há maior ação antrópica e circulação de pessoas. Brito-Santos et al. (2015) <sup>(81)</sup> também identificou *C. gattii* em poeira domiciliar de residências de uma comunidade rural do Amazonas. Passoni et al. (1998) <sup>(83)</sup> isolaram *C. neoformans* de 24 amostras de poeira domiciliar de habitações na cidade do Rio de

Janeiro. Em Belém, Costa (2009) <sup>(84)</sup> identificou simultaneamente *C. neoformans* e *C. gattii* em poeira domiciliar de cinco residências.

## 1.5 Diagnóstico da criptococose

A distinção entre *C. neoformans* e *C. gattii* ocorre através da observação de características fenotípicas e genótipicas <sup>(8)</sup>. O diagnóstico pode ser realizado a partir de várias amostras clínicas como líquido (LCR), urina, fragmentos de tecido, aspirado de lesões cutâneas, escarro e amostras do trato respiratório <sup>(83)</sup>.

Os exames laboratoriais são os métodos mais importantes para um diagnóstico definitivo <sup>(33)</sup>. A história clínica do paciente e exame de imagem podem auxiliar no diagnóstico. A identificação se baseia principalmente em exame direto, cultura do fungo, testes bioquímicos e imunodiagnóstico <sup>(32)</sup>. A observação microscópica da cápsula fúngica com Tinta da China (Nanquim) e a cultura fungica são considerados padrão-ouro no diagnóstico da criptococose <sup>(33)</sup>. Na microscopia apresentam-se como leveduras globosas ou ovaladas, brotamento único ou múltiplos brotamentos, envolvidas por uma cápsula polissacarídica <sup>(19)</sup> (Figura 5).

A identificação histopatológica é feita através das técnicas histoquímicas, Hematoxilina-eosina (H&E) e Gomori-Grocott (GMS), Mucicarmim de Mayer (MM) e Fontana-Masson (FM) (Figura 6). GMS é largamente utilizada na pesquisa de elementos fúngicos e revela características morfológicas como a parede celular e brotamentos, a coloração MM é específica para visualização da estrutura mucopolissacarídica capsular de *Cryptococcus* e diferenciar de outros fungos, e a coloração FM destaca a melanina na parede celular do fungo e é considerada alternativa em casos onde não há visualização da estrutura capsular visualizada na técnica de MM <sup>(85)</sup>.

Para o exame de cultura, inocula-se a amostra clínica em Agar glicose sabouraud acrescido de cloranfenicol, ou Agar Infusão Cérebro-Coração (BHI), sem cicloheximida <sup>(19)</sup>, nestes meios e em meio de cultura Agar Sabouraud glicosado 2%,

extrato de malte e extrato de levedura as colônias se apresentam na coloração branca a creme, margem lisa e textura mucoide <sup>(27)</sup>.

Provas bioquímicas como detecção da enzima uréase em ágar ureia a produção de melanina, por oxidação, em meio de cultura à base de Semente de Niger (NSA) podem auxiliar na identificação. Em NSA (Figura 5), extrato de batata e cenoura as colônias se apresentam na coloração marrom, facilitando a identificação do fungo <sup>(27)</sup>. Em indivíduos adultos com meningite criptocócica associada ao HIV, O LCR e as hemoculturas têm resultado positivo em até 90% e 70%, respectivamente <sup>(4)</sup>.

A reação no meio ágar canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB) permite a diferenciação de *C. neoformans* e *C. gattii*. Enquanto *C. neoformans* por ser sensível a canavanina não assimila a glicina, o *C. gattii* é resistente à canavanina e utiliza a glicina como fonte de carbono e nitrogênio, gerando uma mudança no pH do meio que leva a uma mudança na cor do meio antes amarelo-esverdeado para azul <sup>(7)</sup> (Figura 5).

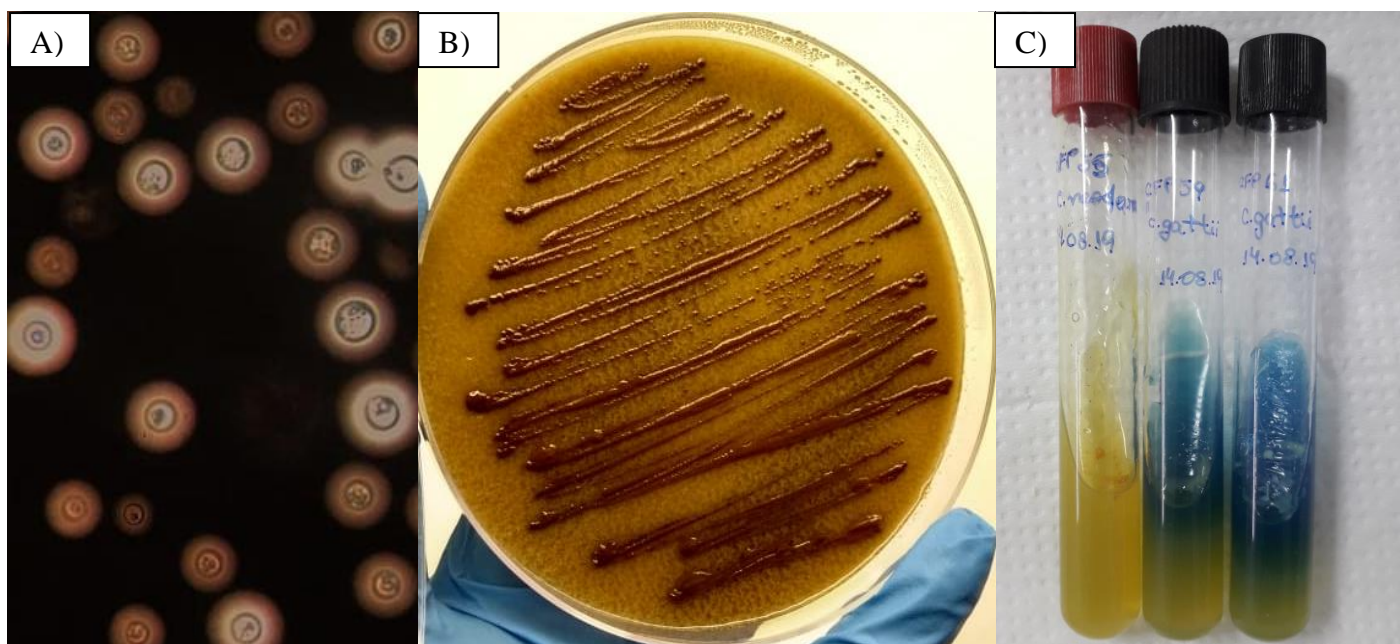


Figura 5. Micromorfologia de *Cryptococcus* sp. em tinta nanquin, macromorfologia em em agar semente de niger (NSA) e diferenciação em meio ágar canavanina-glicina-azul e bromotimol (CGB). A) *Cryptococcus* apresentando a capsula polissacarídica em tinta nanquin. Fonte: Pinheiro SB. Aspectos clínicos e moleculares da criptococose em pacientes não HIV no Estado do Amazonas, Brasil. 2019. Dissertação de Mestrado (Ciências farmacêuticas); B) Produção de melanina em meio NSA. Fonte: acervo pessoal; C) *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* (azul) em meio CGB. Fonte: acervo pessoal.

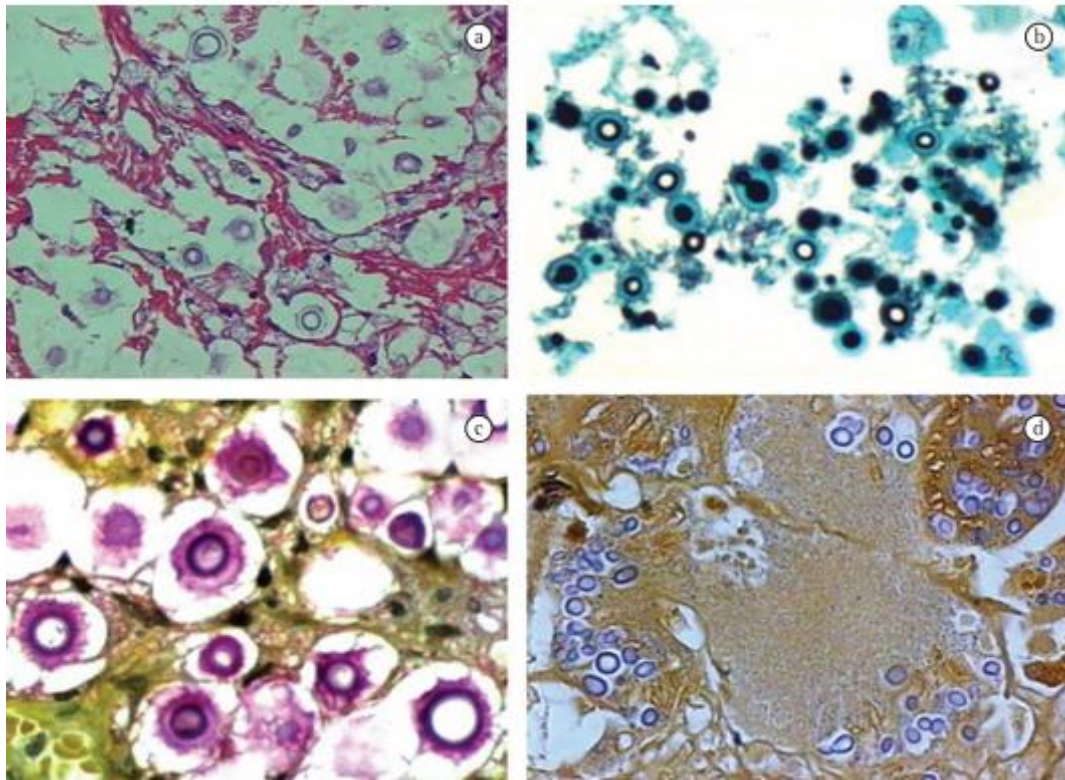


Figura 6. Ilustração da identificação histopatológica feita através das técnicas histoquímicas, Hematoxilina-eosina (H&E) e Gomori-Grocott (GMS), Mucicarmim de Mayer (MM) e Fontana-Masson (FM). Estruturas em disposição extracelular: A) H&E, aumento de 40X mostrando elementos fungicos ovoides com brotamento; B) GMS, aumento de 40x, mostrando estrutura capsular; C) MM, aumento de 40X mostrando *Cryptococcus* deficiente de cápsula, parede celular contendo pigmentos de melanina; D) FM, aumento de 40X. (Fonte: Severo, Gazzoni & Severo, 2009) <sup>(85)</sup>.

Provas imunológicas como a reação de aglutinação, de fixação do complemento e de imunofluorescência também podem ser utilizadas. A pesquisa de antígeno circulante no soro e LCR podem ser realizadas com partículas de látex sensibilizadas por antiglobulina específica, visto que em casos de meningite criptocócica em indivíduos com Aids o antígeno circulante pode persistir por um longo período de tempo no organismo. O teste de aglutinação de látex (CRAG-LA) e o teste de Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) são os mais indicados, mas podem apresentar falso negativo em infecções precoces <sup>(19)</sup>.

O teste diagnóstico, point of care, Cryptococcal Antigen Lateral Flow Assay (CRAG-LFA) (Figura 7) é um teste rápido, que detecta antígeno criptocócico no LCR e soro, é indicado para detectar infecção por *Cryptococcus* em indivíduos com HIV

com células CD4+  $\leq 200$  cél/mm<sup>3</sup> e em caso de meningite criptocócica sintomática independente da contagem de células CD4+ <sup>(86)</sup>. Este teste tem sensibilidade de 100% e especificidade de 99% a 100% e pode ser usado no rastreamento de casos de criptococose permitindo uma terapia mais rápida e assim minimizar os riscos de morte <sup>(87)</sup>.



Figura 7. Cryptococcal Antigen Lateral Flow Assay (CRAG-LFA). Fonte: <https://www.immy.com/crag>.

Embora disponíveis e bastante usados na pesquisa, os métodos moleculares não são usados na rotina clínica <sup>(4)</sup>. Esses métodos são importantes para a identificação do fungo em amostras clínicas e ambientais, para estudos epidemiológicos, entre outras finalidades, permitindo um resultado mais rápido e preciso, com sensibilidade superior a cultura fungica de *Cryptococcus* e prova de tinta nanquim <sup>(88)</sup>.

Uma série de técnicas de tipagem do ácido desoxirribonucleico (DNA) como polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP), estudos de

hibridização de DNA, polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (AFLP) e impressão digital de reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido utilizados para estudos envolvendo os agentes de criptococose <sup>(89)</sup>.

Os avanços na tipagem molecular tornaram possível descobertas como a identificação dos novos tipos moleculares, *C. neoformans* VNB <sup>(9)</sup>, que é ancestral das linhagens globalizadas e assexuadas VNI e VNII <sup>(12)</sup>, e *C. gattii* VGV e *C. gattii* VGVI <sup>(10)</sup>, identificação dos genótipos VGIIa e VGIIb de *C. gattii* envolvidos na epidemia de criptococose na ilha de Vancouver no Canadá <sup>(75)</sup>, além do sequenciamento do genoma completo que mostrou evidências sobre a origem desses genótipos <sup>(13)</sup>.

Devido à necessidade de um método de tipagem padronizado globalmente para *C. neoformans* e *C. gattii*, no ano de 2007, a Sociedade Internacional de Micoses Humanas e Animais (ISHAM), selecionou o multi-locus sequence typing (MLST) como o método de escolha, pelo seu alto poder discriminatório e reprodutibilidade. Para o MLST, há cepas padrões que representam os tipos moleculares conhecidos como agente da criptococose. A técnica consiste na utilização de regiões variáveis de sete loci genéticos independentes, os genes relacionados a virulência CAP59, GPD1, LAC1, PLB1, SOD1, URA5 e o espaçador intergênico IGS1, para determinação dos subtipos moleculares ou perfil alélico (STs). CAP59 é o gene associado à cápsula mucopolissacarídica, GPD1 o gene associado à gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, LAC1 o gene associado a lacase, produção de melanina, PLB1 o gene associado à fosfolipase B1, invasão celular, SOD1 o gene associado à cobre-zinco superóxido dismutase, URA5 o gene associado à orotidina-monofosfato pirofosforilase e IGS1 um Espaçador intergênico do RNA ribossômico, selecionado devido sua alta diversidade alélica <sup>(90)</sup>.

O MLST tem sido mundialmente utilizado na vigilância epidemiológica da criptococose, especialmente quanto a investigação de surtos. Além disso, tem possibilitado a identificação de novos subtipos moleculares e estudos populacionais. Os dados obtidos através da análise filogenética pelo MLST podem auxiliar a estimar a origem evolutiva do fungo e observar a relação genética entre diferentes isolados <sup>(91)</sup>.



## 1.6 Tratamento da criptococose

O tratamento da criptococose consiste em reduzir ou eliminar a carga fúngica no organismo do paciente e manter os níveis de carga fúngica estabilizadas ou negativas<sup>(21)</sup>. Os antifúngicos mais utilizados no tratamento da criptococose incluem Anfotericina B (AMB), 5-Fluocitosina (5-FC) e fluconazol (FCZ)<sup>(19)</sup>. Para o tratamento de infecções sem comprometimento do SNC, geralmente utiliza-se o fluconazol por via oral, 400mg por dia de 6 a 12 semanas<sup>(92)</sup>. Para pacientes com acometimento extrapleural, extrapulmonar, tal qual lesões da pele e osso, com ou sem envolvimento pulmonar o tratamento é mais difícil devendo-se utilizar inicialmente AMB com ou sem 5-FC, com FCZ e Itraconazol<sup>(19)</sup>.

Para AMB as diretrizes de tratamento recomendam o uso combinado de AMB e Flucitosina como indução<sup>(93)</sup>. Para a fase de indução de duas semanas, a World Health Organization (WHO) recomenda um regime contendo AMB combinada com 5-FC ou FCZ. Em países onde a AMB não se encontra disponível, recomenda-se regime com FCZ combinado com 5-FC ou monoterapia com altas doses de FCZ. Para a fase de consolidação de oito semanas, e manutenção recomenda-se FCZ oral e para fase de manutenção<sup>(33)</sup>. A MB atua como fungicida ligando-se ao ergosterol, um esteroide presente na membrana fúngica, modificando a permeabilidade e levando a perda de constituintes citoplasmáticos provocando uma lesão oxidativa que resulta em alterações metabólicas prejudiciais a sobrevivência da célula. Frequentemente a AMB causa efeitos adversos por toxicidade celular e tecidual<sup>(94)</sup>.

Na América Latina não há disponibilidade de 5-FC e recomenda-se um esquema alternativo adotado para países com recursos limitados, utilizando-se monoterapia de AMB com dose superior a 1 mg/kg/dia ou AMB com FCZ na fase de indução e FCZ na fase de consolidação<sup>(53, 95)</sup>.

A AMB é de amplo espectro e a primeira escolha para o tratamento da MB, cujo mecanismo é combinar com a membrana das células fúngicas do ergosterol interferindo no metabolismo celular e reforçar a permeabilidade da membrana celular levando à morte da célula<sup>(32)</sup>. Em regimes de tratamento com a indução de AMB,

recomenda-se monitoramento e gerenciamento do tratamento para reduzir a toxicidade grave relacionada ao uso desse medicamento, tal como hipocalcemia e nefrotoxicidade <sup>(33)</sup>. Novas formulações da AMB, na forma lipossomal e de dispersão coloidal apresentam menos efeitos colaterais, porém essas formulações são de maior custo no mercado <sup>(96)</sup>.

A 5-FC é considerada uma droga sinérgica da MB, principalmente contra *Cryptococcus* <sup>(94)</sup>. Trata-se de uma pirimidina fluorinada com atividade primeiramente fungistática, tonando-se fungicida conforme prolongamento do tratamento, tem como mecanismo inibir a divisão celular, interferindo na síntese de DNA do fungo <sup>(97)</sup>. A flucitosina entra na célula fungica por intermédio de uma permease e é convertida a 5-fluorouracil (5-FU) pela enzima citosina desaminase. O 5-FU é então convertido a ácido 5-fluorouridílico que é fosforilado e incorporado no RNA, resultando em inibição protéica. A 5-FU também pode ser convertida a monofosfato de 5-fluorodeoxiuridina, um inibidor da timidilato sintase, enzima envolvida na síntese de DNA e divisão celular <sup>(98)</sup>.

Os azóis são compostos completamente sintéticos com ação fungistática e fungicida, mas possuem efeito inferior a AMB <sup>(96)</sup>. O FCZ é um dos agentes triazólicos e tem como mecanismo a destruição da membrana celular levando a morte da célula por inibir a síntese de ergosterol na membrana celular do fungo <sup>(32)</sup>. O Itraconazol parece ser uma boa opção no tratamento da meningite criptocócica, mas é pouco confiável devido sua má absorção e limitada penetração no SNC. Já o Posaconazol tem ótima atividade, mas também tem limitada penetração no SNC <sup>(99)</sup>.

Os azóis agem sobre enzimas do citocromo P450 dos fungos, bloqueando a demetilação do lanosterol e a síntese de ergosterol, alterando a permeabilidade da membrana e a viabilidade fungica. Os azóis, especialmente os imidazólicos, tem função apenas fungistática <sup>(94)</sup>.

Não há conhecimento de elementos genéticos que codifiquem resistência aos medicamentos antifúngicos e que possam ser transferíveis de fungo a fungo, tal qual ocorre com as bactérias <sup>(100)</sup>. O aparecimento de infecções fungicas recorrentes e a resistência a terapia antifúngica usual tem levado ao uso de testes de susceptibilidade in vitro para a obtenção e acompanhamento de uma terapia mais adequada <sup>(101)</sup>.

Desde a década de 80, grupos norte-americanos e europeus tem trabalhado

no desenvolvimento de um método de referência para testar a susceptibilidade antifúngica, sendo os principais os subcomitês: Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) e EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). O documento M27-A2 do CLSI é o teste de susceptibilidade antifúngica, no entanto esse documento possui limitações em testes de leveduras não fermentativas de glicose, como o *Cryptococcus* <sup>(100)</sup>.

Quanto aos métodos para teste de susceptibilidade antifúngica utilizados, há o Vitek 2 (bioMérieux, França) que é um método automatizado, o teste de microdiluição em caldo, teste de difusão em disco e o E-test. No teste de microdiluição em caldo mede-se a atividade in vitro de um determinado antifúngico em relação a um organismo a ser testado em meio de cultura líquido, utilizando-se uma concentração conhecida do antifúngico <sup>(102)</sup>.

O teste de difusão em disco é um método reprodutível, barato e de fácil interpretação e envolve o uso de discos de papel contendo uma concentração fixa do antifúngico de teste observando-se a zona de inibição formada após contato com o organismo de teste para medir a susceptibilidade <sup>(102)</sup>. O e-test é um método com boa reprodutibilidade no qual utiliza-se tiras contendo um gradiente contínuo de concentrações pré-definidas de um antifúngico específico para determinação da Concentração inibitória mínima (CIM) <sup>(103)</sup>.

## 2. JUSTIFICATIVA

A criptococose é considerada endêmica no Amazonas, apresentando um importante número de óbitos principalmente em indivíduos com HIV/Aids. A meningite criptocócica é a principal forma observada nos pacientes. Um diagnóstico precoce e um tratamento eficaz se fazem extremamente necessários. Deve-se manter uma vigilância relacionada ao perfil dos pacientes acometidos e dos agentes etiológicos envolvidos nas infecções, visto que não se trata de uma doença de notificação compulsória. Sabe-se que o ambiente é fonte de disseminação do agente etiológico, por isso a investigação da presença de *Cryptococcus* no ambiente e o conhecimento das possíveis fontes de infecção é de grande relevância, pois permite um maior conhecimento sobre o fungo e no caso da investigação domiciliar permite alertar os pacientes quanto ao risco de se infectar e/ou reinfectar pelos agentes da criptococose, principalmente no que diz respeito aos pacientes imunocomprometidos. Portanto, o presente estudo analisou os dados clinico-epidemiológicos de pacientes com HIV/Aids, e investigou os agentes envolvidos nas infecções e o domicílio desses pacientes como potencial local de infecção.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Caracterizar os agentes fúngicos da criptococose em pacientes com HIV/Aids atendidos em uma Unidade de Referência no Amazonas no período de 2017 a 2019 e investigar o ambiente domiciliar como fonte de exposição para a infecção/reinfecção de *Cryptococcus*.

#### **3.2 Objetivos específicos**

a) Descrever os aspectos clínicos, laboratoriais e epidemiológicos da criptococose em pacientes com HIV/AIDS atendidos e notificados na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT – HVD);

b) Analisar fontes ambientais para determinar a presença de agentes fúngicos de criptococose em domicílios de pacientes com HIV-AIDS diagnosticados com essa infecção fúngica;

c) Determinar os genótipos de *Cryptococcus* causadores de criptococose e dos presentes no ambiente domiciliar dos pacientes;

d) Caracterizar os isolados quanto à susceptibilidade aos antifúngicos azólicos e anfotericina B.

e) Correlacionar os achados ambientais com os agentes causadores de criptococose nos pacientes.

#### **4. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

O estudo foi conduzido de acordo com as diretrizes da Declaração de Helsinque e aprovado pelo Comitê de Ética da Fundação de Medicina Tropical Doutor Vieira Dourado (código de protocolo CAAE nº 82715917.4.0000.0005).

## **5. CAPÍTULO 1: Criptococose em pacientes com HIV/AIDS no norte do Brasil: aspectos clínicos, tipos moleculares e isolamento de agentes de amostras ambientais associadas a pacientes**

Neste capítulo é apresentado o primeiro artigo publicado intitulado “*Cryptococcosis in HIV/AIDS patients in northern Brazil: clinical aspects, molecular types and isolation of agents from environmental samples associated with patients*” que aborda as características clínico-epidemiológicas dos pacientes cujos isolados foram analisados nesse trabalho, os tipos moleculares observados como agentes das infecções e a investigação ambiental no domicílio dos pacientes e vizinhos desses pacientes. O artigo foi publicado na revista “*Tropical Medicine & International Health*”.

## RESEARCH ARTICLE

# Cryptococcosis in HIV/AIDS patients in northern Brazil: Clinical aspects, molecular types and isolation of agents from environmental samples associated with patients

Marla Jalene Alves<sup>1,2</sup> | Izabella Sadalla do Nascimento<sup>1</sup> | Katia Santana Cruz<sup>3</sup> |  
Victoria Violeta Fernandes Menescal<sup>1</sup> | Lizandra Stephanny Fernandes Menescal<sup>3</sup> | Larissa  
Svetlana Cavalcante Silva<sup>3</sup> | Silviane Bezerra Pinheiro<sup>4,5</sup> | Aline Stephanie Pérez Gómez<sup>6</sup> | João  
Vicente Braga de Souza<sup>4</sup> | Marcia dos Santos Lazera<sup>2,7</sup> | Ani Beatriz Jackisch-Matsuura<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Diversidade Microbiana da Amazônia com Importância para a Saúde, Instituto Leônidas e Maria Deane – FIOCRUZ, Manaus, Brazil

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Convenio ILM/IOC – FIOCRUZ, Manaus, Brazil

<sup>3</sup>Laboratório de Micologia Médica, Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus, Brazil

<sup>4</sup>Laboratório de Micologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, Brazil

<sup>5</sup>Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Brazil

<sup>6</sup>Programa de Residência Médica em Medicina Tropical, Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Viera Dourado, Manaus, Brazil

<sup>7</sup>Laboratório de Micologia, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

## Correspondence

Ani Beatriz Jackisch-Matsuura, Laboratório de Diversidade Microbiana da Amazônia com Importância para a Saúde, Instituto Leônidas e Maria Deane – FIOCRUZ, Manaus, Amazonas, Brazil.  
Email: ani.matsuura@fiocruz.br

## Funding information

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas; PROEP/LABS/ILMD Fiocruz Amazônia LDMAIS

## Abstract

**Objectives:** In the state of Amazonas, northern Brazil, cryptococcosis is endemic, with a predominance of *Cryptococcus neoformans* in individuals with HIV/AIDS, and *Cryptococcus gattii* VGII in non-HIV individuals. This study analysed the clinical isolates and clinical–epidemiological characteristics of HIV/AIDS patients diagnosed with cryptococcosis in a tertiary healthcare facility in Manaus, Amazonas and investigated the presence of agents of cryptococcosis in environmental samples.

**Methods:** A survey was made of data from HIV/AIDS patients diagnosed with cryptococcosis between January 2017 and December 2019, and environmental samples were collected at the patients' and their neighbours' homes. The isolates were submitted to morphophysiological analysis and PCR-RFLP typing to determine the molecular types.

**Results:** Clinical–epidemiological characteristics of 55 patients and 75 clinical isolates were analysed. Neurocryptococcosis was the clinical form observed in 98.2% ( $n = 54/55$ ) of patients. A total of 38.1% ( $n = 21/55$ ) of patients died within 100 weeks, of which 21.8% ( $n = 12/55$ ) died less than a month after the diagnosis of cryptococcosis. *C. neoformans* VNI ( $n = 68/75$ ), *C. neoformans* VNII ( $n = 1/75$ ), *C. gattii* VGI ( $n = 3/75$ ) and *C. gattii* VGII ( $n = 3/75$ ) were identified. Mixed infection was observed in two patients, one by *C. neoformans* VNI and VNII and the other by *C. neoformans* VNI and *C. gattii* VGI. *Cryptococcus* VNI was detected in three ( $n = 3/51$ ) households, one of a patient ( $n = 1/17$ ) and two households that neighbour patients' houses ( $n = 2/34$ ).

**Conclusions:** This study demonstrated the prevalence of *C. neoformans* VNI, which is a cause of cryptococcosis in patients with HIV/AIDS in the state of Amazonas, and revealed a greater diversity of molecular types affecting these patients in the region than in previous studies. In the studied group, a high mortality rate was observed, which reflects the importance of early diagnosis, and evidences cryptococcosis as an AIDS-defining disease and an important public health problem in the region. The home environment proved to be a potential source of infection/reinfection by *C. neoformans* VNI.



**KEYWORDS**Amazonas, cryptococcosis, *Cryptococcus*, HIV/AIDS, PCR-RFLP**INTRODUCTION**

Cryptococcosis is a potentially fatal respiratory and neuro-logical disease that affects humans and animals worldwide. This systemic mycosis is acquired through the inhalation of infectious propagules from the environment and is caused by pathogenic members of the genus *Cryptococcus*, including the *Cryptococcus neoformans* species' complex molecular types VNI, VNII, VNIII, VNIV and the *Cryptococcus gattii* species' complex molecular types VGI, VGII, VGIII, VGIV) [1] as well as the newly identified VGV and VGVI [2]. Recently, seven species of agents of cryptococcosis have been proposed by Hagen et al. [3]; however, this nomenclature is still incipient and we treat these agents as two complexes and their respective molecular types or genotypes, according to Kwon-Chung et al. [1].

*Cryptococcus neoformans* is primarily responsible for infection in immunosuppressed patients, particularly patients with AIDS [4]. Rajasingham et al. [5] estimated an incidence of 223,100 cases of cryptococcal meningitis and approximately 181,100 deaths annually, cryptococcosis being the second most common cause of AIDS-related death. In Brazil, cryptococcosis is the most recurrent systemic mycosis in immunocompromised patients, mainly in the form of meningitis [6]. When associated with AIDS, it corresponds to 4.4% of diagnosed cases, with an estimated 1,000,000 cases and

250,000 related deaths annually [7]. By contrast, *C. gattii* pre-dominantly cause a primary infection in immunocompetent individuals. It is worth noting that the endemic cryptococcosis caused by *C. gattii* shows a regional pattern in Brazil, and is mostly reported in the north and northeast of the country, where it occurs usually in immunocompetent hosts, including children and young adults [8]. In the state of Amazonas, cryptococcosis is prevalent in HIV patients and its main agent is *C. neoformans* VNI, while in non-HIV patients, *C. gattii* VGII predominates as an agent of cryptococcosis [9–11].

The main urban reservoir of *C. neoformans* is pigeon droppings, but it occurs in several substrates, including decaying wood [12]. *C. gattii* has also been related to tree species and decaying wood [13, 14]. *Cryptococcus neoformans* has been isolated from dust in households in Rio de Janeiro, suggesting regular exposure in daily life [15]. Alves et al. [16] conducted a study in public spaces, such as schools, squares as well as residences and buildings in Manaus, Amazonas, and showed the presence of *C. neoformans* type VNI in pigeon droppings and also in the excrement of captive birds, and *C. gattii* molecular type VGII in a hollow tree, evidencing the same molecular types of *Cryptococcus* that are responsible for infections in Manaus. Brito-Santos et al. [17] identified *C. gattii* of molecular type VGII in household dust samples in wooden houses in a municipality located in the upper Negro River region, in the Amazonas state. Environmental studies show

the importance of several microenvironments as a potential source of human infection.

In Brazil, cryptococcosis is not a disease that requires compulsory notification and data on the distribution of cases of the disease and its causative agents are scarce. Between 2017 and 2019, 1,372 cases of AIDS were reported at the Dr. Heitor Vieira Dourado Tropical Medicine Foundation (FMT-HVD) [18], which is a reference centre for HIV/AIDS cases in the state of Amazonas, Brazil, of whom 83 had cryptococcosis associated, representing 6% of all AIDS cases. In this work, we analysed the cases of cryptococcosis in patients with HIV/AIDS diagnosed during a three-year period (2017–2019) at FMT-HVD to characterise the clinical–epidemiological data of these patients, the molecular types causing cryptococcosis and we also analysed the environmental sources in order to determine the presence of agents of cryptococcosis in the homes of these patients and their neighbours' homes.

## METHODS

### Patient data collection and ethical approval

The sociodemographic, clinical and laboratory information of the patients were obtained via the electronic medical record IDoctor and subsequently tabulated using Microsoft® Excel. The following clinical data were extracted: diagnosis of HIV/AIDS and cryptococcosis, symptoms, clinical form of cryptococcosis, CD4T

cell count, patient evolution; socio-demographic data: age, sex and city of residence; and epidemiological data related to exposure to the fungus.

The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of the Tropical Medicine Foundation Doctor Vieira Dourado (protocol code CAAE No. 82715917.4.0000.0005).

### Sampling of clinical isolates

*Cryptococcus* isolates were obtained from individuals with HIV/AIDS diagnosed with cryptococcosis in a tertiary health unit in Manaus, Amazonas, Brazil, from January 2017 to December 2019. All isolates were maintained in Sabouraud dextrose agar tubes and stored at 4°C at the Medical Mycology Laboratory at FMT-HVD who kindly provided the isolates for the experiments that were carried out in the Mycology Laboratory of the Instituto Leônidas e Maria Deane/FIOCRUZ.

### Isolation of fungi from environmental samples

We collected 77 environmental samples in 51 households (17 from patients homes and 34 neighbours' homes), comprising

51 samples of household dust, 8 soil samples, one bird excrement sample and 17 samples of air. Household dust was collected in all the homes visited, air collection was carried out only in the patients' homes and soil only in patients' homes where there was a yard with exposed soil. The air was collected for 15 min in each household (850 litres analysed in each household) using a 6-layer impactor (9–0.65 µm) (Bioaero 6, Energética containing plates with Niger seed agar (NSA) medium. The plates with air samples were incubated at 28°C and observed daily for up to 5 days. The remaining samples were processed according to Lazera et al. [19], 10 plates were used for each sample. Plates with NSA were incubated for up to 5 days at 28 °C. Isolates were also subjected to growth at 37°C.

### **Morphophysiological identification of *Cryptococcus***

Isolates that were positive for phenoloxidase (brown colonies) were observed under a microscope using slides with 4% NaOH, Indian ink (nanquim) and cotton blue lactophenol. Colonies with capsulated yeasts, without hyphae, and producing melanin were subcultivated in NSA and subsequently identified in canavanine-glycine-bromothymol blue medium (CGB).

### **PCR-RFLP typing**

The DNA of the clinical and environmental isolates was extracted with the use of the QIAamp Tissue and Blood extraction kit (Qiagen, Hilden,

Germany) according to the manufacturer's instructions and included a pre-phase of mechanical maceration using glass beads. Amplification of the *URA5* gene was performed followed by double digestion with *HhaI* and *Sau96I* (ThermoScientific), according to Meyer et al. [20]. To identify the molecular types, the following reference strains (conceded by Fiocruz/CFP from their collection of pathogenic fungi) were used: CFP 55 (serotype A, VNI), CFP 56 (serotype A, VNII), CFP 57 (serotype AD, VNIII), CFP 58 (serotype D, VNIV), CFP 59 (serotype B, VGI), CFP 60 (serotype B, VGII), CFP 61 (serotype B, VGIII) and CFP 62 (serotype C, VGIV).

## **RESULTS**

### **Clinical and epidemiological data**

Eighty-three individuals with HIV/AIDS were diagnosed with cryptococcosis between January 2017 and December 2019, with an average of 28 cases per year. We included 55 patients whose clinical isolates were viable for the study and obtained 75 isolates. Of these, 81.8% ( $n = 45/55$ ) either resided or have resided in the city of Manaus, capital of Amazonas State, with a greater frequency in the eastern and northern areas of the city (Figure 1); 20% ( $n = 11/55$ ) came from other municipalities of the state (Table 1). Manaus is located in the middle of the Amazon Rainforest, at the confluence of the Negro and Solimões Rivers, with a territory of 11,401 km<sup>2</sup> and 2.2 million inhabitants and has ecological reserves such as the Adolpho Ducke Forest Reserve (Figure 1).

*Cryptococcus neoformans* VNI was the

aetiological agent in 94.5% ( $n = 52/55$ ) of the cases, with one case of mixed infection by *C. neoformans* VNI and VNII, and one case of mixed infection by *C. neoformans* VNI and *C. gattii* VGI. VGII was identified in 5.4% ( $n = 3/55$ ) of patients (Table 1). 74.5% ( $n = 41/55$ ) of the patients are male and patient age ranged from 18 to 53 years, with a mean age of 35.3 years. The most frequent clinical manifestations were severe headache 63.6% ( $n = 35/55$ ), fever 40% ( $n = 22/55$ ), vomiting 36.3% ( $n = 20/55$ ), myalgia 12.7% ( $n = 7/55$ ), mental confusion 29.1% ( $n = 16/55$ ), dyspnoea 29.1% ( $n = 16/55$ ), dementia 25.4% ( $n = 14/55$ ), weight loss 25.4% ( $n = 14/55$ ), seizure 18.1% ( $n = 10/55$ ) and psychomotor agitation 12.7% ( $n = 7/55$ ). Neurological sequelae, such as visual impairment 29.1% ( $n = 16/55$ ), motor deficit 10.9% ( $n = 6/55$ ) and hearing deficit 7.3% ( $n = 4/55$ ) were also observed. Neurocryptococcosis was observed in 98.2% ( $n = 54/55$ ), and only 1.8% ( $n = 1/55$ ) patient had pulmonary cryptococcosis. Cerebrospinal fluid (CSF) was the type of clinical sample with the most *Cryptococcus* isolates recovered, that is in 85.4% ( $n = 47/55$ ) of the patients.

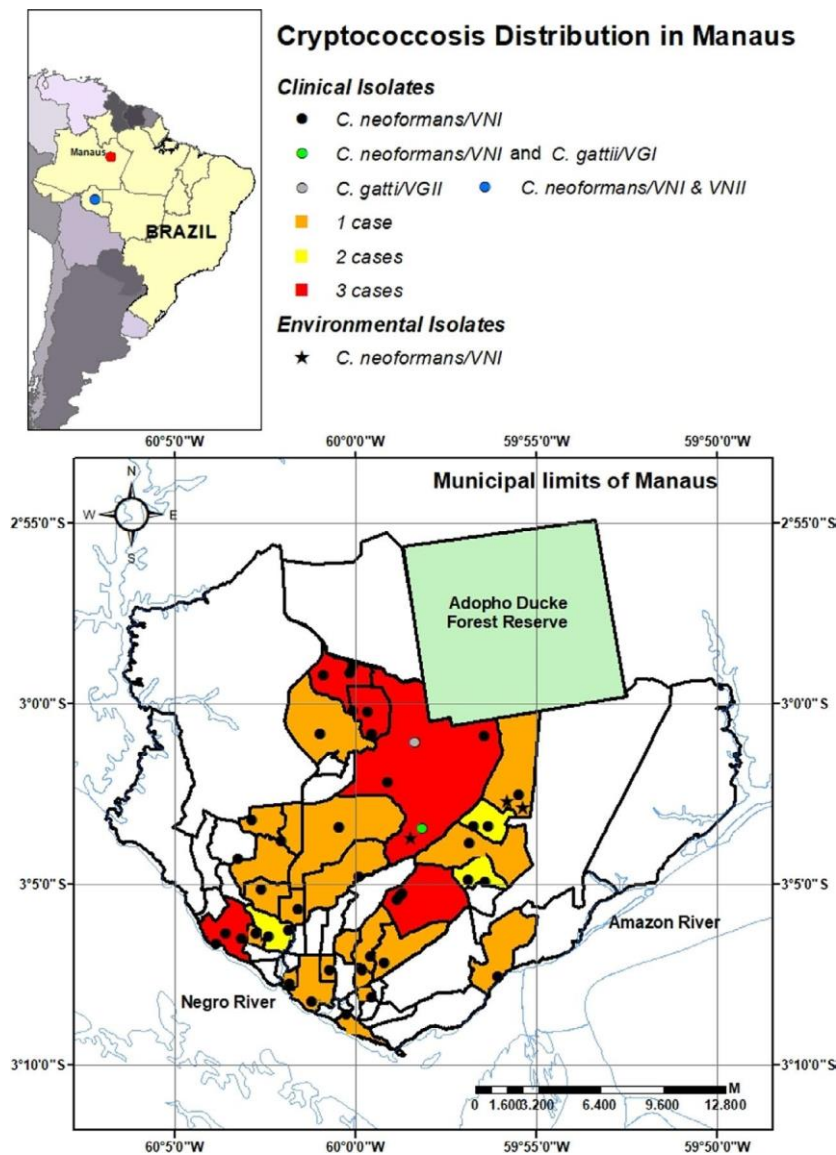
The CD4 + T cells count performed at the closest date to the diagnosis of cryptococcosis was observed. The mean CD4+ T cells were 87.1 cells/mm<sup>3</sup>: 49% ( $n = 27/55$ ) < 50 cells/mm<sup>3</sup>, 16.3% ( $n = 9/55$ ) 50–100 cells/mm<sup>3</sup>, 3.6% ( $n = 2/55$ ) 100–150 cells/mm<sup>3</sup>, 20% ( $n = 11/55$ ) >150 cells/mm<sup>3</sup>, for 10.9% ( $n = 6/55$ ) there were no data. 21.8% ( $n = 12/55$ ) were diagnosed with cryptococcosis at the same time as they received the diagnosis of HIV/AIDS, with a difference of 1–3 days between the

results. Fluconazole and amphotericin B were the medications used in the treatment of patients. Hospital death was observed in 38.1% ( $n = 21/55$ ) patients, and 21.8% ( $n = 12/55$ ) died less than one month after diagnosis.

### Households of patients with cryptococcosis and assessment of the presence of *Cryptococcus*

It was possible to make a home visit for environmental collection in 17 patients' homes, since 12 resided in locations that are distant from Manaus and 26 could not be contacted. For every patient's home that was visited, the two neighbouring houses were also visited, thus totalling 51 houses.

*Cryptococcus neoformans* VNI was detected in 5.9% ( $n = 3/51$ ) households and was viable for growth at 37 °C. Household dust was positive in 3.9% ( $n = 2/51$ ) of samples, while soil was positive in 12.5% ( $n = 1/8$ ) of the households where this substrate was collected. The isolates were obtained from households with some type of yard, while houses without a yard or apartments were not positive (Table 2). In 55% ( $n = 28/51$ ) of the households, there was a report of the presence of pigeons outside the home; however, there



**FIGURE 1** Distribution of cryptococcosis cases and environmental isolates in the municipality of Manaus, Brazil according to districts and molecular types; ● Patient (P5) resides in another state but was diagnosed with cryptococcosis in Manaus

was accumulation of pigeon excreta only in one household, whose sample was negative. *Cryptococcus* was not detected in any of the air samples.

*Cryptococcus neoformans* VNI was isolated from the soil of one patient's home, as well as dust obtained from his neighbour's home. The patient has lived in the house for about 17 years, but this was undergoing renovation that began shortly after

the diagnosis of cryptococcosis. The soil sample was collected from soil that had been turned over (Figure 2). No new re-infection has been reported in this patient so far.

Dust sample 2, which was positive for *C. neoformans* VNI, was obtained from a neighbouring home of another patient (P13); however, there was no detection of the fungus in the home of the patient who had lived there for about 20 years. Several

clinical isolates were obtained from this patient at different times, with mixed infection by *C. neoformans* VNI and *C. gattii* VGI. The patient reported regular visits to a friend's smallholding, which is located in an area with recent deforestation, road formation and urbanisation. In addition, there were pigeons in a school in front of his residence. The location of these cases is shown in Figure 1.

### **Molecular type of *Cryptococcus* isolates obtained from patients and the environment**

The restriction fragment length polymorphism (RFLP) of the *URA5* gene showed that 90.6% ( $n=68/75$ ) of the clinical isolates were *C. neoformans* VNI, though other molecular types were also observed, such as *C. neoformans* VNII ( $n=1/75$ ), *C. gattii* VGI ( $n=3/75$ ) and *C. gattii* VGII ( $n=3/75$ ). The three environmental isolates were *C. neoformans* VNI. Patient P5 presented two different molecular types of *C. neoformans* (VNI and VNII), while patient P13 presented one isolate of *C. neoformans* (VNI) and three isolates of *C. gattii* (VGI).

**TABLE 1** Description of the 55 HIV/AIDS patients diagnosed with cryptococcosis from January 2017 to December 2019, according to place of residence, age, type of sample, CD4+T cell count, aetiological agent, treatment and outcome

Patient	Place of residence	Age	Sample	CD4+T cells/mm <sup>3</sup>	Molecular type	Treatment	Outcome
P1	Manaus	29	CSF	>150	VNI	AmB + FCZ	Death
P2	Manaus	45	CSF	13	VNI /VNI	AmB + FCZ	Death
P3	Manaus	39	CSF	>150	VNI	AmB + FCZ	OC
P4	Rio Preto da Eva	37	CSF	>150	VNI	AmB + FCZ	OC
P5 <sup>a</sup>	RONDONIA	28	CSF	4	VNI/VNII	AmB + FCZ	Death
P6	Manacapuru	29	CSF	18	VNI	No data	Death
P7	Careiro Castanho	28	CSF	55	VNI/VNI	AmB + FCZ	OC
P8	Manaus	28	CSF	9	VNI/VNI	AmB + FCZ	OC
P9	Parintins	27	CSF	No data	VNI/VNI	AmB + FCZ	Death
P10	Manacapuru	30	CSF	12	VGII	AmB + FCZ	Death
P11	Manaus	22	CSF	12	VNI/VNI	AmB	OC
P12	Manaus	44	CSF	80	VNI	AmB + FCZ	OC
P13 <sup>a</sup>	Manaus	34	CSF	7	VGI/VGI/VNI/VGI	AmB + FCZ	HD
P14	Itacoatiara	35	CSF	18	VNI	AmB + FCZ	OC
P15	Manaus	23	CSF	7	VNI	AmB + FCZ	Death
P16	Manaus	43	CSF	15	VNI	AmB + FCZ	Hospitalised
P17	Manaus	53	CSF	10	VNI	AmB	OC
P18	Manaus	40	Blood	14	VNI	AmB	Death
P19	Manaus	30	CSF	47	VNI	No data	OC
P20	Manaus	28	CSF	>150	VNI	No data	Death
P21	Beruri	26	CSF	No data	VNI/VNI	No data	Death
P22	Manaus	43	CSF	120	VGII	AmB + FCZ	OC
P23	Manaus	53	CSF	74	VNI/VNI	FCZ	Death
P24	Manaus	30	CSF	75	VNI	AmB	OC
P25	Manaus	34	CSF	23	VNI/VNI/VNI/VNI/VNI	AmB + FCZ	Death
P26	Autazes	51	CSF	>150	VGII	AmB + FCZ	Death
P27	Manaus	40	CSF	>151	VNI/VNI	FCZ	OC
P28	Manaus	48	TA	No data	VNI	No data	Death
P29	Manaus	43	Blood	6	VNI	AmB + FCZ	OC
P30	Manaus	18	CSF	62	VNI	FCZ	Death
P31	Manaus	22	CSF	24	VNI	AmB + FCZ	OC
P32	Manaus	40	Blood	23	VNI	FCZ	Death
P33	Manaus	46	Blood	4	VNI/VNI	AmB	Death
P34	Manaus	36	CFS	93	VNI	FCZ	OC
P35	Manaus	25	CFS	13	VNI	AmB + FCZ	OC
P36	Manaus	37	CFS	>150	VNI	AmB + FCZ	OC
P37	Manaus	44	CFS	No data	VNI	AmB + FCZ	Death
P38	Manaus	51	CFS	No data	VNI	AmB + FCZ	Death
P39	Manaus	49	CFS	49	VNI/VNI	AmB + FCZ	OC
P40	Manaus	29	Blood	>150	VNI	FCZ	OC
P41	Manaus	18	CFS	50	VNI	AmB + FCZ	Death
P42	Rio Preto da Eva	36	CFS	43	VNI	AmB + FCZ	OC
P43	Manaus	36	CFS	63	VNI	AmB + FCZ	OC
P44	Careiro da	32	CFS	103	VNI	AmB + FCZ	OC

## Varzea

TABLE 1 (Continued)

Patient	Place of residence	Age	Sample	CD4+ T cells/mm <sup>3</sup>	Molecular type	Treatment	Outcome
P45	Manaus	37	CFS	>150	VNI/VNI	AmB + FCZ	OC
P46	Manaus	36	Blood	20	VNI	AmB + FCZ	OC
P47	Manaus	34	CFS	>150	VNI	AmB + FCZ	OC
P48	Manaus	35	CFS	16	VNI	AmB + FCZ	OC
P49	Manaus	53	CFS	25	VNI	AmB + FCZ	HD
P50	Manaus	50	CFS	No data	VNI	AmB + FCZ	Death
P51	Manaus	29	BAL	21	VNI	AmB + FCZ	OC
P52	Irاندوبا	27	CFS	30	VNI	AmB + FCZ	HD
P53	Manaus	26	CFS	>150	VNI	AmB + FCZ	OC
P54	Manaus	31	CFS	7	VNI/VNI	AmB + FCZ	OC
P55	Manaus	28	CFS	66	VNI	AmB + FCZ	OC

Abbreviations: CFS, Cerebrospinal fluid; TA, Tracheal aspirate; BAL, Bronchoalveolar lavage fluid; AmB, Amphotericin B; FCZ, Fluconazole; OC, Outpatient care; HD, Hospital discharge. <sup>a</sup>Mixed infection case.

TABLE 2 Types of housing visited and data related to the collections carried out at the home of patients and neighbours

Type of housing	N <sup>o</sup>	Sample	N <sup>o</sup>	Positive sample	N <sup>o</sup>
House without a backyard	13	House dust	13	No	0
		Air	3	No	0
House with a concreted backyard	13	House dust	13	Yes	1
		Air	3	No	0
House with a dirt backyard	15	House dust	15	Yes	1
		Soil	8	Yes	1
		Pigeon Droppings	1	No	0
		Air	8	No	0
Apartment	10	House dust	10	No	0
		Air	3	No	0
Total	51		77		3

## DISCUSSION

Cryptococcosis is an important public health problem that contributes significantly to morbidity and early mortality in individuals with HIV/AIDS [21]. Worldwide, *C. neoformans* VNI is the most common molecular type [7, 8, 22], while

*C. neoformans* VNII appears in 1–16% of cases in South America, Africa and Oceania [22]. In the Amazonas State, *C. neoformans* VNI remains the

aetiological agent that is most present in cases of cryptococcosis associated with AIDS [8–10] and, about 10 years after the first report in the state of Amazonas [9], a case of *C. neoformans* VNII was again identified.

*Cryptococcus gattii* VGII and *C. gattii* VGI were identified in this study. *C. gattii* is usually associated with immunocompetent individuals in areas with either a tropical or subtropical climate [11, 22–24], but they also infect



immunocompromised individuals [25], and VGI has started to emerge in Europe, Australia and Asia [22, 26, 27]. VGI was observed as an agent of cryptococcosis for the first time in northern Brazil in the state of Pará and the case involved an immunocompetent child [28], though it was evidenced for the first time in the Amazonas state in the present study in an individual with HIV/AIDS.

A total of 98.2% ( $n = 54/55$ ) patients presented neuroc- ryptococcosis, while 1.8% ( $n = 1/55$ ) (P51) presented the iso-lated pulmonary form, which is poorly diagnosed, since the spread of infection to the central nervous system normally occurs [28]. Meningitis is the most common form and has a higher mortality rate in individuals with HIV/AIDS [29, 30]. The clinical manifestations and neurological sequelae observed in our study corroborate the work of Rocha et al. [10]. Mental alterations are contributing factors for the progression of these patients to death [31], and seizures were ob-served in 18.1% of patients, indicating and advanced stage of the disease. Pastick et al. [32] associated seizures with reduced neurocognitive function and increased mortality at 10 weeks.



**FIGURE 2** *Cryptococcus* isolation process from environmental samples collected at the patient's home: (a) Typical dirt backyard where soil was collected; (b) Sample processed in Niger seed agar (NSA) for isolation of *Cryptococcus*; (c) phenoloxidase positive colony subcultivated in NSA

Although access to highly active antiretroviral therapy (HAART) has improved globally, there is still a substantial number of individuals with HIV with CD4T cell counts  $<100$  cells/mm<sup>3</sup> [33]. Cryptococcosis, in many cases is the first indication that HIV infection has evolved into AIDS, it is considered a defining disease of AIDS since it is associated with low counts of CD4T lymphocytes in the blood (below 100 cells) [34, 35]. In our study, 21.8% ( $n = 12/55$ ) of patients discovered that they had HIV when they were hospitalised for cryptococcosis.

Mortality was observed mainly when the CD4T cell count was  $<50$  cells/mm<sup>3</sup> and in cases of diagnosis of cryptococcosis and HIV/AIDS. Early death was observed in 21.8% ( $n = 12/55$ ). Of these, 7.2% ( $n = 4/55$ ) did not use antifungal agents, since they died within 1–3 days of hospitalisation. In another study conducted in Manaus, Souza et al. [36] also observed early death of patients with a mean survival of 15 days.

Irregular adherence to the use of HAART, the unavailability of rapid methods for early diagnosis and the lack of antifungal treatment lead to a high frequency of deaths from cryptococcosis; in addition, the appearance of severe clinical presentations also indicate late diagnosis [5, 7, 28]. Vidalet al. [37] suggest the adoption of routine cryptococcal antigen (CrAg) screening in patients infected with HIV with CD4T  $<200$  cells/mm<sup>3</sup>, regardless of HAART status.

The different molecular types exhibit different virulence and susceptibility patterns to antifungal agents, and it should be noted that mixed infections may be of particular importance for patient treatment [38]. Mixed infections have been observed in other studies [38–41], including patients with up to three distinct molecular types of *Cryptococcus*. We identified two cases of mixed infection (Table 1); one case (P5) from the state of Rondônia, in which *C. neoformans* VNI and *C. neoformans* VNII that were obtained from different collections during the same hospitalisation, with the patient presenting a CD4T of 4 cells/mm<sup>3</sup>, and another patient (P13) with CD4T of 7 cells/mm<sup>3</sup>, a resident of Manaus that presented one isolate of *C. neoformans* VNI and three isolates of *C. gattii* VGI (Table 1). It is noteworthy that the isolates of VGI, VGI and VNI, in this sequence, were obtained with intervals of one month from CSF samples and again, after five months, in CSF a third isolate of VGI was identified. It is possible that a re-infection has occurred, but the most likely cause in this case is a relapse caused by the same strain, since the fungal agent can persist for a long time in lesions in the host [38].

Infection by *C. neoformans*/*C. gattii* is caused by inhalation of infective fungal propagules present in nature [42, 43] and depends on the exposure of individuals to certain environments

where there is the presence of the pathogen. The size of the inhaled fungus, the time of exposure to this agent, the virulence of the strain and the immune response of the host are very important in this context [44]. In our work, we identified three environmental isolates of *C. neoformans* VNI, and in other studies, VNI was also isolated from household dust [14, 45] and soil from the homes of AIDS patients [45], decaying wood and woodlice [14], as well as pigeon excreta [46]. These studies show household dust as a potential source for human infection [18], in addition to the importance of this environment, and the follow-up of patients that have already been treated due to the possibility of reinfection after return to the home [46].

In our study, most cases are concentrated in the city of Manaus, where there are recurrent anthropogenic actions such as areas of the forest being cleared for expansion of the city (Figure 1). Although *C. gattii* was not isolated in any household, the molecular type VGII has already been isolated in the urban environment of Manaus [17, 46], which was in a sample of decomposing wood collected in the Adolpho Ducke Forest Reserve and also in water samples of the Negro River and Tarumã River, and these are important areas in Manaus that suffer from anthropic actions [47].

In most of the homes visited, the presence of pigeons in the extradomicile was reported. Pigeons have become increasingly present in urban ecosystems, and have become an environmental and public health problem [48]; and *C. neoformans* VNI has been isolated in this environment [16, 48]. In addition, activities, such as soil disturbance, fallen trees and deforestation, are also associated with *Cryptococcus* infection [12]. An interesting fact is that the three households in which isolates were found were houses with a yard, and one of the isolates was obtained from soil that had been turned over. Household dust and soil may have been the sources of infection by *C. neoformans* VNI.

Air impaction collectors are used indoors to control air quality since it is possible to control the amount of samples and homogeneous distribution of particles [49]. The method used for air collection only allowed us to evaluate the air at the specific time of collection; however, there was no detection of the fungus. Nonetheless, it is possible that the fact that suspended airborne particles depend on factors such as wind direction, intensity of atmospheric current, air humidity and circulation of people [50] and this could be considered a limitation of our study.

## CONCLUSIONS

*Cryptococcus neoformans* VNI is the most common molecular type that causes neurocryptococcosis in individuals, with cryptococcosis being associated with HIV/AIDS in

Manaus, Amazonas and an important indicator of AIDS. A greater diversity of molecular types was observed affecting these patients and *C. gattii* VGI was identified as an agent of cryptococcosis for the first time in the Amazonas state, and two cases of mixed infection were observed. Although the study was carried out with a small number of individuals, the high lethality demonstrates a late diagnosis of cryptococcosis, in addition to the diagnosis of HIV/AIDS itself and, consequently, late treatment. Our study shows the presence of *C. neoformans* VNI in the home environment, which constitutes a potential source of infection or reinfection for patients. These data suggest a need for continuous monitoring of cases of cryptococcosis associated with HIV/AIDS in the state, and both clinical and epidemiological data and the investigation of environmental sources for better case management, which should facilitate early diagnosis, adequate therapy and the reduction of severe clinical forms and the mortality rate.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to recognise funding received from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (Public call N. 002/2018 – UNIVERSAL AMAZONAS/FAPEAM) and PROEP/LABS/ILMD Fiocruz Amazônia LDMAIS.

#### REFERENCES

1. Kwon-Chung KJ, Bennett JE, Wickes BL, Meyer W, Cuomo CA, Wollenburg KR, et al. The case for adopting the “species complex” nomenclature for the etiologic agents of Cryptococcosis. *mSphere*. 2017;2(1):e00357-16.
2. Farrer RA, Chang M, Davis MJ, van Dorp L, Yang D-H, Shea T, et al. A new lineage of *Cryptococcus gattii* (VGV) discovered in the central Zambesian Miombo Woodlands. *JMBE*. 2019;10(6):e02306-19.
3. Hagen F, Khayhan K, Theelen B, Kolecka A, Polacheck I, Sionov E, et al. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. *Fungal Genet Biol*. 2015;78:16–48. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.02.009>
4. Antinori S, Galimberti L, Magni C, Casella A, Vago L, Mainini F, et al. *Cryptococcus neoformans* infection in a cohort of Italian AIDS patients: natural history, early prognostic parameters, and autopsy findings. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2001;20:711–7.
5. Rajasingham R, Smith RM, Park BJ, Jarvis JN, Govender NP, Chiller TM, et al. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. *Lancet Infect Dis*. 2017;17(8):873–81. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30243-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30243-8)
6. Prado M, da Silva MB, Laurenti R, Travassos LR, Taborda CP. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104(3):513–21.
7. Soares EA, Lazera MS, Wanke B, Ferreira MF, de Oliveira RVC, Coutinho ZF, et al. Mortality by Cryptococcosis in Brazil from 2000 to 2012: a descriptive epidemiological study. *PLoS Negl Trop Dis*. 2000;2019:1–17.
8. Trilles L, Lazera MDS, Wanke B, Oliveira RV, Barbosa GG, Nishikawa MM, et al. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008;103(5):455–62.
9. Freire AK, Bentes AS, Sampaio IL, Matsuura AB, Ogusku MM, Salem JI, et al. Molecular characterisation

- of the causative agents of Cryptococcosis in patients of a tertiary healthcare facility in the state of Amazonas-Brazi. *Mycoses*. 2012;55(3):145–50.
10. Rocha DFS, Cruz KS, Santos CSDS, Menescal LSF, Neto JRDS, Pinheiro SB, et al. MLST reveals a clonal population structure for *Cryptococcus neoformans* molecular type VNI isolates from clinical sources in Amazonas, Northern-Brazil. *PLoS One*. 2018;13(6):1–15.
  11. Pinheiro SB, Souza ES, Cortez AC, Rocha DF, Menescal LSF, Chagas VS, et al. Cryptococcal meningitis in non-HIV patients in the State of Amazonas, Northern Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 2021;52:279–88. Lazera MS, Salmito Cavalcante MA, Londero AT, Trilles L, Nishikawa MM, Wanke B. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. *Med Mycol.* 2000;38:379–83.
  12. Firacative C, Lizarazo J, Illnait-Zaragozı MT, Castaıeda E. Latin American Cryptococcal Study Group5. The status of cryptococcosisin Latin America. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2018;113(7):e170554.
  13. Costa SDPSE, Lazéra MDS, Santos WRA, Morales BP, Bezerra CCF, Nishikawa MM, et al. First isolation of *Cryptococcus gattii* molecular type VGII and *Cryptococcus neoformans* molecular type VNI from environmental sources in the city of Belém, Pará, Brazil. *Mem Inst Oswaldo.* 2009;104(4):662–4.
  14. Igreja RP, Lazéra MDS, Wanke B, Galhardo MCG, Kidd SE, Meyer W. Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients of the Brazilian city, Rio de Janeiro. *Med Mycol.* 2004;42: 229–38.
  15. Alves GSB, Freire AKL, Bentes AS, Pinheiro JFS, Souza JVB, Wanke B, et al. Molecular typing of environmental *Cryptococcus neofor- mans/C. gattii* species complex isolates from Manaus, Amazonas, Brazil. *Mycoses.* 2016; 59(8): 509-15.
  16. Brito-Santos F, Barbosa GG, Trilles L, Nishikawa MM, Wanke B, Meyer W, et al. Environmental isolation of *Cryptococcus gattii* VGII from indoor dust from typical wooden houses in the deep Amazonas of the Rio Negro Basin. *PLoS One.* 2015;10(2):e0115866. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115866>
  17. VIGIWEB. Sistema de informaoes operacionais e epidemiológicas da Fundaao de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado – FMT/HVD. [www.fmt.am.gov.br/layout2011/vigiweb/vg\\_2019](http://www.fmt.am.gov.br/layout2011/vigiweb/vg_2019)
  18. Lazera MS, Pires FDA, Nishikawa MM, Bezera CCF, Trilles L, Wanke B. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in decaying wood forming hollows in living trees. *J Med Vet Mycol, Oxfordshire.* 1996;34(2):127–31.
  19. Meyer W, Castaıeda A, Jackson S, Huynh M, Castaıeda E. Molecular typing of Ibero American *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerg Infect Dis.* 2003;9:189–95.
  20. Odegbemi OB, Dada-Adegbola HO, Adeoye IA, Fayemiwo SA. Epidemiology of Cryptococcal antigenemia among HIV infected patients in southwestern Nigeria. *Global Biosecurity.* 2019;1(3).
  21. Cogliati M. Global molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: an Atlas of the molecular types. *Scientifica.* 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/675213>
  22. Kidd SE, Hagen F, Tscharke RL, Huynh M, Bartlett KH, Fyfe M, et al. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *Proc Natl Acad Sci.* 2004;101(49):17258–63.
  23. Diaz JH. The disease ecology, epidemiology, clinical manifestations, and management of emerging *Cryptococcus gattii* complex infections. *Wilderness Environ Med.* 2020;31(1):101e9.
  24. Matsumoto MT, Fusco-Almeida AM, Baeza LC, Melhem MSC, Mendes-Giannini MJS. Genotipagem, sorotipagem e determinaao de mating-type de isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans* do Estado de Sao Paulo, Brasil. *Rev Inst Med Trop S Paulo.* 2007;39:3–6.
  25. Hwang SM. Molecular typing of clinical *Cryptococcus gattii* isolates in Korea. *J Bacteriol Virol.* 2012;42:152–5.
  26. Xue X, Tang W, Zang X, Ke W, Liu Y, Li Z. *Cryptococcus gattii* VGIs subtypes: geographical distribution, molecular traits, and virulence difference. *Europe PMC.* 2021. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-942229/v1>
  27. Santos WRAD, Meyer W, Wanke B, Costa SPSE, Trilles L, Nascimento JLM, et al. Primary endemic *Cryptococcosis gattii* by molecular type VGII in the state of Pará, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008;103(8):813–8.
  28. Carrijo AV, Carrijo BV, Machado LN, Almeida RJ, Oliveira PPC. Clinical-epidemiological analysis of cryptococcosis and hiv coinfection: a systematic review. *BASR.* 2021;5(2):802–17.
  29. Chen C-H, Li H, Chen H-M, Chen Y-M, Chang Y-J, Lin P-Y, et al. Efficacy of induction regimens for cryptococcal meningitis in HIV- infected adults: a systematic review and network meta-analysis. *Sci Rep.* 2021;11:8565.
  30. Jarvis JN, Bicanic T, Loyse A, Namarika D, Jackson A, Nussbaum JC, et al. Determinants of mortality in a

- combined cohort of 501 patients with HIV-associated cryptococcal meningitis: implications for improving outcomes. *Clin Infect Dis*. 2014;58:736–45.
31. Pastick KA, Bangdiwala AS, Abassi M, Flynn AG, Morawski BM, Musubire AK, et al. Seizures in human immunodeficiency virus-associated cryptococcal meningitis: predictors and outcomes. *Open Forum Infect Dis*. 2019;6(11).
  32. Lahuerta M, Wu Y, Hoffman S, Elul B, Kulkarni SG, Remien RH, et al. Advanced HIV disease at entry into HIV care and initiation of antiretroviral therapy during 2006–2011: findings from four sub-Saharan African countries. *Clin Infect Dis*. 2014;58:432–41.
  33. Durden FM, Elewski B. Fungal infections in HIV-infected patients. *Sem Cut Med Surg*. 1997;116:200–12.
  34. Nadrous HF, Antonios VS, Terrell CL, Ryu JH. Pulmonary cryptococcosis in non immunocompromised patients. *Chest*. 2003;124(6):2143–7.
  35. Souza SLS, Feitoza PVS, Araujo JR, Andrade RV, Ferreira LCL. Causas de óbito em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida, necropsiados na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008;41(3):247–51.
  36. Vidal JE, Toniolo C, Paulino A, Colombo A, dos Anjos Martins M, da Silva Meira C, et al. Asymptomatic cryptococcal antigen prevalence detected by lateral flow assay in hospitalised HIV-infected patients in São Paulo, Brazil. *Trop Med Int Health*. 2016;21(12):1539–44.
  37. Kassi FK, Drakulovski P, Bellet V, Roger F, Chabrol A, Krasteva D, et al. *Cryptococcus* genetic diversity and mixed infections in Ivorian HIV patients: a follow up study. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13(11):1–9.
  38. Desnos-Ollivier M, Patel S, Spaulding AR, Charlier C, Garcia-Hermoso D, Nielsen K, et al. Mixed infections and in vivo evolution in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *ASM*. 2010;1:e00091-10.
  39. Tomazin R, Matos T, Meis JF, Hagen F. Molecular characterization and antifungal susceptibility testing of sequentially obtained clinical *Cryptococcus deoneformans* and *Cryptococcus neoformans* isolates from Ljubljana, Slovenia. *Mycopathologia*. 2018;183(2):371–80.
  40. Kassi FK, Bellet V, Doumbia A, Krasteva D, Drakulovski P, Kouakou GA, et al. First case of mixed infection with *Cryptococcus deuterogattii* and *Cryptococcus neoformans* VNI in an Ivorian HIV-positive patient. *JMM Case Reports*. 2016;3(4). <https://doi.org/10.1099/jmmcr.0.005037>
  41. Leite DP, Amadio JVRS, Martins ER, Simões SAA, Yamamoto ACA, Leal-Santos FA, et al. *Cryptococcus* spp isolated from dust microhabitat in Brazilian libraries. *J Occupat Med Toxicol*. 2012;7:11.
  42. Noguera MC, Escandón P, Castañeda E. Cryptococcosis in Atlántico, Colombia: an approximation of the prevalence of this mycosis and the distribution of the etiological agent in the environment. *Rev da Soc Bras de Med Trop*. 2015;48(5):580–6.
  43. Damasceno LS, Leitão TMJS, Taylor ML, Muniz MM, Zancopé-oliveira RM. The use of genetic markers in the molecular epidemiology of histoplasmosis: a systematic review. *EJCMID*. 2016;35:19–27.
  44. Swinne D, Deppner M, Laroche R, Floch JJ, Kadende P. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from houses of AIDS-associated cryptococcosis patients in Bujumbura (Burundi). *AIDS*. 1989;3(6):389–90.
  45. Passoni LFC. *Cryptococcus neoformans* em ambiente domiciliar: estudo de residências de aidéticos e não aidéticos com e sem criptococose e de indivíduos aparentemente saudáveis na região metropolitana do Rio de Janeiro. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical), do Instituto Oswaldo Cruz, Rio De Janeiro; 1994.
  46. dos Santos Bentes A, Wanke B, dos Santos Lazéra M, Freire AKL, da Silva Júnior RM, Rocha DFS, et al. *Cryptococcus gattii* VGII isolated from native forest and river in Northern Brazil. *Braz J Microbiol*. 2019;50(2):495–500
  47. Ribeiro EA, Tomich GM, Alves AG, Santos KS. Occurrence of *Cryptococcus neoformans* in the excreta of urban pigeons in the municipality of Redenção in Amazônia. Brazil. *Acta Biomedica Brasiliensia*. 2019;10:27–34.
  48. Tavora LGF, Gambalez W, Heins-vaccaria EM, Arriagada GLH, Lacaz CS, Santos CR, et al. Comparative performance of two air samplers for monitoring airborne fungal propagules. *Braz J Med Biol Res*. 2003;36:613–6.
  49. Baroni FDA, Paula CR, Silva ÉGD, Viani FC, Rivera ING, Oliveira MTBD, et al. *Cryptococcus neoformans* strains isolated from church towers in Rio de Janeiro city, RJ, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2006;48(2):71–5.

## 6. **CAPÍTULO 2:** Suscetibilidade antifúngica e MLST do complexo *C. neoformans* de pacientes com meningite criptocócica associada ao HIV em Manaus, Amazonas-Brasil

Neste capítulo é apresentado o segundo artigo, ainda não publicado, intitulado “*Antifungal susceptibility and MLST of C. neoformans complex from HIV-associated cryptococcal meningitis patients in Manaus, Amazonas-Brazil*”, onde são apresentados os resultados relacionados ao teste susceptibilidade dos isolados de *C. neoformans* aos antifungicos Anfotericina B, Fluocitosia, Fluconazol, Itraconazol e Posaconazol. São apresentados também os STs de *C. neoformans* identificados pelo MLST.



## Titulo: Antifungal susceptibility and MLST of *C. neoformans* complex from HIV-associated cryptococcal meningitis patients in Manaus, Amazonas-Brazil

Authors: Marla Jalene Alves<sup>1,2</sup>, Katia Santana Cruz<sup>3</sup>, Gleica Soyan Barbosa Alves<sup>4</sup>, Maria Eduarda Grisolia<sup>1</sup>, Victoria Violeta Fernandes Menescal<sup>1</sup>, Izabella Sadalla do Nascimento<sup>1</sup>, Lizandra Stephanny Fernandes Menescal<sup>3</sup>, Silviane Bezerra Pinheiro<sup>5,6</sup>, Felipe Almeida da Silva<sup>7</sup>, Luciana Trilles<sup>7</sup>, João Vicente Braga de Souza<sup>5</sup>, Marcia dos Santos Lazera<sup>2,7</sup>, Ani Beatriz Jackisch Matsuura<sup>1</sup>

1. Laboratório de Diversidade Microbiana da Amazônia com Importância para a Saúde, Instituto Leônidas e Maria Deane – FIOCRUZ, Manaus, Amazonas, Brazil
2. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Convenio ILMD/IOC – FIOCRUZ, Manaus, Amazonas, Brazil
3. Laboratório de Micologia Médica, Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus, Amazonas, Brazil
4. Universidade Federal do Amazonas - UFAM
5. Laboratório de Micologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, Amazonas, Brazil
6. Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, Amazonas, Brazil
7. Laboratório de Micologia, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil.

Correspondencia: Ani Beatriz Jackisch Matsuura, Laboratório de Diversidade Microbiana da Amazônia com Importância para a Saúde, Instituto Leônidas e Maria Deane – FIOCRUZ, Manaus, Amazonas, Brazil. Email: ani.matsuura@fiocruz.br

### RESUMO

*C. neoformans* é o principal responsável pelos casos de meningite criptocócica em indivíduos com algum tipo de deficiência imunológica, especialmente indivíduos com HIV/AIDS. No estado do Amazonas, norte do Brasil, a criptococose é considerada endêmica e uma importante causa de óbito em indivíduos com HIV/Aids. Este estudo avaliou a susceptibilidade de isolados de *C. neoformans* obtidos de indivíduos com meningite criptocócica associada a HIV/Aids em Manaus-Amazonas-Brasil frente a ação dos antifúngicos Anfotericina B, Flucitosina, Fluconazol, Itraconazol e Posaconazol e analisou por MLST afim de identificar os STs e comparar com isolados já identificados em outros estudos. Também foram analisados 3 isolados ambientais: 1 isolado de solo obtido no domicilio de um paciente e 2 isolados de poeira domiciliar obtidos de domicílios vizinhos dos pacientes. Foram analisados 30 isolados de *C. neoformans*, de 24 pacientes com HIV/Aids diagnosticados com criptococose de 2017 a 2019 em um hospital de referência em Manaus-AM-Brasil, além de 3 isolados ambientais. 86,6% (n=26/30) dos isolados clínicos foram identificados como *C. neoformans* VNI com ST93, 6,6% (n=2/30) como *C. neoformans* VNI com ST5, 3,3%

(n=1/30) como *C. neoformans* VNI com ST32 e 3,3% (n=1/30) como *C. neoformans* VNB com ST232. Os isolados ambientais foram identificados como *C. neoformans* VNI com ST93 (n= 3/3). 96,6% (n= 29/30) isolados se mostraram sensíveis a Anfotericina B, mas houve variação da CIM. 60% (n=18/30) apresentaram CIM acima dos ECVs propostos para um ou mais antifúngicos. Todos os isolados ambientais foram sensíveis aos antifúngicos testados. O MLST mostrou que há uma importante relação de *C. neoformans* VNI com ST93 com indivíduos com HIV/Aids, inclusive nos isolados ambientais analisados, mas esse ST não é exclusivo em associação a HIV/Aids na região. *C. neoformans* VNB com ST 232 foi observado pela primeira no estado do Amazonas, sendo o segundo isolamento clínico deste subtipo no Brasil. A Anfotericina B se mostrou o melhor medicamento de escolha para o tratamento da maioria dos pacientes. O Fluconazol e o Posaconazol também demonstraram relevante ação frente aos antifúngicos testados.

Keywords: Criptococose, *Cryptococcus*, HIV/AIDS, antifúngicos, MLST, Amazonas.

## INTRODUÇÃO

A criptococose é uma infecção fungica invasiva global com considerável morbidade e mortalidade <sup>(1)</sup>, sendo a meningite criptocócica uma das infecções oportunistas que mais acomete indivíduos com HIV/Aids <sup>(2)</sup>. Em países latino-americanos *C. neoformans* VNI é o principal agente de criptococose associado a HIV/Aids <sup>(3)</sup>.

No estado do Amazonas (AM), norte do Brasil, casos de meningite com diversas etimologias tem sido observados desde 1976, com um total de 3.850 casos até 2012, dos quais 0.8% (n=28) eram meningite criptocócica <sup>(4)</sup>. De 2014 a 2016 Rocha et al. (2018) <sup>(5)</sup>, observaram 26 casos de criptococose associada a Aids, destes, 25 foram causados por *C. neoformans* VNI com ST93. De 2017 a 2019 Alves et al. (2022) <sup>(6)</sup> identificaram um total de 83 casos, cuja maioria estava relacionada a *C. neoformans* VNI.

No Brasil, embora o sistema público de saúde forneça terapia antirretroviral (TARV) gratuita a taxa de mortalidade por meningite criptocócica causada por *C. neoformans* ainda permanece alta <sup>(7)</sup>. De acordo com o regime de indução padrão internacional o tratamento da meningite criptocócica é realizado com Anfotericina B e Flucitosina, seguida de Fluconazol <sup>(8)</sup>. No entanto na América latina, a Flucitosina não está disponível e a indução de terapia combinada, de Anfotericina com Fluconazol, não é frequente <sup>(9)</sup>. A terapia adequada juntamente com o diagnóstico precoce são

essenciais para a redução de óbitos e sequelas da meningite criptocócica, então o surgimento de cepas resistentes aos antifúngicos usados para o tratamento da criptococose é algo que dificulta ainda mais uma terapia antifúngica eficaz <sup>(10)</sup>.

Alves et al. (2022) <sup>(6)</sup> relataram alta taxa de mortalidade por meningite criptocócica em pacientes com HIV/Aids em Manaus, AM-Brasil, refletindo a importância da criptococose como doença definidora de Aids e um importante problema de saúde pública na região, além de mostrar o ambiente domiciliar como potencial fonte de infecção/reinfecção por *C. neoformans* VNI. Então a vigilância epidemiológica da resistência antifúngica de *Cryptococcus*, na região Amazônica, é muito importante frente à carga potencial e alta letalidade da meningite criptocócica <sup>(10)</sup>.

O presente trabalho teve como objetivo determinar a susceptibilidade de isolados de *Cryptococcus neoformans* obtidos de indivíduos com HIV-Aids diagnosticados com meningite criptocócica em um hospital de referência para os casos de Aids em Manaus-Amazonas, Brasil, e identificar os STs responsáveis pela infecção nos pacientes através do MLST.

## MÉTODOS

### OBTENÇÃO DOS ISOLADOS E APROVAÇÃO ÉTICA

Foram obtidos 30 isolados clínicos de *C. neoformans* de 24 pacientes com HIV/Aids diagnosticados com criptococose na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) de 2017 a 2019. Os isolados estavam mantidos em agar sabouraud dextrose a 4°C no laboratório de Micologia da FMT e nos foram cedidos para a realização dos experimentos que procederam no Laboratório de Micologia do Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD/FIOCRUZ). O estudo foi conduzido de acordo com as diretrizes da Declaração de Helsinque e aprovado pelo Comitê de Ética da Fundação de Medicina Tropical Doutor Vieira Dourado (protocolo código CAAE nº 82715917.4.0000.0005).

Também foram utilizados três isolados ambientais de *C. neoformans* obtidos de domicílios de pacientes e vizinhos de pacientes. Foi feita coleta de amostras ambientais de poeira domiciliar, solo, excreta de aves e ar em 51 domicílios (17 de

pacientes e 34 de casas vizinhas) para verificar a presença do fungo (Alves et al. 2022). Destas foram obtidos os 3 isolados de *C. neoformans* utilizados neste estudo: 1 isolado proveniente de solo da casa de um paciente e 2 isolados de poeira domiciliar da casa de vizinhos de pacientes.

## MLST (MULTI-LOCUS SEQUENCE TYPING) DOS ISOLADOS

O DNA foi extraído com o kit de extração QIAamp Tissue and Blood (Qiagen, Hilden, Germany) de acordo com fabricante acrescido de uma pré-fase de maceração mecânica com beads de vidro. Foi feita a tipagem molecular por PCR-RFLP com amplificação dos primers URA5 e SJ01, seguida de digestão enzimática com *HhaI* e *Sau961* (ThermoScientific) de acordo com Meyer et al. (2003) <sup>(11)</sup>. Os isolados de *C. neoformans* foram submetidos ao MLST pela amplificação dos genes CAP59, GPD1, LAC1, PLB1, SOD1, IGS1 e URA5 de acordo com as condições propostas por Meyer et al. (2009) <sup>(12)</sup>. Os amplicons foram purificados e sequenciados de acordo com as instruções do fabricante do Kit BigDye®Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit" (Applied Biosystems). A eletroforese capilar foi realizada em sequenciador ABI 3130 Genetic Analyzer. As sequências foram editadas manualmente usando o software Sequencher 5.3 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, EUA) e os contigs alinhados no programa MEGA v6.06. As sequencias foram analisadas no banco de dados do MLST (<http://mlst.mycologylab.org>) para determinação dos alelos e ST. Para verificar a relação genética dos isolados foi construída uma árvore filogenética com base no modelo neighbor-joining (NJ), com análise bootstrap usando 1.000 réplicas, utilizando STs relacionados.

## TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS

Foram utilizadas fitas de Etest® (Biomérieux) com os antifúngicos: Anfotericina B, Flucitosina, Fluconazol, Itraconazol e Posaconazol. Foram utilizadas placas de Petri contendo RPMI 1640 (Himedia Laboratorios Pvt. Ltd., Mumbai), suplementado com 1,5% de ágar e 2% de glicose e, tamponado a pH 7.00 ±0.01 com Ácido 3NMorfolinopropanossulfônico – MOPS (SigmaAldrich) com espessura de 0.4mm ±0.1. O inóculo foi preparado a partir de colônias *Cryptococcus* cultivadas em meio Ágar Sabouraud e solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,85%, homogeneizadas para

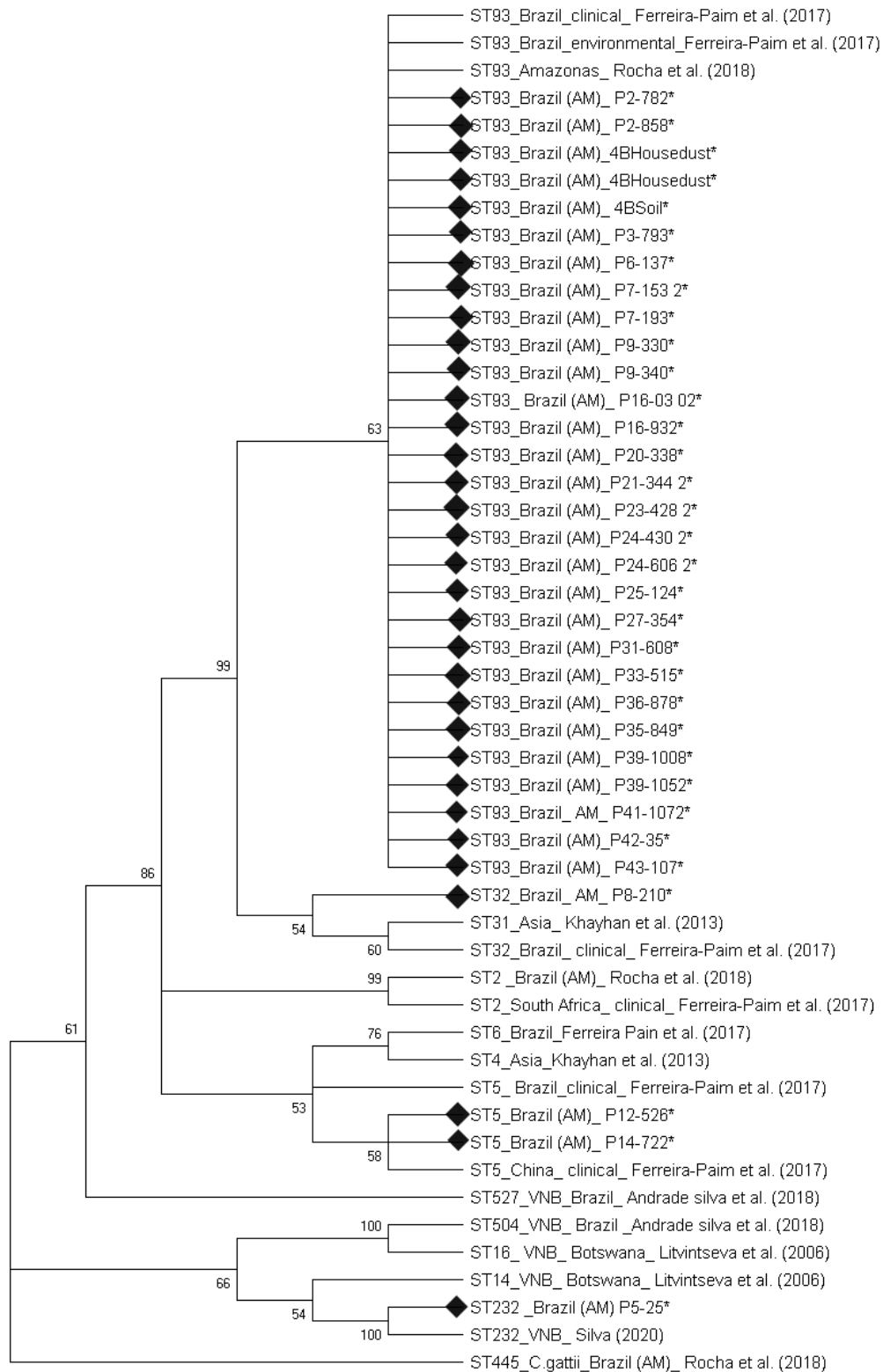
uma turvação 1 na Escala de McFarland. Os valores de cortes foram realizados de acordo com Spinel-Ingroff et al. (2012a e 2012b) <sup>(13,14)</sup>. Para análise da determinação da média geométrica foi utilizado o software Whonet. Para calcular a Concentração Inibitória Mínima 90 (CIM90), e Média Geométrica, foi utilizado o valor correspondente a 100% de inibição do crescimento fúngico para Anfotericina, 95% para Flucitosina e 80% para os azólicos, conforme orientação do protocolo de leitura do Etest.

## RESULTADOS

### MLST DOS ISOLADOS CLÍNICOS E AMBIENTAIS DE *C. NEOFORMANS*

Foi analisado um total de 33 isolados: 30 isolados clínicos e 3 isolados ambientais de *C. neoformans*. Dos isolados clínicos 86,6% (n=26/30) foram identificados como *C. neoformans* VNI com ST93, 6,6% (n=2/30) como *C. neoformans* VNI com ST5, 3,3% (n=1/30) como *C. neoformans* VNI com ST32 e 3,3% (n=1/30) como *C. neoformans* VNB com ST 232. Os isolados ambientais foram identificados como *C. neoformans* VNI com ST93 (n= 3/3) (Tabela 1). A análise filogenética mostra um agrupamento de todos os isolados do ST93, tanto clínicos quanto ambientais, com outras sequencias utilizadas como referência. O isolado de *C. neoformans* VNB com ST 232 e as sequências de referência, com exceção do ST527, formaram um cluster a parte (Figura 1).

Figura 1. Árvore filogenética pelo algoritmo Neighbor-Joining (bootstrap com 1000



réplicas) feita com as seqüências concatenadas dos genes CAP59, GPD1, LAC1, PLB1, SOD1, URA5 e IGS. ◆ Isolados obtidos no presente estudo.

## SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS

Os isolados de *C. neoformans* (ambientais e clínicos) apresentaram grande variação da CIM para todos os antifúngicos testados, mas a maior variação foi observada para Flucitosina. 40% (n=12/30) dos isolados se mostrou sensível a todos os antifúngicos testados. 60% (n=18/30) dos isolados clínicos apresentaram CIM acima dos EVs propostos para um ou mais antifúngicos. O isolado P33-515 apresentou CIMs elevadas para Anfotericina, Fluconazol e Itraconazol, somente este isolado se mostrou resistente a Anfotericina B, sendo sensível apenas para Flucitosina e Posaconazol. 10% (n= 3/30) dos isolados clínicos demonstraram CIM acima do estabelecido para Fluconazol. Isolados de um mesmo paciente, obtidos em um intervalo de 15 dias, mostraram resultados diferentes frente aos antifúngicos, enquanto o isolado P24-430/02 não teve CIM elevada para nenhum antifúngico, o isolado P24-606/02 apresentou CIM acima dos ECVs propostos para Itraconazol e Posaconazol. O isolado P39-1008 apresentou CIM acima dos ECVs propostos para Fluconazol e Itraconazol, já o isolado P39-1052 apresentou CIM acima só para Itraconazol. Nenhum dos isolados ambientais apresentou CIM acima dos ECVs propostos (tabela 1). A média geométrica e Mic90 podem ser observados na tabela 2.

Tabela 1. Descrição dos 33 isolados (clínicos e ambientais), Id dos isolados, ST e CIMs observados no E-test.

ISOLADOS			CIM (E-TEST)					
Tipo de amostra	ID isolado	Tipo molecular	ST	AMB	5-FC	FCZ	ITR	POS
Clínica	P2-782	CN VNI	93	0,125	16	0,75	0,94	0,016
Clínica	P2-858	CN VNI	93	0,125	6	2	0,19	0,064
Clínica	P3-793	CN VNI	93	0,125	1	0,125	0,064	0,032
Clínica	P6-137	CN VNI	93	0,125	6	1	0,094	0,016
Clínica	P7-153-2	CN VNI	93	0,25	6	3	0,19	0,125
Clínica	P7-193	CN VNI	93	0,125	6	2	0,19	0,094
Clínica	P8-210	CN VNI	32	0,125	0,5	3	0,19	0,064
Clínica	P9-330	CN VNI	93	0,125	4	2	0,125	0,032
Clínica	P9-340	CN VNI	93	0,25	6	2	0,19	0,125
Clínica	P12-526	CN VNI	5	0,25	> 32	3	0,38	0,047
Clínica	P14-722	CN VNI	5	0,125	4	1,5	0,38	0,125
Clínica	P16-03/02	CN VNI	93	0,19	4	1,5	0,38	0,094

Clínica	P16-932	CN VNI	93	0,19	6	4	0,5	0,19
Clínica	P20-338/2	CN VNI	93	0,032	> 32	1	0,19	0,047
Clínica	P21-344/2	CN VNI	93	0,125	12	1,5	0,25	0,094
Clínica	P23-428/2	CN VNI	93	0,125	0,125	8	> 32	1
Clínica	P24-430/02	CN VNI	93	0,25	1,5	2	0,19	0,064
Clínica	P24-606/02	CN VNI	93	0,125	0,032	12	> 32	2
Clínica	P25-124	CN VNI	93	0,25	8	6	0,19	0,094
Clínica	P27-354	CN VNI	93	0,25	24	1,5	0,19	0,094
Clínica	P31-608	CN VNI	93	0,25	12	3	0,25	0,094
Clínica	P33-515	CN VNI	93	>32	0,032	> 256	1	0,094
Clínica	P36-878	CN VNI	93	0,5	2	24	1	0,5
Clínica	P35-849	CN VNI	93	0,5	0,25	2	0,19	0,64
Clínica	P39-1008	CN VNI	93	0,38	6	24	0,75	0,25
Clínica	P39-1052	CN VNI	93	0,19	8	6	0,38	0,19
Clínica	P41-1072	CN VNI	93	0,25	12	6	0,38	0,125
Clínica	P42-35	CN VNI	93	0,19	8	1,5	0,19	0,064
Clínica	P43-107	CN VNI	93	0,25	> 32	0,75	0,125	0,064
Clínica	P5-25	CN VNB	232	0,125	1,5	0,75	0,125	0,064
Ambiental	Poeira casa 3b	CN VNI	93	0,125	3	1	0,125	0,064
Ambiental	Solo casa 4	CN VNI	93	0,19	8	2	0,19	0,064
Ambiental	Poeira casa 4b	CN VNI	93	0,125	4	6	0,19	0,125

AMB: ANFOTERICINA-B; 5-FC: FLUCITOSINA; FCZ: FLUCONAZOL; ITR: ITRACONAZOL; POS: POSACONAZOL; PC: PACIENTE. CIM ACIMA DOS ECVS PROPOSTOS POR ESPINEL-INGROFF ET AL. (2012A, 2012B) ESTÁ DESTACADO EM VERMELHO.

Tabela 2: Concentração inibitória mínima dos antifúngicos testados contra os 32 isolados (clínicos e ambientais) de *C. neoformans* VNI e VNII.

Antifúngicos	Faixa de CIM (µg/mL)	Média Geométrica (µg/mL)	CIM50(µg/mL)	CIM90 (µg/mL)
AMB	0,032 - 64	0,209	0,19	0,38
FCT	0,032 - 64	3,776	6	24
FLU	0,125 - 512	2,805	2	12
ITR	0,064 - 64	0,319	0,19	1
POS	0,016 - 2	0,095	0,25	0,25



## DISCUSSÃO

De acordo com Ficarative, Meyer & Castañeda (2021) <sup>(3)</sup> na América Latina, a população de *C. neoformans* tem menor diversidade de STs do que a população de *C. gattii*, sendo o ST93 o mais frequente, seguido de ST 77, ST2, ST5 e ST23. O ST93 também predomina entre os isolados ambientais. Ferreira-Paim et al. (2017) <sup>(7)</sup>, no sudeste do Brasil, relataram maior frequência do ST93 ao analisarem isolados clínicos de *C. neoformans* obtidos de pacientes com HIV/Aids e isolados ambientais. No norte do Brasil o ST93 também tem sido o principal subgenótipo de cepas de VNI causando criptococose em indivíduos com HIV/Aids <sup>(5)</sup>.

Rocha et al. (2018) <sup>(5)</sup>, em um estudo realizado de 2014 a 2016, ou seja, nos três anos que antecedem o nosso estudo, identificaram exclusivamente o ST93, em isolados de *C. neoformans* VNI, causando criptococose em 25 pacientes com HIV/Aids, em Manaus-AM, Brasil. Já no nosso estudo foram analisados 30 isolados de 24 pacientes com HIV/Aids diagnosticados com meningite criptocócica, 86,6% (n=26/30) foram identificados como ST93, no entanto também identificamos outros três STs, o ST5 e o ST32 (*C. neoformans* VNI), além do ST232 (*C. neoformans* VNB), que pela genotipagem por PCR-RFLP apresentou padrão molecular idêntico ao tipo molecular VNII (Alves et al. 2022) <sup>(6)</sup>.

Ferreira-Paim et al. (2017) <sup>(7)</sup>, também identificaram o ST32 em isolados clínicos de pacientes com criptococose, em Minas Gerais, sudeste do Brasil. Assim como no nosso estudo, o ST93, ST5 e ST32 foram relacionados a pacientes com HIV/Aids. *C. neoformans* com ST93, ST5 e ST32 também tem sido associado a Aids na Ásia <sup>(15,16)</sup>. No leste Asiático o ST5 é predominante <sup>(17)</sup>, mas no Brasil o isolamento deste subgenótipo é considerado raro <sup>(7,18)</sup>.

O isolamento do genótipo VNB em países fora do continente africano é considerado raro <sup>(19)</sup>. Previamente, no Brasil, o VNB foi identificado em isolados ambientais na região sudeste <sup>(18)</sup> e VNB com ST 232 em dois isolados clínicos de pacientes com HIV/Aids no Rio de Janeiro <sup>(20)</sup> e mais recentemente no nosso estudo.

Os três isolados ambientais de domicílios de paciente/vizinhos de pacientes são *C. neoformans* com ST93, corroborando com outros estudos de caráter ambiental <sup>(7,21)</sup>. Brito-Santos et al. (2020) <sup>(22)</sup> revelou um padrão endêmico em microambientes domésticos na microrregião do Rio Negro da Amazônia brasileira, observando a

presença de *C. neoformans* VNI com ST93 e também *C. neoformans* VNI com ST5.

Não há breakpoints clínicos bem estabelecidos nos documentos revisados do CLSI M27-A3 e CLSI M27-S3 para determinar a susceptibilidade de isolados de *C. neoformans/C.gattii* em testes com antifúngicos, assim usamos os valores de corte epidemiológicos (ECVs) estabelecidos por Espinel-Ingroff et al. (2012a, 2012b) <sup>(13,14)</sup>, que propõe a adoção de valores espécie-específicos. Optamos pelo uso do E-test, que tem sido considerado um ótimo método na distinção de leveduras resistentes a Anfotericina B <sup>(23,24)</sup>, além de ser reprodutível e mais simples que a diluição em caldo <sup>(24)</sup>. No entanto, Nishikawa et al. (2019) <sup>(10)</sup> em um estudo comparativo entre os sistemas Etest e Vitek 2 e a metodologia de microdiluição em caldo padronizado (CLSI-BMD) para susceptibilidade de cepas *C. neoformans* VNI e *C. gattii* VGII do norte do Brasil, relataram que o E-test apresentou mais fenótipos não selvagens (CIM abaixo do valor de referência) entre os isolados, e resultados discordantes dos demais métodos em relação a Anfotericina B, pois o E-test apresentou todas as cepas analisadas como sendo do tipo selvagem (CIM igual ou acima do valor de referência). Este mesmo estudo sugere uma ineficiência do E-test em detectar MICs altos para Anfotericina B, tal qual os valores observados no nosso estudo. No entanto o estudo de Nishikawa et al. (2019) <sup>(10)</sup> revelou várias inconsistências de valores de MIC entre ambos os testes.

Além disso, Rocha et al. (2018) <sup>(5)</sup>, em Manaus-Amazonas, Brasil, ao analisarem isolados de *C. neoformans* VNI com ST93 de pacientes com HIV/Aids, através da técnica de microdiluição em caldo observaram a susceptibilidade de todos os isolados a Anfotericina B, Fluconazol e Itraconazol, assim como Silva et al. (2012), bem como em outros estudos <sup>(5,25-27)</sup>. Já no nosso estudo, 60% (n=18/30) dos isolados clínicos apresentaram CIM acima dos ECVs propostos para um ou mais antifúngicos, com variação da CIM mesmo entre isolados do ST93, e apesar de 96,6% (n= 29/30) dos isolados clínicos testados terem se mostrado sensíveis a Anfotericina B, o isolado P33-515 apresentou CIMs acima do ECV proposto para este antifúngico. O Fluconazol também mostrou bons resultados frente os isolados analisados.

Em pacientes com HIV/Aids e meningite criptocócica a terapia de indução com anfotericina B mais flucitosina seguido de fluconazol até 10 semanas é o tratamento de escolha e após esse período faz-se a utilização de Fluconazol com dose reduzida de acordo com o estado clínico do paciente <sup>(8)</sup>. No Amazonas, o Fluconazol e a

Anfotericina B são os medicamentos de escolha para o tratamento dos pacientes com criptococose associada a HIV/Aids <sup>(5,6)</sup>.

Matos et al. (2012) <sup>(28)</sup>, ao analisarem isolados de pacientes com meningite criptocócica, na Bahia, Brasil, observaram isolados resistentes a Anfotericina B, Fluconazol e Flucitosina. No nosso estudo, o isolado P33-515 apresentou CIMs elevadas para Anfotericina B, Fluconazol e Itraconazol, com menores CIM para Flucitosina e Posaconazol. Em um estudo realizado por Molloy et al. (2018) <sup>(29)</sup> a associação de Anfotericina B mais Flucitosina mostrou menor mortalidade dos pacientes em 10 semanas, mas efeitos colaterais foram mais frequentes com 2 semanas do que com 1 semana de Anfotericina B. No entanto, no Amazonas, assim como em toda a América Latina a Flucitosina não encontra-se disponível. Em países onde a flucitosina não está disponível, o tratamento mais frequente é a monoterapia com Anfotericina B <sup>(9)</sup>, ou confia-se na indução de monoterapia com Fluconazol, no entanto a taxa de depuração fúngica do Fluconazol é mais lenta quando comparada a Anfotericina B, e a mortalidade é de 50 a 60% em 10 semanas, mesmo com o uso de doses elevadas <sup>(26)</sup>.

Quanto aos isolados ambientais, os resultados de CIM foram os mesmos observados na maioria dos isolados clínicos e a susceptibilidade foi semelhante a relatada em outros estudos ambientais, não sendo observado isolados resistentes aos antifúngicos testados <sup>(30-32)</sup>.

## CONCLUSÃO

*C. neoformans* VNI com ST93 é o principal envolvido nas infecções acometendo indivíduos com HIV/Aids no Brasil e em toda a América Latina. No Amazonas há uma predominância desse subgenótipo, mas há outros Sts presentes acometendo os indivíduos com HIV/Aids, o ST5 e o ST32, além de ter sido observada também infecção por *C. neoformans* VNB com ST232. *C. neoformans* VNB, antigamente considerado restrito ao continente Africa, tem sido observado em outras partes do mundo, incluindo o Brasil. Neste estudo o *C. neoformans* VNB com ST232 está sendo observado pela primeira vez em um paciente com HIV/Aids em Manaus – AM, Brasil. O ST93, o ST mais observado nos isolados clínicos, foi também identificado nos isolados ambientais analisados demonstrando a importância do

ambiente domiciliar para possível infecção/ reinfecção pelo fungo. 40% dos isolados se mostraram sensíveis a todos os antifúngicos. Somente um isolado apresentou CIM acima do EV proposto para AMB, demonstrando que a AMB apesar de estar associada a efeitos colaterais, ainda é o medicamento mais indicado e eficaz para o tratamento da meningite criptocócica. Para a redução das sequelas e mortalidade por meningite criptocócica há a necessidade de um diagnóstico e tratamento precoce da criptococose, maior aderência do tratamento com TARV e mais opções terapêuticas eficazes.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o financiamento recebido de Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (Public call N. 002/2018 - UNIVERSAL AMAZONAS/ FAPEAM) e PROEP/LABS/ILMD Fiocruz Amazônia LDMAIS. Os autores agradecem também ao “Laboratório Temático de Biologia Molecular – LTBM”, “Plataforma de genômica do Instituto de Pesquisa Leônidas e Maria Deane – ILMD/FIOCRUZ” e “Plataforma de genômica do Instituto Oswaldo Cruz- IOC Manguinhos/FIOCRUZ” pelo suporte técnico.

## REFERENCIAS

- (1) Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, Goldman DL, Graybill JR, Hamils RJ, et al. Clinical Practice Guidelines for the Management of Cryptococcal Disease: by the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. 2010; 50 (3): 291–322. doi:10.1086/649858.
- (2) Park BJ, Wannemuehler KA, Marston NG, Pappas PG, Chiller TM. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. AIDS. 2009; 23:525–530.
- (3) Firacative F, Meyer M, Castañeda E. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* Species Complexes in Latin America: A Map of Molecular Types, Genotypic Diversity, and Antifungal Susceptibility as Reported by the Latin American Cryptococcal Study Group. J. Fungi. 2021; 7 ( 282). <https://doi.org/10.3390/jof7040282>.
- (4) Saraiva MGG, Santos ECS, Saraceni V, Rocha LLS, Monte RL, Albuquerque BC, Bastos MS, et al. Epidemiology of infectious meningitis in the State of Amazonas, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2015; 48 (Suppl 1): 79-86. <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0116-2014>.
- (5) Rocha DFS, Cruz KS, Santos CSS, Menescal LSF, Neto JRS, Pinheiro SB, et al.

MLST reveals a clonal population structure for *Cryptococcus neoformans* molecular type VNI isolates from clinical sources in Amazonas, Northern-Brazil. Plos-one. 2018; 13 (6): 1-15.

(6) Alves MJ, do Nascimento IS, Cruz KS, Menescal VVF, Menescal LSF, Silva LSC, et al. Cryptococcosis in HIV/AIDS patients in northern Brazil: Clinical aspects, molecular types and isolation of agents from environmental samples associated with patients. Trop Med Int Health. 2022; 00:1– 10. <https://doi.org/10.1111/tmi.13737>.

(7) Ferreira-Paim k, Andrade-Silva L, Fonseca FM, Ferreira TB, Mora DJ, Reis C, et al. MLST-Based Population Genetic Analysis in a Global Context Reveals Clonality amongst *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* VNI Isolates from HIV Patients in Southeastern Brazil. PLOS Neglected Tropical Diseases. 2017; 18: 1-29. DOI:10.1371/journal.pntd.0005223.

(8) Saag MS, Graybill RJ, Larsen RA, Pappas PG, Perfect JR, Powderly WG. Practice Guidelines for the Management of Cryptococcal Disease. CID. 2000; 30: 710-718.

(9) Vidal JE, Oliveira ACP, Dauarc RF, Boulward DR. Strategies to reduce mortality and morbidity due to AIDS-related cryptococcal meningitis in Latin America. braz J Infect Dis. 2013;17(3):353–362.

(10) Nishikawa MM, Almeida-Paes R, Brito-Santos F, NascimentoCR, Fialho MM, Trilles L, Morales BP, et al. Comparative antifungal susceptibility analyses of *Cryptococcus neoformans* VNI and *Cryptococcus gattii* VGII from the Brazilian Amazon Region by the Etest, Vitek 2, and the Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution methods. Medical Mycology. 2019; 57: 864–873.

(11) Meyer W, Castañeda A, Jackson S, Huynh M, Castañeda E. Molecular typing of Ibero American *Cryptococcus neoformans* isolates. Emerg Infect Dis. 2003; 9: 189 – 195.

(12) Meyer w, Aanensen DM, Boekhout T, Cogliati M, Diaz MR, Esposto MC, et al. Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. Med Mycol. 2009; 47 (6): 561–570. doi:10.1080/13693780902953886.

(13) Espinel-Ingroff A, Chowdhary A, Cuenca-Estrella M, et al. *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex: an international stud of wild-type susceptibility endpoint distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B and flucytosine. Antimicrob Agents. Chemother. 2012; 56: 3107–13.

(14) Espinel-Ingroff A, Aller AI, Canton E et al. *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex: an international study of wildtype susceptibility endpoint distributions and epidemiological cutoff values for fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazol. Antimicrob Agents Chemother. 2012; 56: 5898–906.

(15) Khayhan k, Hagen F, Pan W, Simwami S, Fisher MC, Wahyuningsih R, et al. Geographically Structured Populations of *Cryptococcus neoformans* Variety *grubii* in Asia Correlate with HIV Status and Show a Clonal Population Structure. Plos One. 2013; 8 (9).

- (16) Chen YH, Yu F, Bian ZY, Hong JM, Zhang N, Zhong. Multilocus Sequence Typing Reveals both Shared and Unique Genotypes of *Cryptococcus neoformans* in Jiangxi Province, China. *Scientific Reports*. 2018; 8:1495. DOI:10.1038/s41598-018-20054-4.
- (17) Thanh LT, PhanTH, Rattanavong S, Nguyen TM, Duong AV, Dacon C, et al. Multilocus sequence typing of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* from Laos in a regional and global context. *Medical Mycology*. 2019; 57, 557–565.
- (18) Andrade-Silva LE, Ferreira-Paim K, Ferreira BT, Vilas-Boas A, Mora DJ, Manzato VM. Genotypic analysis of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates from Brazil reveals the presence of VNB isolates and a correlation with biological factors. *Plos One*. 2018; 5: 1-21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193237>.
- (19) Ngamskulrunroj P, Gilgado F, Faganello J, Litvintseva AP, Leal AL, Tsui KM, et al. Genetic Diversity of the *Cryptococcus* Species Complex Suggests that *Cryptococcus gattii* Deserves to Have Varieties. *Plos One*. 2009; 4 (6).
- (20) Silva, FA. Genética populacional e epidemiologia molecular de isolados brasileiros clínicos e ambientais de *Cryptococcus neoformans*. Dissertação de Mestrado Programa (Pós-Graduação Stricto Sensu do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas). 2020.
- (21) Vélez N, Scandón P. Multilocus sequence typing (MLST) of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in six departments of Colombia reveals high genetic diversity. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. 2020; 53: e20190422. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0422-201>.
- (22) Brito-Santos F, Trilles L, Firacative C, Wanke B, Carvalho-Costa FA, Nishikawa MM. Indoor Dust as a Source of Virulent Strains of the Agents of Cryptococcosis in the Rio Negro Micro-Region of the Brazilian Amazon. *Microorganisms*. 2020; 8: 682. doi:10.3390/microorganisms8050682.
- (23) Lozano-Chiu M, Paetznick VL, Ghannoum MA, REX JH. Detection of Resistance to Amphotericin B among *Cryptococcus neoformans* Clinical Isolates: Performances of Three Different Media Assessed by Using E-Test and National Committee for Clinical Laboratory Standards M27-A Methodologies. *Jour clin micro*. 1998; 36 (10): 2817–2822.
- (24) Horta JÁ, Faganello J, Silva LKR, Oliveira LT, Santurio JM, Vainstein MH. Susceptibility to heat and antifungal agents of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotype d) isolated from eucalyptus spp in Rio Grande do Sul, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2005; 36:1-6.
- (25) Almeida AMF, Matsumoto MT, Baeza LC, Silva RBO, Kleiner AAP, Melhem MSC, et al. Molecular typing and antifungal susceptibility of clinical sequential isolates of *Cryptococcus neoformans* from Sao Paulo State, Brazil. *FEMS Yeast Res*. 2007; 152–164.

- (26) Longley N, Muzoora C, Taseera K, Mwesigye J, Rwebembera J, Chakera A, et al. Dose Response Effect of High-Dose Fluconazole for HIV-Associated Cryptococcal Meningitis in Southwestern Uganda. *CID*. 2008; 47: 1556-1561.
- (27) Lia M, Liao Y, Chena M, Pana W, Weng L. Antifungal susceptibilities of *Cryptococcus* species complex isolates from AIDS and non-AIDS patients in Southeast China. *Braz J Infect Dis*. 2012;16(2):175-179.
- (28) Matos CS, Andrade AS, Oliveira NS, Barros TF. Microbiological characteristics of clinical isolates of *Cryptococcus* spp. in Bahia, Brazil: molecular types and antifungal susceptibilities. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012; 31: 1647–1652. DOI 10.1007/s10096-011-1488-3.
- (29) Molloy SF, Kanyama C, Heyderman RS, Loyse A, Kouanfack C, Chanda D, et al. Antifungal Combinations for Treatment of Cryptococcal Meningitis in Africa. *N Engl J Med*. 2018; 378.
- (30) Souza LKH,1, Junior AHS, Costa CR, Faganello J, Vainstein MH, Chagas ALB, et al. Molecular typing and antifungal susceptibility of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* species complex isolates in Goiania, Brazil. *Mycoses*. 2009; 53, 62–67.
- (31) Cichon M, Vicente VA, Muro MD, Bordignon GPF, Queiroz-Telles F. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from environmental samples of Curitiba and metropolitan region (Paraná, Brazil), and susceptibility antifungal testing. *RBAC*. 2011; 43(3):176-9.
- (32) Alves GSB, Freire AKL, Bentes AS, Pinheiro JFS, Souza JVB, Wanke B, Jackisch-Matsuura AB. Molecular typing of environmental *Cryptococcus neoformans/C. gattii* species complex isolates from Manaus, Amazonas, Brazil. *Mycoses*. 2016; 59 (8): 509-

## 7. DISCUSSÃO

No Brasil, por não se tratar de uma doença com notificação compulsória, há pouca informação quanto ao número de casos e óbitos causados pela criptococose<sup>(104)</sup>. Desta forma, a criptococose tem sido notificada como infecção oportunista quando associada à AIDS, ou em ocorrência de surtos<sup>(105)</sup>, sendo considerada uma doença definidora de AIDS já que se associa a baixas contagens de linfócitos T CD4 no sangue (abaixo de 100 células)<sup>(40)</sup>.

No Amazonas, a criptococose tem sido observada como infecção oportunista em pessoas com AIDS desde 1986<sup>(106)</sup>. Rocha et al. (2018)<sup>(60)</sup> de 2014 a 2016, analisaram amostras de 26 pacientes com HIV, diagnosticados com criptococose, observando, assim como no presente estudo, que a maioria era composta de pacientes do sexo masculino e com praticamente a mesma variação de idade.

A meningite criptocócica é a forma mais comum e fatal em pacientes com HIV/Aids<sup>(107,108)</sup>. As manifestações clínicas e sequelas neurológicas corroboram com as observadas por Rocha et al. (2018)<sup>(60)</sup>. Dos pacientes, 21,8% descobriram o HIV ao serem internados com criptococose. A morte precoce foi observada principalmente relacionada a contagem de células CD4T abaixo de 50 células/mm<sup>3</sup>. Rocha et al. (2018)<sup>(60)</sup> observaram que os pacientes com HIV/Aids foram ao óbito durante os primeiros 100 dias após admissão no hospital. Souza et al. 2008<sup>(106)</sup> verificaram que a média de sobrevivência dos pacientes com HIV/Aids diagnosticados com criptococose em um hospital em Manaus foi de 15 dias, sendo que a maioria dos pacientes foi ao óbito em menos de um mês após diagnóstico.

O tipo molecular mais comum no Brasil é o VNI, seguido de VGII<sup>(56)</sup>. No Amazonas Freire et al. (2012)<sup>(59)</sup> também observou esses tipos moleculares como os mais prevalentes encontrando também o tipo VNII nunca antes relatado na região norte. Rocha et al. (2018)<sup>(60)</sup> confirmaram VNI e VGII como os genótipos mais prevalentes, sendo o VNI o mais importante em pacientes com HIV, corroborando com os tipos moleculares observados. No entanto, no presente estudo também foi identificado um isolado de *C. neoformans* VNB e três isolados de *C. gattii* VGI. Além disso, foi observada uma infecção mista por *C. neoformans* VNI e *C. neoformans* VNB.



Entre os isolados de *C. neoformans*, foi possível determinar o ST de 30 isolados clínicos, referentes a 24 pacientes. O ST 93, o mais observado na América Latina <sup>(54)</sup>, foi identificado em 86,6% (n=26/30). Este estudo revelou que além do ST93, único subgenótipo observado em pacientes com HIV/Aids no Amazonas no estudo de Rocha et al. (2018) <sup>(60)</sup>, *C. neoformans* com ST5 e ST32 e *C. neoformans* VNB com ST232 também estão presentes.

*C. neoformans* com ST5 é bastante isolado na Ásia <sup>(109)</sup>, e já foi associado com HIV/Aids, assim como o ST93 <sup>(91,108)</sup>. O ST5 tem sido também observado na América Latina <sup>(45)</sup>, mas no Brasil é pouco isolado <sup>(63,68)</sup>. O ST32 e ST5 também foram identificados por Ferreira-Paim et al. (2017) <sup>(63)</sup> em pacientes com HIV/Aids em Minas Gerais, no sudeste do Brasil. *C. neoformans* VNB era tido como exclusivo do continente Africano <sup>(110)</sup>. Mas foi observado no Brasil em isolados ambientais por Andrade-Silva et al. (2018) <sup>(68)</sup>, e isolados de pacientes com HIV/Aids por Silva (2020) <sup>(111)</sup> e no nosso estudo. Há cerca de dez anos atrás Freire et al. (2012) <sup>(59)</sup> identificou um isolado de VNII em um paciente diagnosticado no Amazonas, no entanto não foi realizado o MLST. No presente estudo o isolado de VNB anteriormente havia sido identificado como VNII devido ao padrão observado na PCR-RFLP.

Para a determinação da susceptibilidade de *C. neoformans/C.gattii* aos antifúngicos testados usamos os valores de cortes epidemiológicos (ECVs) estabelecidos por Espinel-Ingroff et al. (2012a, 2012b) <sup>(112,113)</sup>, visto que não há breakpoints bem estabelecidos. Dos isolados clínicos, 60% (n=18/30) apresentaram CIM acima dos ECVs propostos para um ou mais antifúngicos, com variação da CIM mesmo entre os isolados com ST93. Somente o isolado P33-515 mostrou CIM acima do proposto para AMB, 10% (n=3/30) teve CIM acima para FCZ. Outros estudos demonstraram a sensibilidade de isolados de *C. neoformans* obtidos de pacientes com HIV/Aids à AMB, FCZ e Itraconazol <sup>(60,114,115)</sup>.

Além da AMB, o isolado P33-515 também mostrou CIM alta para FCZ e Itraconazol, ou seja, assim como observado por Matos et al. (2012) <sup>(116)</sup> em isolado de paciente com meningite criptocócica, no estado da Bahia. Este isolado se mostrou sensível a medicamentos menos utilizados, além disso a Flucitosina não está disponível em toda a América Latina <sup>(117)</sup>. Este paciente apresentava contagem de CD4T de 4 células/mm<sup>3</sup> e teve o óbito como desfecho.

Quanto aos isolados ambientais, todos são *C. neoformans* com ST93, corroborando com outros estudos de caráter ambiental <sup>(63, 117)</sup>. A susceptibilidade aos antifúngicos foi semelhante a relatada em outros estudos <sup>(79,106,119)</sup>. Alves (2016) <sup>(82)</sup> e Brito-Santos (2020) <sup>(120)</sup> avaliaram a presença de agentes da criptococose em ambientes domésticos em áreas rurais do Amazonas isolando também o ST93, além disso, Brito-Santos (2020) <sup>(120)</sup> isolou o ST5, observado em dois isolados clínicos no nosso estudo.

Em um estudo realizado na região metropolitana de Belém, identificaram alta positividade em poeira domiciliar de ambientes domiciliares, e *C. neoformans* foi isolado também de madeira em decomposição e tatu de jardim. Neste mesmo estudo foram incluídos como controle 3 domicílios próximos, sem ocorrência de criptococose, e em uma dessas residências, pertencente a um parente de paciente que tinha criptococose e AIDS, foi isolado *C. neoformans* de uma amostra de poeira domiciliar <sup>(121)</sup>.

Swinne et al. (1989) <sup>(122)</sup>, em um estudo semelhante a este trabalho, isolou *C. neoformans* de poeira domiciliar e solo do domicílio de pacientes com criptococose associada a Aids em Bujumbura, na África, evidenciando a importância deste ambiente e de um acompanhamento de pacientes “curados” pois pode haver a possibilidade de serem reinfetados após retorno ao domicílio. Outro estudo que também visou a busca por agentes de criptococose em domicílio de pacientes foi realizado no Rio de Janeiro por Passoni (1994) <sup>(83)</sup>, no qual 20 domicílios tiveram amostra ambiental positiva para *C. neoformans*. A maior positividade foi em domicílios de pacientes com criptococose associada a AIDS e o principal fator associado foi a presença de criação de aves no ambiente domiciliar.

## 8. CONCLUSÕES

- No Amazonas, a criptococose afeta principalmente indivíduos com HIV/Aids, do sexo masculino com média de idade de 35,3 anos. Observa-se ainda neste grupo um importante número de casos com evolução para meningite criptocócica, presença de sequelas e alta letalidade principalmente relacionada a baixa contagem de células CD4T e diagnóstico tardio. Um caso de infecção mista foi observado.
- *C. neoformans* foi isolado a partir de solo e poeira domiciliar, demonstrando a presença do fungo no ambiente domiciliar relacionado aos pacientes ou sua vizinhança.
- *C. neoformans* VNI e VNB e *C. gattii* VGI e VGII foram os agentes etiológicos responsáveis pela criptococose nos pacientes com HIV/Aids. O tipo molecular VNB e VGI foram observados pela primeira vez causando infecção em paciente no Amazonas. *C. neoformans* VNI apresentou os STS 93, 5 e 32 e *C. neoformans* VNB apresentou o ST 232. Os isolados ambientais são *C. neoformans* VNI com ST93.
- 40% (n=12/30) dos isolados foram sensíveis a todos os antifúngicos testados. O isolado P33-515 mostrou CIM acima do ECV proposto para AMB, FCZ e Itraconazol. A AMB se mostrou o medicamento mais eficaz, seguida de FCZ.
- *C. neoformans* VNI com ST93, comumente associado a pacientes imunocomprometidos e o principal agente etiológico observado nos isolados clínicos desse estudo também foi identificado nos três isolados ambientais analisados, demonstrando o domicílio como possível local para infecção/reinfecção para agentes da criptococose, algo que deve ser levado em consideração principalmente envolvendo indivíduos com baixa imunidade, em especial os pacientes com HIV/Aids.

## 9. PERSPECTIVAS

- Concluir o MLST dos demais isolados de *C. neoformans* para definição de todos os STs. Aparentemente a maioria é ST93, mas há oito isolados com alelos diferentes do ST93, no entanto há necessidade de repetição da amplificação e sequenciamento de um ou dois Loci para determinação do ST.

- Concluir o MLST dos isolados de *C. gattii*.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Sanfelice F. Contributo alla morfologia e biologia dei blastomiceti che si sviluppano nei succhi de alcuni frutti. Ann. Ist. Ig. R. Univ. Roma. 1894; 4:463–469.
- (2) Barnett JA. A history of research on yeasts 14: medical yeasts part 2, *Cryptococcus neoformans*. Yeast. 2010; 27: 875–904.
- (3) Mitchell TG, Perfect, JR. (1995) Cryptococcosis in theera of AIDS – 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. Clin Microbiol. 8: 515–548.
- (4) Maziarz EK, Perfect JR. Cryptococcosis. Infect Dis Clin North Am. 2016; 30 (1): 179–206. doi:10.1016/j.idc.2015.10.006.
- (5) Kwon-Chung KJ, Fraser JA, Doering TL, Wang Z, JanbonG, Idnurm A. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the Etiologic Agents of Cryptococcosis. Cold Spring Harb Perspect Med. 2014.
- (6) Chen SCA, Meyer W, Sorrella TC. *Cryptococcus gattii* Infections. Clinical Microbiology Reviews. 2014; 27 (4): 980 –1024.
- (7) Kwon-Chung KJ, Bennett JE, Rhodes JC. Taxonomic studies on Filobasidiella species and their anamorphs. Antonie Van Leeuwenhoek. 1982; 48(1): 25-38.
- (8) Kwon-Chung KJ, Bennett JE, Wickes BL, Meyer W, Cuomo CA, Wollenburg KR, et al. The Case for Adopting the “Species Complex” Nomenclature for the Etiologic Agents of Cryptococcosis. mSphere. 2017; 2 e00357-16.
- (9) Litvintseva AP, Thakur R, Vilgalys R, Mitchell TG. Multilocus Sequence Typing Reveals Three Genetic Subpopulations of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (Serotype A), Including a Unique Population in Botswana. Genetics. 2006; 172: 2223–2238.
- (10) Farrer AR, Miwa C, Davis MJ, Dorp LV, Yang DH, Shea T, et al. A New Lineage of *Cryptococcus gattii* (VGV) Discovered in the Central Zambezi Miombo Woodlands. JMBE. 2019; 10 (6): e02306-19.
- (11) Hagen F, Khayhan K, Theelen B, Kolecka A, Polacheck I, Sionov E, et al. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii/Cryptococcus neoformans* species complex. Fungal Genet Biol. 2015; 78:16-48. Doi: 10.1016/j.fgb.2015.02.009.
- (12) Litvintseva AP, Carbone I, Rossouw J, Thakur R, Govender NP, Mitchell TG. Evidence that the Human Pathogenic Fungus *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* May Have Evolved in Africa. Plos One. 2011; 6 (5): 1-13.
- (13) Billmyre RB, Croll D, Li W, Mieczkowski P, Carter DA, Cuomo CA. Highly Recombinant VGII *Cryptococcus gattii* Population Develops Clonal Outbreak Clusters through both Sexual Macroevolution and Asexual Microevolution. MBIO. 2014; 5 (4):

1-16.

- (14) Kwon-Chung KJ. A new genus, *Filobasidiella*, the perfect state of *Cryptococcus neoformans*. *Mycologia*. 1975: 67.
- (15) Kwon-Chung KJ. A new species of *Filobasidiella*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans* B and C serotypes. *Mycologia*. 1976: 68.
- (16) Wickes BL. The role of the mating type and morphology in *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. *Int J Med Microbiol*. 2002; 292: 313-329.
- (17) Sidrim JJC, Moreira JLB. Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.
- (18) Voelz K, May RC. Cryptococcal Interactions with the Host Immune System. *Eukaryotic Cell*. 2010; 9 (6): 835–846.
- (19) Bivanco FC, Machado CAS, Martins EL. Cutaneous cryptococcosis. *Arq Med ABC*. 2006; 31 (2):102-9.
- (20) Kronstad JW, Attarian R, Cadieux B, Choi J, D'Souza CA. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* species breakout of the opportunistic box. *Nat Rev Microbiol*. 2011; 9 (3): 193–203. Doi:10.1038/nrmicro2522.
- (21) Kurokawa CS, Sugizaki MS, Peraçoli MTS. Virulence factors in fungi of systemic mycoses. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 1998; 40 (3): 125-135.
- (22) García-Rivera J, Chang WC, Kwon-Chung KJ, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* CAP59 (or Cap59p) Is Involved in the Extracellular Trafficking of Capsular Glucuronoxylomannan. *Eukaryotic Cell*. 2004; 3 (2): 385–392.
- (23) Casadevall A, Perfect JR. *Cryptococcus neoformans*. ASM Press, Washington DC. 1998.
- (24) Idnurm A, Bahn YS, Nielsen K, Lin X, Fraser JA, Heitman J. Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus Neoformans*. *Nature reviews | microbiology*. 2005; 3: 753-764.
- (25) Siafakas AR, Sorrell TC, Wright LC, Wilson C, Larsen M, Boadle R, et al. Cell wall-linked cryptococcal phospholipase b1 is a source of secreted enzyme and a determinant of cell wall integrity. *The journal of biological chemistry*. 2007; 282 (52): 37508–37514.
- (26) Liu TB, Perlin DS, Xue C. Molecular mechanisms of cryptococcal meningitis. *Virulence*. 2012; 3 (2): 173-181.
- (27) Kon AS, Grumach AS, Colombo AL, Penalva ACO, Wanke B, Telles FQ, et al. Consenso em criptococose - 2008. *Rev Soc Bras de Med Trop*. 2008; 41 (5): 524-544.
- (28) Nascimento E, Vitali LH, Kress MRVZ, Martinez R. *Cryptococcus neoformans* and

*C. gattii* isolates from both HIV-infected and uninfected patients: antifungal susceptibility and outcome of cryptococcal disease. Rev Inst Med Trop S Paulo. 2016; 1-7.

(29) Shirley RM, Baddley JW. Cryptococcal lung disease. Curr Opin Pulm Med. 2009; 15: 254–260.

(30) Setianingrum F, Rautemaa-Richardson R, Denning DW. Pulmonary cryptococcosis: A review of pathobiology and clinical aspects. Medical Mycology, 2019, 57, 133–150. Doi: 10.1093/mmy/myy086.

(31) Silva ACG, Marchiori E, Souza Jr AS, Irion KL. Criptococose pulmonar: aspectos na tomografia computadorizada. Radio Bras. 2003; 36 (5): 277-282.

(32) Guo XS, Bu H, He JY, Zou WL, Zhao Y, Li YY, et al. Current diagnosis and treatment of cryptococcal meningitis without acquired immunodeficiency syndrome. Neuroimmunol Neuroinflammatio. 2016; 3: 249-56. DOI: 10.20517/2347-8659.2016.10.

(33) World Health Organization (WHO). Diagnosis, prevention and management of cryptococcal disease in HIV–infected adults, adolescents and children. HIV/AIDS Program. 2011.

(34) Xavier LSM, Maneschy RB, Nunes MBC, Xavier LC, Rocha NPM, Pontes CDN, et al. Pulmonary cryptococcosis and neurocyphococcosis in immunocompetent patients: case report. REAS/EJCH. 2019; 21: 1-5. <https://doi.org/10.25248/reas.e613.2019>.

(35) Li Q, You C, Liu Q, Liu Y. Central nervous system cryptococcoma in immunocompetent patients: a short review illustrated by a new case. Acta neurochirurgica. 2010; 152 (1): 129–136.

(36) Hagen F, Boekhout T. The search for the natural habitat of *Cryptococcus gattii*. Mycopathologia 2010; 170: 209-11.

(37) Allegue F, Lis MP, Roberto Pérez-Álvarez R. Primary Cutaneous Cryptococcosis Presenting as a Whitlow. Acta Derm Venereol. 2007; 87. doi: 10.2340/00015555-0275.

(38) Teles MR, Souza EBA. Criptococose: incidência, diagnóstico e tratamento. Saber Científico. 2017.

(39) Durden FM, Elewski B. Fungal infections in HIV- infected patients. Sem Cut Med Surg. 1997; 116: 200–12.

(40) Nadrous HF, antonios VS, Terrell CL, Ryu JH. Pulmonary cryptococcosis in non immunocompromised patients. Chest. 2003; 124 (6): 2143-2147.

(41) Antinori S. New Insights into HIV/AIDS-Associated Cryptococcosis. ISRN AIDS. 2013. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/471363>.

(42) Rajasingham R, Smith RM, Park BJ, Jarvis JN, Govender NP, Chiller TM, et al.

Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. *Lancet Infect Dis.* 2017; 17(8): 873–881. doi:10.1016/S1473-3099(17)30243-8.

(43) Yang ZB, Bleichert O, Deng F, Chen H, Li Y, Yang Y, Chen M, et al. High prevalence of HIV-related cryptococcosis and increased resistance to fluconazole of the *Cryptococcus neoformans* complex in Jiangxi province, south central China. *Frontiers in Microbiology.* 2021; 11: 1-9.

(44) Cogliati M. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types. Scientifica. 2013. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/675213>

(45) Assogba K, Belo M, Wateba MI, Gnonlonfoun DD, Ossou-Nguet PM, Tsanga BBC. Neuromeningeal cryptococcosis in sub-Saharan Africa: Killer disease with sparse data. *J Neurosci Rural Pract.* 2015; 6(2): 221–224. Doi: 10.4103/0976-3147.153231.

(46) Fang W, Fa Z, Liao W. Epidemiology of *Cryptococcus* and cryptococcosis in China. *Fungal Genetics and Biology.* 2015; 78: 7–15.

(47) Mihara T, Izumikawa K, Kakeya H, Ngamskulrungrong P, Umeyama T, Takazono T, et al. Multilocus sequence typing of *Cryptococcus neoformans* in non-HIV associated cryptococcosis in Nagasaki, Japan. *Medical Mycology.* 2013; 51: 252–260.

(48) Huh K, Ha YE, Denning DW, & Peck KR. Serious fungal infections in Korea. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2017. DOI 10.1007/s10096-017-2923-x.

(49) Rakotoarivelo RA, Raberahonal M, Rasamoelina T, Rabezanahary A, Rakotomalala FA, Razafinambinintsoa T, et al. Epidemiological characteristics of cryptococcal meningoencephalitis associated with *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* from HIV-infected patients in Madagascar: A cross-sectional study. *PLOS Neglected Tropical Diseases.* 2020; 13. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007984>.

(50) Jarvis JN, Harrison TS. HIV-associated cryptococcal meningitis. *AIDS.* 2007; 21(16): 2119-29. doi: 10.1097/QAD.0b013e3282a4a64d.

(51) Galanis E, MacDougall L. Epidemiology of *Cryptococcus gattii*, British Columbia, Canada, 1999–2007. *Emerging Infectious Diseases.* 2010; 16 (2): 251-257.

(52) Bramantono B, Danial A, Hadi U. A case of an AIDS patient with *Cryptococcus neoformans* infection. *Pan African Medical Journal.* 2020.

(53) Ficarative C, Lizarazo J, Illnait-Zaragozı MT, Castañeda E, Latin American Cryptococcal Study Group. The status of cryptococcosis in Latin America. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2018; 113 (7).

(54) Ficarative C, Meye W, Castañeda E. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* Species Complexes in Latin America: A Map of Molecular Types, Genotypic Diversity, and Antifungal Susceptibility as Reported by the Latin American Cryptococcal Study Group. *J. Fungi.* 2021; 7 (282). <https://doi.org/10.3390/jof7040282>.



- (55) Prado M, da Silva MB, Laurenti R, Travassos LR, Taborda CP. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104(3): 513-521.
- (56) Soares EA, Lazera MS, Wanke B, Ferreira MF, de Oliveira RVC, Coutinho ZF. Mortality by cryptococcosis in Brazil from 2000 to 2012: A descriptive epidemiological study. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019; 1-17.
- (57) Trilles L, Lazéra MDS, Wanke B, Oliveira RV, Barbosa GG, Nishikawa MM, et al. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008;103: 455–462. Doi:10.1590/S0074-02762008000500008
- (58) Wirth F, Azevedo MI, Goldani LZ. Molecular types of *Cryptococcus* species isolated from patients with cryptococcal meningitis in a Brazilian tertiary care hospital. *Braz J Infect dis* 2018; 2 (6):495–498.
- (59) Freire AK, Bentes AS, Sampaio IL, Matsuura AB, Ogusku MM, Salem JI, Wanke B, de Souza JV. Molecular characterisation of the causative agents of Cryptococcosis in patients of a tertiary healthcare facility in the state of Amazonas-Brazi. *Mycoses.* 2012; 55 (3): 145-50.
- (60) Rocha DFS, Cruz KS, Santos CSS, Menescal LSF, Neto JRS, Pinheiro SB, et al. MLST reveals a clonal population structure for *Cryptococcus neoformans* molecular type VNI isolates from clinical sources in Amazonas, Northern-Brazil. *Plos-one.* 2018; 13 (6): 1-15.
- (61) Pinheiro SB, Souza ES, Cortez AC, Rocha DF, Menescal LSF, Chagas VS, et al. Cryptococcal meningitis in non-HIV patients in the State of Amazonas, Northern Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 2021; 52: 279–288.
- (62) Souto ACP, Bonfietti LX, Ferreira-paim K, Trilles L. Population genetic analysis reveals a high genetic diversity in the brazilian *Cryptococcus gattii* VGII population and shifts the global origin from the Amazon rainforest to the semi-arid desert in the northeast of Brazil. 2016; 1–19. Doi:10.1371/journal.pntd.0004885.
- (63) Ferreira-Paim k, Andrade-Silva L, Fonseca FM, Ferreira TB, Mora DJ, Reis C, et al. MLST-based population genetic analysis in a global context reveals clonality amongst *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* VNI isolates from HIV patients in Southeastern Brazil. *PLOS Neglected Tropical Diseases.* 2017; 18: 1-29. DOI:10.1371/journal.pntd.0005223.
- (64) Kidd SE, Hagen F, Tschärke RL, Huynh M, Bartlett KH, Fyfe M, et al. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(49):17258–63
- (65) Serna-Espinosa BN, Guzmán-Sanabria D, Forero-Castro M, Escandón P, Sánchez-Quitian ZP. Environmental Status of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Colombia. *J. Fungi.* 2021; 7 (410). <https://doi.org/10.3390/jof7060410>.

- (66) Akaihe CL, & Nweze EI. Epidemiology of *Cryptococcus* and cryptococcosis in Western Africa. *Mycoses*. 2020; 64(1): 4–17. Doi:10.1111/myc.13188.
- (67) Nweze EI, Kechia FA, Dibua UE, Eze C, & Onoja US. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from environmental samples collected in southeastern Nigeria. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. 2015; 57(4):295-298. <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652015000400004>.
- (68) Andrade-Silva LE, Ferreira-Paim K, Ferreira BT, Vilas-Boas A, Mora DJ, Manzato VM. Genotypic analysis of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates from Brazil reveals the presence of VNB isolates and a correlation with biological factors. *Plos One*. 2018; 5: 1-21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193237>.
- (69) Samarasinghe H, Aljohani R, Jimenez C, Xu J. Fantastic yeasts and where to find them: the discovery of a predominantly clonal *Cryptococcus deneoformans* population in Saudi Arabian soils. *FEMS Microbiology Ecology*. 2019; 95.
- (70) Li AS, Pan WH, Wu SX, Hideaki T, Guo NR, Sheen YN. Ecological surveys of the *Cryptococcus* species complex in China. *Chinese Medical Journal*. 2012;125 (3):511-516.
- (71) Pfeiffer TJ, Ellis DH. Serotypes of Australian environmental and clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. *J Med Vet Mycol*. 1993; 31: 401-404.
- (72) Chakrabarti A, Jatana M, Kumar P, Chatha L, Kaushal A, Padhye AA. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from *Eucalyptus camaldulensis* in India. *Journal of Clinical Microbiology*. 1997; 35 (12).
- (73) Grover N, Nawange SR, Naidu J, Singh SM, Sharma A. Ecological niche of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii* in decaying wood of trunk hollows of living trees in Jabalpur City of Central India. *Mycopathologia*. 2007; 164: 159–170. DOI 10.1007/s11046-007-9039-2.
- (74) Cogliati M, D'Amicis R, Zani A, Montagna MT, Caggiano G, Giglio OD, et al. Environmental distribution of *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* around the Mediterranean basin. *FEMS Yeast Research*. 2016; 16.
- (75) Kidd SE, Chow Y, Mak S, Bach PJ, Chen H, Hingston AO, et al. Characterization of Environmental Sources of the Human and Animal Pathogen *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and the Pacific Northwest of the United States. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007; 73 (5): 1433–1443.
- (76) Velez N, Scandon P. Report on novel environmental niches for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Colombia: *Tabebuia guayacan* and *Roystonea regia*. *Medical Mycology*. 2017; 55: 794–797.
- (77) Lazera MS, Cavalcanti MAS, Londero AT, Trilles L, Nishikawa MM, Wanke B. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. *Medical Mycology*. 2000; 38: 379–383.

- (78) Alves GSB, Freire AKL, Pinheiro J FS, Souza JVB, Jackisch-Matsuura AB. Presença de *cryptococcus neoformans (sanfelice) vuillemin (tremallales: filobasidiaceae)* em excretas de pombos na cidade de Manaus-am. Revista de Educação, Ciência e Tecnologia do IFAM, 2013; 7(1): 30-41.
- (79) Alves GSB, Freire AKL, Bentes AS, Pinheiro J FS, Souza JVB, Wanke B, Jackisch-Matsuura. Molecular typing of environmental *Cryptococcus neoformans/C. gattii* species complex isolates from Manaus, Amazonas, Brazil. Mycoses. 2016; 59 (8): 509-15.
- (80) Bentes AS, Wanke B, Lazera MS, Freire AKL, Junior RMS, Rocha DFS. *Cryptococcus gattii* VGII isolated from native forest and river in Northern Brazil. Braz J Microbiol. 2019; 50(2): 495-500.
- (81) Brito-Santos F, Barbosa GG, Trilles L, Nishikawa MM, Wanke B, Meyer W, et al. Environmental Isolation of *Cryptococcus gattii* VGII from Indoor Dust from Typical Wooden Houses in the Deep Amazonas of the Rio Negro Basin. Plos One. 2015. DOI:10.1371/journal.pone.0115866.
- (82) Alves GSB. Genotipagem de *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* isolados de poeira domiciliar e avaliação da susceptibilidade a antifúngicos e da presença do antígeno em moradores de uma comunidade rural do Amazonas. 2016. 71 f. Dissertação (Mestrado Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus.
- (83) PASSONI, LFC. *Cryptococcus neoformans* em ambiente domiciliar: estudo de residências de aidéticos e não aidéticos com e sem criptococose e de indivíduos aparentemente saudáveis na região metropolitana do Rio de Janeiro. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical), do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1994.
- (84) COSTA SPSE, Lazera MS, Santos WRA, Morales BP, Bezerra CCF, Nishikawa MM, Barbosa GG, et al. First isolation of *Cryptococcus gattii* molecular type VGII and *Cryptococcus neoformans* molecular type VNI from environmental sources in the city of Belém, Pará, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104 (4): 662-664.
- (85) Severo CB, Gazzoni AF, Severo LC. Pulmonary cryptococcosis. J Bras Pneumol. 2009; 35 (11):1136-1144.
- (86) Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no Sistema Único de Saúde (Conitec). Teste diagnóstico, point of care, de Cryptococcal Antigen Lateral Flow Assay (CRAG-LFA) para detecção de infecção por *Cryptococcus* e diagnóstico de meningite criptocócica em pessoas vivendo com o vírus da imunodeficiência humana (PVHIV). 2011.
- (87) Prattes J, Heldt S, Eigl S, Hoenigl M. Point of Care Testing for the Diagnosis of Fungal Infections: Are We There Yet? Curr Fungal Infect Rep. 2016. 10: 43–50. DOI 10.1007/s12281-016-0254-5.
- (88) Silveira MB, Moura AM, Souza LC, Rezende HHA. Diagnóstico laboratorial de

criptococose em indivíduos imunodeprimidos. *Saúde & Ciência em Ação*. 2018; 4 (01).

(89) Meyer W, Castañeda A, Jackson S, Huynh M, Castañeda E. Molecular typing of Ibero American *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerg Infect Dis*. 2003; 9: 189 – 195.

(90) Meyer w, Aanensen DM, Boekhout T, Cogliati M, Diaz MR, Esposto MC, et al. Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Med Mycol*. 2009; 47 (6): 561–570. doi:10.1080/13693780902953886.

(91) Khayhan k, Hagen F, Pan W, Simwami S, Fisher MC, Wahyuningsih R, et al. Geographically structured populations of *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* in Asia correlate with HIV status and show a clonal population structure. *Plos One*. 2013; 8 (9).

(92) Kaplan JE, Benson C, Holmes KK, Brooks JT, Pau A, Masur H. Guidelines for prevention and treatment of opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents: recommendations from CDC, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America. *MMWR Recomm Rep*. 2009 Apr 10; 58:1-207.

(93) Saag MS, Graybill RJ, Larsen RA, Pappas PG, Perfect JR, Powderly WG. Practice Guidelines for the Management of Cryptococcal Disease. *CID*. 2000; 30: 710-718.

(94) Martinez R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. *J Bras Pneumol*. 2006; 32 (5): 449-60.

(95) Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, Goldman DL, Graybill JR, Hamill RJ, et al. Clinical Practice Guidelines for the Management of Cryptococcal Disease: 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2010; 50 (3): 291–322. Doi:10.1086/649858.

(96) Bergold AM, Geogiadis S. New antifungic drugs: a review. *Visão Acadêmica, Curitiba*. 2004; 5 (2): 159 -172.

(97) Nobrega JPS, Livramento JA, Spina-França A. 5-Fluorocitosina e Anfotericina-B no tratamento da criptococose do sistema nervoso central. Trabalho da Clínica Neurológica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. *Anais V I Congresso Brasileiro de Neurologia, Rio de Janeiro*, 1975.

(98) Ghannoum MA, Rice LB. Antifungal Agents: Mode of Action, Mechanisms of Resistance, and Correlation of These Mechanisms with Bacterial Resistance. *Clinical microbiology reviews*. 1999; 12 (4): 501–517.

(99) Mourad A, Perfect JR. The war on cryptococcosis: A Review of the antifungal arsenal. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2018; 113 (7): e170391.

(100) Pappalardo MCSM, Melhem MSC. Cryptococcosis: a review of the brazilian experience for the disease. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*. 2003; 45 (6):299-305.

- (101) Chen S, Sorrell T, Nimmo G, Speed B, Currie B, Ellis D, et al. Epidemiology and host- and variety-dependent characteristics of infection due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zealand. *CID*. 2000; 31.
- (102) Berkow EL, Lockhart SR, Ostrosky-Zeichner L. Antifungal Susceptibility Testing: Current Approaches. *Clinical Microbiology Reviews*. 2020; 33 (3).
- (103) Colombo AL, Barchiesi F, MCGough DA, Rinaldi MG. Comparison of Etest and National Committee for Clinical Laboratory Standards Broth Macrodilution Method for Azole Antifungal Susceptibility Testing. *Jour of clin microb*. 1995; 33 (3): 535–540.
- (104) Júnior JL, Júnior VLP, Nicola AM, Lazera MS. Implantação da Rede de Criptococose Brasil no Distrito Federal - RCB-DF. *Revista de Medicina e Saúde de Brasília*, 2017; 6 (2): 151-3.
- (105) Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância em saúde. Departamento de vigilância epidemiológica, coordenação geral de doenças transmissíveis, unidade de vigilância das doenças de transmissão respiratória e imunopreveníveis. *Vigilância e Epidemiológica da Criptococose*. Brasília-DF, 2012.
- (106) Souza SLS, Feitoza PVS, Araujo JR, Andrade RV, Ferreira LCL. Causas de óbito em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida, necropsiados na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008; 41(3): 247-251.
- (107) Carrijo AV, Carrijo BV, Machado LN, Almeida RJ, Oliveira PPC. Clinical-epidemiological analysis of cryptococosis and hiv coinfection: a systematic review. *BASR*. 2021; 5 (2): 802-817.
- (108) Chen CH, Li H, Chen HM, Chen YM, Chang YJ, Li PY, et al. Efficacy of induction regimens for cryptococcal meningitis in HIV-infected adults: a systematic review and network meta-analysis. *Scientific Reports*. 2021; 11: 8565.
- (109) Thanh LT, PhanTH, Rattanavong S, Nguyen TM, Duong AV, Dacon C, et al. Multilocus sequence typing of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* from Laos in a regional and global context. *Medical Mycology*. 2019; 57, 557–565.
- (110) Ngamskulrungrroj P, Gilgado F, Faganello J, Litvintseva AP, Leal AL, Tsui KM, et al. Genetic Diversity of the *Cryptococcus* Species Complex Suggests that *Cryptococcus gattii* Deserves to Have Varieties. *Plos One*. 2009; 4 (6).
- (111) Silva, FA. Genética populacional e epidemiologia molecular de isolados brasileiros clínicos e ambientais de *Cryptococcus neoformans*. Dissertação de Mestrado Programa (Pós-Graduação Stricto Sensu do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas). 2020. Rio de Janeiro.
- (112) Espinel-Ingroff A, Chowdhary A, Cuenca-Estrella M et al. *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* species complex: an international stud of wild-type susceptibility endpoint distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B and flucytosine. *Antimicrob Agents. Chemother*. 2012; 56: 3107–13.

- (113) Espinel-Ingroff A, Aller AI, Canton E et al. *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* species complex: an international study of wildtype susceptibility endpoint distributions and epidemiological cutoff values for fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazol. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56: 5898–906.
- (114) Longley N, Muzoora C, Taseera K, Mwesigye J, Rwebembera J, Chakera A, et al. Dose Response Effect of High-Dose Fluconazole for HIV-Associated Cryptococcal Meningitis in Southwestern Uganda. *CID.* 2008; 47: 1556-1561.
- (115) Lia M, Liao Y, Chena M, Pana W, Weng L. Antifungal susceptibilities of *Cryptococcus* species complex isolates from AIDS and non-AIDS patients in Southeast China. *Braz J Infect Dis.* 2012;16(2):175-179.
- (116) Matos CS, Andrade AS, Oliveira NS, Barros TF. Microbiological characteristics of clinical isolates of *Cryptococcus* spp. in Bahia, Brazil: molecular types and antifungal susceptibilities. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012; 31: 1647–1652. DOI 10.1007/s10096-011-1488-3.
- (117) Vidal JE, Toniolo C, Paulino A, Colombo A, Martins MA, Meira CS, et al. Asymptomatic cryptococcal antigen prevalence detected by lateral flow assay in hospitalised HIV-infected patients in São Paulo, Brazil. *Trop Med Int Health.* 2016: 21(12):1539-1544.
- (118) Vélez N, Scandón P. Multilocus sequence typing (MLST) of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in six departments of Colombia reveals high genetic diversity. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2020; 53: e20190422. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0422-201>.
- (119) Cichon M, Vicente VA, Muro MD, Bordignon GPF, Queiroz-Telles F. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from environmental samples of Curitiba and metropolitan region (Paraná, Brazil), and susceptibility antifungal testing. *RBAC.* 2011; 43(3):176-9.
- (120) Brito-Santos F, Trilles L, Firacative C, Wanke B, Carvalho-Costa FA, Nishikawa MM, et al. Indoor dust as a source of virulent strains of the agents of cryptococcosis in the Rio Negro microregion of the Brazilian Amazon. *Microorganisms,* 2020; 8: 682. Doi:10.3390/microorganisms8050682.
- (121) Costa, SPSEC. Isolamento e caracterizacao molecular de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* de fontes ambientais na região Metropolitana de Belém, Para. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências), Instituto Oswaldo Cruz-Rio de Janeiro, 2008.
- (122) SwinneD, Deppner M, Laroche R, Floch JJ, Kadende P. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from houses of AIDS-associated cryptococcosis patients in Bujumbura (Burundi). *AIDS,* 1989; 3 (6): 389-90.

## 11. ANEXOS

### FICHA DA CASA

Número da ficha: \_\_\_\_\_ data da visita: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Tipo de moradia: ( ) Casa ( ) Apartamento ( ) Cômodo

Tempo de moradia: \_\_\_\_\_ Número de moradores: \_\_\_\_\_

Tipo de parede: ( ) Alvenaria ( ) Madeira ( ) Gesso ( )

Outros: \_\_\_\_\_

Tipo de piso: ( ) Cerâmica ( ) Tijolo ( ) Tábua ( )

Outros: \_\_\_\_\_

Tipo de teto: ( ) Laje ( ) Telha com forro ( ) Telha sem forro

Tipo de telha: \_\_\_\_\_

Sotão: ( ) Sim ( ) Não Porão: ( ) Não ( ) Sim

Quintal: ( ) Não ( ) Cimento ( ) Terra

Árvores: ( ) Sim ( ) Não

Criação de aves: ( ) Não ( ) Sim

Espécies: \_\_\_\_\_

Aves/Peridomicílio: ( ) Não ( ) Sim

( ) Livres ( ) Em cativeiro

Espécies: \_\_\_\_\_

Acúmulo de poeira: ( ) Não ( ) Sim

Iluminação natural: ( ) Boa ( ) Regular ( ) Ruim

Higiene: ( ) Boa ( ) Regular ( ) Ruim

Amostras coletadas: ( ) poeira domiciliar ( ) solo ( ) ar

Outras: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** AGENTES FÚNGICOS DE MICOSES SISTÊMICAS EM DOMICÍLIOS DE PACIENTES COM HIV/AIDS E MICOSES OPORTUNISTAS DIAGNOSTICADOS NA FMT-HVD

**Pesquisador:** Marla Jalene Alves

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 82715917.4.0000.0005

**Instituição Proponente:** CENTRO DE PESQUISAS LEONIDAS E MARIA DEANE - FUNDAÇÃO

**Patrocinador Principal:** CENTRO DE PESQUISAS LEONIDAS E MARIA DEANE - FUNDAÇÃO  
OSWALDO CRUZ

DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.538.131

**Apresentação do Projeto:**

Os fungos *Cryptococcus* e *Histoplasma* são agentes causadores de micoses sistêmicas, acometendo de forma grave indivíduos com HIV/AIDS, representando um importante problema de saúde pública. A infecção ocorre quando há exposição desses pacientes ao ambiente contaminado com propágulos infectantes do fungo. No Brasil os casos de Criptococose e Histoplasmose tem aumentado em pacientes imunocomprometidos, inclusive no norte do país, levando comumente esses indivíduos à óbito. Em Manaus, Amazonas, têm sido realizados estudos de caráter ambiental para verificar a presença e os genótipos de fungos na natureza, não havendo relatos em domicílio de pacientes com HIV/AIDS. Assim, o presente estudo pretende investigar a presença de agentes fúngicos de micoses sistêmicas em domicílios de pacientes com HIV/AIDS diagnosticados com Criptococose e/ou Histoplasmose na Fundação de Medicina Tropical -Dr. Heitor Vieira Dourado, além de avaliar a metodologia de PCR-RT para a detecção de *Cryptococcus* e *Histoplasma*, determinar genótipos e avaliar a sensibilidade dos isolados aos antifúngicos. Os fungos serão obtidos de amostras ambientais coletadas no domicílio dos pacientes. Isolados clínicos também entrarão no estudo. Os isolados de *Cryptococcus* serão submetidos à análise morfológica, a genotipagem por MLST, PCR-RT e a susceptibilidade antifúngica. Já a presença de *Histoplasma* será avaliada por PCR convencional e PCR-RT. Será feito sequenciamento de DNA de todos os agentes fúngicos investigados. Os



Continuação do Parecer: 2.538.131

resultados obtidos elucidarão lacunas referentes às possíveis fontes de infecção desses fungos e distribuição destes fungos, além de contribuir para a prevenção e controle dessas micoses.

**Desenho do estudo:**

Trata-se de um estudo observacional, descritivo, transversal

Os fungos serão obtidos de amostras ambientais, tais como poeira domiciliar, solo, fezes de aves, oco de árvore e madeira em decomposição, coletadas no domicílio de pacientes com HIV/AIDS diagnosticados com Criptococose e/ou Histoplasmose na FMT-HVD, além de pacientes com HIV/AIDS sem micose sistêmica, que serão utilizados como controle do estudo. Os isolados de *Cryptococcus* serão submetidos à análise morfológica, a genotipagem por MLST, PCR-RT e a susceptibilidade antifúngica. Já a presença de *Histoplasma* será avaliada por PCR convencional e PCR-RT.

**Hipótese:**

Podem haver a presença de fungos causadores de Criptococose e Histoplasmose no ambiente domiciliar dos pacientes estudados.

**Desfecho Primário:**

Determinar se há a presença de fungos no ambiente domiciliar dos pacientes estudados e as possíveis fontes de infecção por estes fungos

**Desfecho Secundário:**

Determinar se os fungos encontrados no ambiente domiciliar do paciente são os mesmos responsáveis por causar doença nesses pacientes e verificar as fontes de infecção por estes fungos.

**Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:**

Investigar a presença de agentes fúngicos de micoses sistêmicas em domicílios de pacientes com HIV/AIDS e micose sistêmica diagnosticados na FMT-HVD nos anos de 2017 e 2018.

**Objetivo Secundário:**

a) Analisar fontes ambientais para determinar a presença de agentes fúngicos de Criptococose e Histoplasmose em domicílios de pacientes com HIV-AIDS diagnosticados com micose sistêmica na FMT-HVD;b) Avaliar a metodologia de PCR em tempo real para detecção de *Histoplasma* e *Cryptococcus* em amostras ambientais;c) Determinar os genótipos de *Cryptococcus* presentes no ambiente domiciliar d) Correlacionar os achados ambientais com os agentes causadores de micose nos pacientes;e) Caracterizar os isolados quanto à susceptibilidade aos antifúngicos azólicos e anfotericina B.

Continuação do Parecer: 2.538.131

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:**

Os possíveis riscos relacionados a participação na pesquisa são: (1) desconforto durante a abordagem ao paciente e a utilização de dados desse paciente; (2) desconforto durante a realização das coletas no ambiente domiciliar. Os riscos serão minimizados pelo entrevistador que será treinado para garantir o sigilo dos participantes, além disso a abordagem será feita de forma individualizada, não exposta ao público, a fim de evitar

constrangimentos e a visita domiciliar será agendada com o próprio paciente. Além disso, qualquer risco não previsto decorrente da participação na pesquisa, será minimizado pelo pesquisador.

**Benefícios:**

Esse trabalho contribuirá com maiores informações para a compreensão a respeito de possíveis fontes ambientais de infecção e re-infecção de fungos causadores de micose sistêmica, fatores associados a sua infecção, a distribuição desses fungos no Amazonas, sua importância como agente causador de micose em seres humanos e do perfil de sensibilidade à antifúngicos utilizados rotineiramente no tratamento destas micoses, permitindo uma melhor conduta terapêutica frente a estas infecções.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O projeto está bem escrito, é relevante. Apresenta uma proposta para identificação de fungos no ambiente domiciliar de indivíduos vivendo com HIV/AIDS, e contribuirá com maiores informações para a compreensão a respeito de possíveis fontes ambientais de infecção e re-infecção de fungos causadores de micose sistêmica.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

O protocolo deste estudo traz a seguinte documentação: PB\_ Informações Básicas; Anuência FMT-HVD; Projeto Completo; Termo de Assentimento; TCLEadulto; TCLEcriança; Folha de Rosto devidamente assinada; TCUD e Curriculum pesquisador principal; Folha resposta.

**Recomendações:**

Vide Conclusões ou pendências

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

**Pendências/solicitações:**

De acordo com a Resolução No 466, de 12 de dezembro de 2012, para que se atenda os seguintes

FUNDAÇÃO DE MEDICINA  
TROPICAL "DOUTOR HEITOR  
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 2.538.131

os relatórios, parciais e o final, do estudo conforme prevê a Resolução CNS nº 466/2012, utilizando o formulário de Roteiro para Relatório Parcial/Final de estudos clínicos Unicêntricos e Multicêntricos, proposto pela CONEP em nossa home page.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1049785.pdf	05/03/2018 12:17:47		Aceito
Outros	FOLHARESPOSTAcep_Marla.pdf	05/03/2018 12:16:04	Marla Jalene Alves	Aceito
Outros	Curriculo_Lattes.pdf	05/03/2018 12:12:21	Marla Jalene Alves	Aceito
Outros	ProjetocepTCUD.pdf	05/03/2018 12:09:39	Marla Jalene Alves	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projetocep_Marla.pdf	05/03/2018 12:08:41	Marla Jalene Alves	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	termodeassentimento_projetocep_Marla.pdf	05/03/2018 12:07:40	Marla Jalene Alves	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEcrianca_projetocepMarla.pdf	05/03/2018 12:06:57	Marla Jalene Alves	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEadulto_projetocepMarla.pdf	05/03/2018 12:06:37	Marla Jalene Alves	Aceito
Folha de Rosto	folhaderostaplataformaBrasilMarla.pdf	11/12/2017 17:29:39	Marla Jalene Alves	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**12. APÊNDICE A: ARTIGO 1: *Cryptococcal meningitis in non-HIV patients in the State of Amazonas, Northern Brazil.***



# Cryptococcal meningitis in non-HIV patients in the State of Amazonas, Northern Brazil

Silviane Bezerra Pinheiro<sup>1,2</sup> · Ednaira Sullany Sousa<sup>1,2</sup> · Ana Cláudia Alves Cortez<sup>2</sup> · Diego Fernando da Silva Rocha<sup>2</sup> · Lizandra Stephany Fernandes Menescal<sup>3</sup> · Valéria Soares Chagas<sup>3</sup> · Aline Stephanie Pérez Gómez<sup>3</sup> · Kátia Santana Cruz<sup>3</sup> · Lucilaide Oliveira Santos<sup>3</sup> · Marla Jalene Alves<sup>4</sup> · Ani Beatriz Jackisch Matsuura<sup>4</sup> · Bodo Wanke<sup>5</sup> · Luciana Trilles<sup>5</sup> · Hagen Frickmann<sup>6,7</sup> · João Vicente Braga de Souza<sup>2</sup>

Received: 5 June 2020 / Accepted: 15 September 2020  
© Sociedade Brasileira de Microbiologia 2020

## Abstract

Cryptococcosis is a life-threatening fungal infection caused by the *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* species complex. Most cases are recorded in patients suffering from HIV/AIDS (human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome). However, this infection also occurs in non-HIV patients with a proportion of 10–30% of all cases. The study aimed at the clinical and molecular characterization of non-HIV patients diagnosed with cryptococcosis at the Tropical Medicine Foundation (FMT-HVD) from July 2016 to June 2019. Medical records of respective patients were analyzed to describe the course of cryptococcosis in non-HIV patients. In addition, multi-locus sequence typing (MLST) was applied to identify the sequence types of the isolated *Cryptococcus* strains, to perform phylogenetic analysis, and to evaluate the isolates' genetic relationship to global reference strains. Antifungal susceptibility profiles to amphotericin B, fluconazole, and itraconazole were assessed by broth microdilution. From a total of 7 patients, 4 were female, the age range varied between 10 and 53 years (median of 36.3 years). Cryptococcal meningitis was the common clinical manifestation (100%). The period between onset of symptoms and confirmed diagnosis ranged from 15 to 730 days (mean value of 172.9 days), and the observed mortality was 57.1%. Of note, comorbidities of the assessed cryptococcosis patients comprised hypertension, diabetes mellitus, and intestinal tuberculosis. Genotyping applying PCR-RFLP of the *URA5* gene identified all clinical isolates as *C. gattii* genotype VGII. Using MLST, it was possible to discriminate the sequence types ST20 ( $n = 4$ ), ST5 ( $n = 3$ ), and the newly identified sequence type ST560 ( $n = 1$ ). The antifungals amphotericin B, fluconazole, and itraconazole showed satisfactory inhibitory activity (microdilution test) against all *C. gattii* VGII strains.

**Keywords** Amazon · *Cryptococcus gattii* · HIV-negative · MLST · Case series · Cryptococcal meningitis · VGII genotype

## Introduction

Cryptococcosis is an infection of global importance with significant attributable mortality [1]. Involvement of the central nervous system (CNS), usually as meningoencephalitis, is the most common manifestation [2, 3]. Worldwide, cryptococcal meningitis is typically associated with

human immunodeficiency virus (HIV) infection. In high-income countries, however, the disease is increasingly recognized in HIV-negative patients as well. Of note, HIV-negative patients with cryptococcosis are more frequently diagnosed with considerable delay and show higher mortality rates compared with HIV-infected patients [4–6].

---

Responsible Editor: Rosana Puccia.

---

\* João Vicente Braga de Souza [joao.souza@inpa.gov.br](mailto:joao.souza@inpa.gov.br)

<sup>1</sup> Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas,  
Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brazil

<sup>2</sup> Laboratório de Micologia, Instituto Nacional de  
Pesquisas da Amazônia, Manaus, Brazil

<sup>3</sup> Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira  
Dourado – AM, Manaus, Brazil

<sup>4</sup> Instituto Leônidas Maria Deane, Fiocruz – AM,  
Manaus, Brazil

<sup>5</sup> Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas,  
Fiocruz - RJ, Riode Janeiro, Brazil

<sup>6</sup> Department of Microbiology and Hospital Hygiene,  
External site at the Bernhard Nocht Institute, Bundeswehr Hospital  
Hamburg, Hamburg, Germany

<sup>7</sup> Institute for Medical Microbiology, Virology and  
Hygiene, University Medicine Rostock, Rostock, Germany

A few studies suggest that cryptococcosis in immunocompromised hosts without association to HIV may even outnumber HIV-associated cases, potentially indicating a shift in epidemiology [4, 5, 7, 8]. Particularly endangered patient groups comprise solid organ transplant recipients; patients with rheumatic diseases, liver disease, cancer, and hematopoietic diseases; as well as those receiving immunosuppressive therapies [4, 9–12]. Notably, disease also occurs in immunologically competent hosts [13–17]. In addition, the species of the causative agent, i.e., *Cryptococcus neoformans* or *Cryptococcus gattii*, is associated with distinct epidemiological features [18]. This article focuses on a case series of HIV-negative patients with cryptococcal meningitis caused by *C. gattii* in Northern Brazil. The aim of the study was the characterization of the local epidemiology, potential risk factors of infection, clinical complications, and diagnostic as well as typing approaches (multilocus sequence typing (MLST) and antifungal susceptibility).

## Methods

### Clinical isolates and patient population

We performed a prospective study assessing patients with cryptococcal meningitis hospitalized from July 2016 to June 2019 at the Tropical Medicine Foundation Dr. Heitor Vieira Dourado

[Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD)] in Manaus, Amazonas State (AM), Brazil. A total of 7 clinical *Cryptococcus* strains were isolated from cerebrospinal fluid (CSF) obtained from 7 HIV-negative patients. All isolates were stored in Sabouraud dextrose agar tubes at 4 °C at the Medical Mycology Laboratory at FMT-HVD. The strains were purified twice on niger seed plates. Subsequently, only one isolated colony was randomly selected for further analysis.

### Collection of epidemiological and laboratory data

Clinical, epidemiological, and laboratory records of all patients were accessed from the online database of FMT-HVD. The data collected for further analyses included age; gender; geographic location; initial symptoms and subsequent sequelae; HIV infection status; laboratory tests; clinical outcome (death or survival); need for surgical intervention and hospitalization in the intensive care unit (ICU) due to complications, clinical forms, time, and number of hospitalizations; and the amount of positive cultures recovered at the time of initial diagnosis as well as during treatment.

### Ethical clearance

This study was approved by the FMT-HVD Human Research Ethical Committee (CAAE 90749718.3.0000.0005). Patients enrolled in the study

provided their written informed consent, and data were analyzed anonymously.

#### Molecular typing by *URA5*-RFLP

DNA extraction was performed using the phenol/chloroform/ isoamyl-alcohol method [19]. The major molecular types were initially identified applying *URA5*-RFLP (restriction fragment length polymorphism) analysis with the enzymes *Sau96I* and *HhaI* (Thermo Scientific, Waltham, USA) as described by Meyer et al. (2003) [20]. The genotypes were assigned by comparison with respective reference strains: WM 148 (serotype A, VNI), WM 626 (serotype A, VNII), WM 628 (serotype AD, VNIII), WM 629 (serotype D, VNIV), WM 179 (serotype B, VGI), WM 178 (serotype B, VGII), WM 161 (serotype B, VGIII), and WM 779 (serotype C, VGIV).

#### MLST and phylogenetic analysis

MLST (multi-locus sequence typing) analysis was performed by amplification and Sanger sequencing of six housekeeping genes *CAP59*, *GPD1*, *LAC1*, *PLB1*, *SOD1*, and *URA5* as well as the *IGS1* region according to protocols published previously by the ISHAM (International Society for Human & Animal Mycology) [21]. The PCR products were purified with a modified method taken from the literature using polyethylene-glycol/NaCl [22] and were bidirectionally Sanger-sequenced on an ABI3130 DNA Analyzer with BigDye Terminators

v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) at the Laboratory of Functional Genomic and Bioinformatics (Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil). The sequences were manually edited using the software Sequencher 5.4.6 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA), and the contigs were aligned using the Muscle algorithm linked to the software Mega v.10.0.2 [23]. All sequences were assessed by MLST applying the scheme for *C. gattii* (database: <http://mlst.mycologylab.org>) to determine allelic numbers and associated sequence types (ST).

Applying the abovementioned algorithm, the DNA sequences of seven MLST loci from clinical isolates were aligned with the sequences of VGII STs available in the Fungal MLST Database. To verify the genetic and evolutionary relationship among the STs from the HIV-negative patients of this study and the STs previously identified in Northern Brazil, a phylogenetic tree was constructed based on the neighbor-joining (NJ) model with a bootstrap analysis using 1000 replicates. Pairwise distances and the related substitution parameters were estimated by maximizing the composite likelihood. The evolutionary distances were computed using the *p*-distance and all gaps were eliminated [24,25].



## Antifungal susceptibility testing

Antifungal susceptibility testing was performed using the microdilution method in RPMI (Roswell Park Memorial Institute) broth according to the M27-A3 guideline of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [26]. The assessment was performed in duplicate within the following ranges: 0.125–64 µg/mL for fluconazole (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) and 0.03–16 µg/mL for amphotericin B (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) as well as itraconazole (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA).

*Cryptococcus* isolates were sub-cultured on Sabouraud dextrose agar and incubated for 48 h at 35 °C. The yeast colonies were transferred to 5-mL sterile saline solution (0.85%) and adjusted to a density equivalent to the 0.5 McFarland standard scale. The inoculum was adjusted to

$2.5 \times 10^3$  cells in 10 mL of RPMI medium (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) by counting in a Neubauer chamber. The 96-well microplates were incubated at 35 °C for 72 h. The MIC of amphotericin B was determined as the lowest concentration that completely inhibited fungal growth (100%), while for the azoles, the lowest concentration allowing partial reduction (50%) of growth compared with the growth control wells was chosen.

## Statistical analysis

A study database was filled with all assessed clinical, epidemiological, and laboratory information using the Microsoft Office Excel®

software version 2019 16.0.6742.2048 (Microsoft, Redmond, Washington, USA). Statistical analyses (relative frequency, mean, and standard deviation) were performed applying the software R version 3.3.1 (<https://www.r-project>).

## Results

### Clinical and epidemiological data

The most patients described in this case series were from Manaus (3/7) while the other ones lived in the municipalities Manicoré (1/7), Maués (1/7), Parintins (1/7), and São Gabriel da Cachoeira (1/7) (Fig. 1).

The majority of patients were female (4/7). The median age was 36.3 years with a range between 10 and 53 years of age (Table 1). Hypertension (3/7) and diabetes (2/7) were the most frequently observed comorbidities among the HIV-negative cryptococcosis patients. The most common initial signs and symptoms comprised meningitis-associated symptoms like headache (100%), vomiting (71.4%), and photophobia (71.4%), but also weight loss (57.1%). During hospitalization and treatment of the patients, constipation (57.1%), convulsion (57.1%), decreased level of consciousness (57.1%), and delirium (42.9%) were among the most frequently recorded symptoms. The most frequent neurological sequelae comprised decrease of visual acuity (5/7), hearing deficit (1/7), motor deficit (1/7), facial palsy (1/7), cerebral edema/vasculitis (1/7), and dysphagia (1/7). Moreover, disease-associated death was observed for four hospitalized patients during the first 20 days

after admission (Table 1).

### MLST and phylogenetic analysis

*URA5*-RFLP analysis identified all isolates as *C. gattii* genotype VGII. In addition, MLST analysis assigned these 7 strains to three different STs (sequence types). The STs responsible for the observed infections in HIV-negative patients comprised ST20 in Manaus, Maués, Manicoré, and São Gabriel da Cachoeira; ST5 in Parintins and Manaus; as well as ST560 as a newly described ST in the city of Manaus (Fig. 1), (Table 2).

A monophyletic tree was calculated to verify the ancestral relationship of the seven isolates with *C. gattii* strains formerly isolated in the Northern Region of Brazil. The obvious genetic relationship between the sequences of the seven clinical isolates from this study (red color) with the sequences of other

*C. gattii* isolates from the Northern Region of Brazil (green color) obtained from the fungal MLST database is shown in Fig. 2. The red dots indicate the STs responsible for the infections in HIV-negative patients from this study (Fig. 2).

### MIC results

Antifungal susceptibility testing was performed with one isolate per patient ( $n = 7$ ). The antifungals amphotericin B, fluconazole, and itraconazole showed satisfactory inhibitory activity against all *C. gattii* genotype VGII strains. It was observed that amphotericin B and itraconazole were associated with MIC less than 1  $\mu\text{g/mL}$  and fluconazole showed MIC between 1 and 8  $\mu\text{g/mL}$ . The detailed MIC ranges of each drug tested are depicted in Table 3.

Among the assessed cryptococcosis cases in HIV-negative patients from Amazonas (Northern Brazil), we have chosen to exemplarily describe the clinical case of a co-infection with *Cryptococcus gattii* and *Mycobacterium* spp. (patient 3) due to its interesting clinical features.

### Exemplary case report

A 41-year-old female public school teacher, who had been diagnosed 2 years earlier with ganglionic tuberculosis,

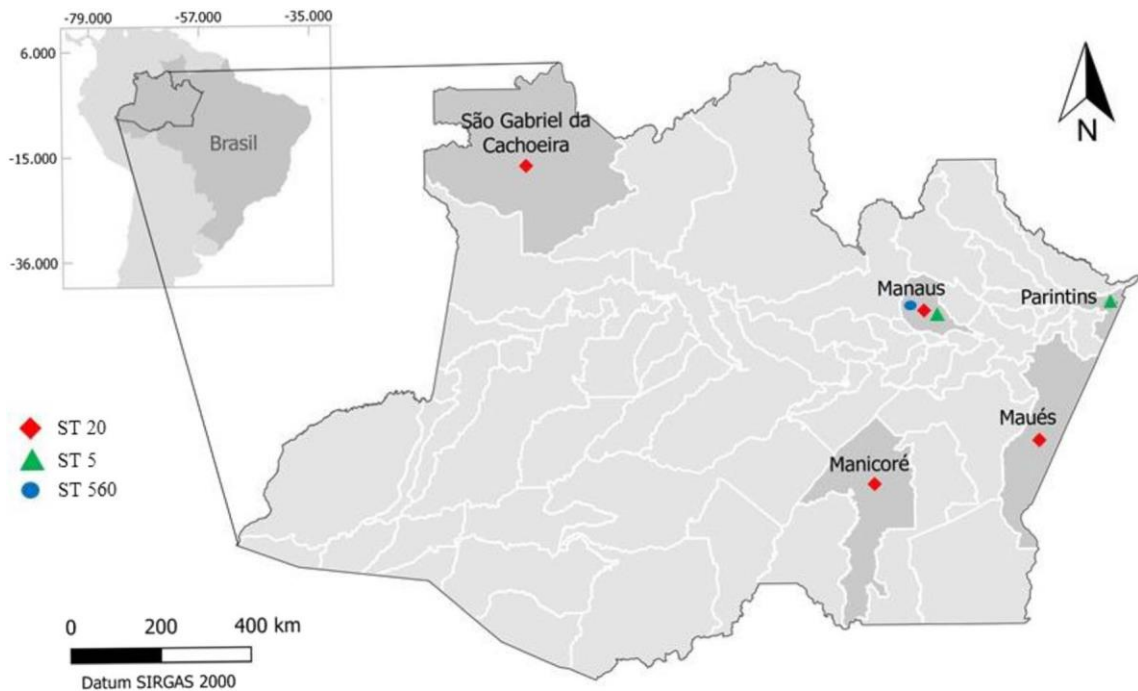


Fig. 1 Map of Brazil showing the origin of the 7 patients assessed and the sequence types of the *Cryptococcus gattii* stains isolated from them (Quantum GIS version 2.18)

suffered from severe headache, fever, neck stiffness, vomiting, and weakness. After 2 months of continuous head-aches, the weak and unconscious patient was sent to the emergency department of a local hospital. Clinically diagnosed with cryptococcosis, she was transferred to the reference hospital for the treatment of cryptococcosis Fundacao de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado. Screening for HIV antibodies and antigen showed negative results. *Cryptococcus* antigen (CRAG) testing was positive in cerebrospinal fluid (CSF). Additional assessed CSF parameters comprised a glucose level of 59.0 mg/dL, a protein level of 59.0 mg/dL, and cytometry indicating 67 cells per mm<sup>3</sup>. Nankin ink staining showed a high density of *Cryptococcus* cells in the budding process. After 48 h, *Cryptococcus* growth was observed on the

culture media bird seed agar, heart brain infusion (BHI) agar, and Sabouraud agar. Treatment was initiated with liposomal amphotericin B; however, due to renal dysfunction, it had to be changed to intravenous fluconazole. During hospitalization, the patient developed acute progressive anemia (Hb (hemoglobin): 5.91/Ht (hematocrit): 17.17), ocular pain, weight loss (12 kg), constipation, jaundice, chronic headache, and episodes of seizures. Neurological imaging showed multiple lesions in the nucleocapsular region (Fig. 3). Since the patient had been diagnosed with ganglion tuberculosis 2 years prior to the diagnosis cryptococcosis, tuberculosis screening was also performed including imaging (chest X-ray) and mycobacterial culture that resulted in the growth of *Mycobacterium tuberculosis* in fecal samples. The patient was diagnosed with intestinal

tuberculosis, and combination therapy with rifampicin (150 mg per day), isoniazid (75 mg per day), pyrazinamide (400 mg per day), and ethambutol (275 mg per day) was initiated. After 57 days of hospitalization, she was dismissed from hospital. Finally, 12 months after treatment with fluconazole, the patient was in a good clinical condition and returned to work.

## Discussion

This work is among the first studies dedicated to the clinical, epidemiological, and laboratory-based characterization of HIV-negative patients with cryptococcal meningitis in the Northern Region of Brazil. Of note, the assessed HIV-negative patients with cryptococcosis had very diverse clinical and epidemiological conditions prior to cryptococcal infection. Cryptococcal meningitis and neurological sequelae (mainly decrease of visual acuity) dominated. *C. gattii* genotype VGII was the causative agent in case of all seven infections. Thereby, three out of these seven isolates belonged to the sequence type ST20, an ST which is well known to be associated with severe neurological manifestations and high mortality rates [31–33].

Cryptococcosis predominantly affected female patients with a median age of 36.3 years and an age spectrum ranging from 10 to 53 years. George et al. (2018) reported an average of 58 years with a range from 18 to 98 years in NTNH patients in the USA [34]. Spec et al. (2016), in contrast, reported a higher frequency of male patients with 66% of

Table 1 Epidemiological and laboratory features of HIV-negative patients with cryptococcosis hospitalized in the period of time between July 2016 and June 2019 at the Tropical Medicine Foundation Dr. Heitor Vieira Dourado (Manaus-Amazonas-Brazil)

	Anonymized patient number						
	1	2	3	4	5	6	7
Gender	M	F	F	M	F	F	M
Age (in years)	50	23	41	25	52	10	53
Initial symptoms (before diagnosis)	Headache, fever, vomiting, ocular pain, asthenia, photophobia, weight loss	Headache, photophobia, nausea, vomiting, diplopia, irritability	Headache, stiff neck, vomiting, photophobia, night sweats, face palsy, weight loss	Headache, stiff neck, fever, seizure, photophobia, weightloss	Headache, seizure, photophobia, ocular pain, stiff neck, lethargy	Headache, fever, vomiting, hyporexia, weight loss, asthenia	Headache, fever, vomiting, hyporexia, asthenia, weightloss
Symptoms developed during the hospitalization	Intestinal constipation, decrease of consciousness, spikes of HBP, weight loss	Paresis IM, seizures, decrease of consciousness	Intestinal constipation, seizures, anemia, delirium, asthenia, weightloss	Decrease of consciousness, paresis ISM, dysphagia, anemia, dysarthria, fever, peripheral neuropathy	Intestinal constipation, decrease of consciousness, tongue palsy, seizures	Intestinal constipation, seizures, delirium, strabismus	Decrease of consciousness, stroke, delirium, weight loss
Duration of initial symptoms until diagnosis (days)	180	150	30	15	730	90	15
Occupation	Construction worker	Housewife	Teacher	Farmer	Housewife	Student	Commercial manager
Medical history	Depression, pericardial tuberculosis	–	Ganglion tuberculosis	Malaria (5 times)	–	–	–
Comorbidities		Hypertension	Intestinal tuberculosis	–	Diabetes, hypertension	–	Diabetes,
CSF level of proteins (mg/dL)	25.0	109.0	59.0	52.0	22.1	29.0	26.7
CSF level of glucose (mg/dL)	47.0	3.0	59.0	44.0	102.0	61.0	46.0
Clinical form	CM	CM	CM	CM	CM	CM	CM
Treatment	AmB + FLU	AmB + FLU	LAmB-L+ FLU	AmB + FLU	AmB + FLU	AmB + FLU	AmB + FLU
Time of hospitalization in the ICU (days)	4	5	–	26	–	–	5
Sequelae*	Ocular choroiditis (R)	Loss of vision (R, L)	Decrease of visual and hearing acuity	Facial palsy (R), dysarthria, motor dysfunction	Decrease of visual	Loss of vision (R), decrease of vision acuity	–
Time of hospitalization (days)	18	20	57	100	13	85	15
Clinical outcome	Death	Death	Recovered	Recovered	Death	Recovered	Death
Microorganism	<i>C. gattii</i> (VGII/ST20)	<i>C. gattii</i> (VGII/ST5)	<i>C. gattii</i> (VGII/ST5)	<i>C. gattii</i> (VGII/20)	<i>C. gattii</i> (VGII/ST20)	<i>C. gattii</i>	<i>C. gattii</i>

*HBP* high blood pressure, *CM* cryptococcal meningitis, *ICU* intensive care unit, *ISM* inferior and superior members, *AmB* amphotericin B, *LAmB* liposomal amphotericin B, *FLU* fluconazole; ( )=not reported; *F* female, *M* male, *CFS* cerebrospinal fluid, *R* right, *L* left. \*In the present work, sequels were considered pathologies that persisted after the end of hospitalization and antifungal treatment P patient, FMT Fundacao de Medicina Tropical, ST sequence type.

Table 2 Molecular types of *C. gattii* isolates and the numerical sequences of the alleles in MLST

Isolate	Genotype	Alleles in MLST							ST
		CAP59	GPD1	IGS1	LAC1	PBL1	SODCG	URA5	
P1FMT-66	VGII	1	1	4	4	1	14	7	20
P2FMT-103	VGII	3	16	15	4	9	23	2	5
P3FMT-111	VGII	3	16	15	4	9	23	2	5
P4FMT-215	VGII	1	1	4	4	1	14	7	20
P5FMT-339	VGII	1	1	4	4	1	14	7	20
P6FMT-346	VGII	1	1	4	4	1	14	7	20
P7FMT-829	VGII	2	6	27	4	1	104	2	560

cases [7]. Various studies indicated that HIV-negative patients with cryptococcosis are significantly older compared with HIV-positive cryptococcosis patients [5, 7, 35].

In the present work, most of the patients reported a long period of time between the initial symptoms and the diagnosis of cryptococcal meningitis. In particular, this was true for the patients 1, 2, and 5. The medical history prior to the diagnosis was provided by the patients in the course of interviews specifically addressing this topic. Necessarily, subjective experience influenced the patients' descriptions of symptoms

and comorbidities regarding this period. As a common feature, patients 1, 2, and 5 described headache and photophobia, suggesting rather mild infections.

All 7 HIV-negative patients in this study were diagnosed with manifestations of cryptococcal meningitis. This clinical form is predominant in this region as also indicated by the results of a previous study carried out by Rocha et al. (2018) [27]. This finding is in contrast to the observations in resource-rich industrialized countries. In the USA, only 50% out of a total of 300 HIV-negative patients with cryptococcosis

Fig. 2 Unrooted neighbor-joining (NJ) tree constructed applying the software Mega v.10.0.2 with the concatenated data set of seven MLST loci (CAP59, GPD1, IGS1, LAC1, PLB1, SOD1, and URA5), showing the genetic relatedness of clinical isolates of *C. gattii* VGII from the Northern Region of Brazil with those obtained from the fungal MLST database (<http://mlst.mycologylab.org>) with known geographic origin. Abbreviations: AM (Amazonas), RR (Roraima), and PA (Para). References: [24, 25, 27–30]

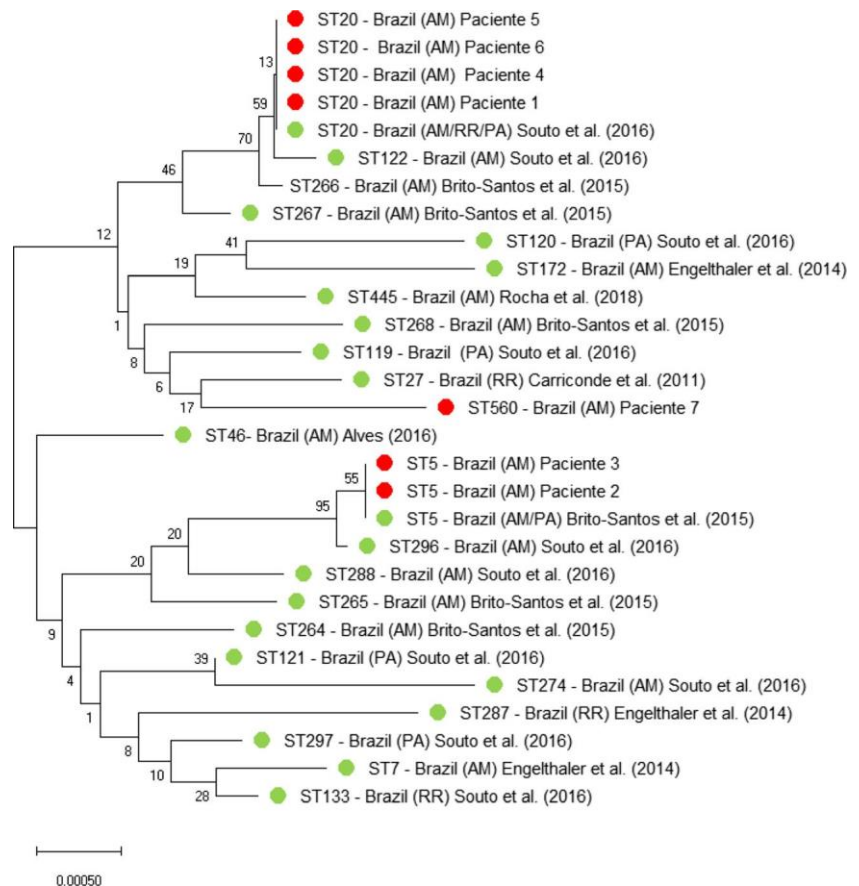


Table 3 Minimal inhibitory concentration of clinical *C. gattii* isolates from Amazonas, Brazil, to antifungals

Antifungal	Cryptococcus gattii isolates						
	P1FMT-66	P2FMT-103	P3FMT-111	P4FMT-215	P5FMT-339	P6FMT-346	P7FMT-829
Amphotericin B MIC ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	0.03	0.03	0.03	0.25	0.03	< 0.03	0.03
Fluconazole MIC ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	4	8	4	2	4	4	1
Itraconazole MIC ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	0.12	0.12	0.62	0.12	0.12	0.12	< 0.03

P patient, FMT Fundacao de

Medicina Tropical, MIC minimum inhibitory concentration



showed CNS (central nervous system) involvement. Most likely, the considerable delay in diagnosing cryptococcosis in this study is a reason for this difference associated with the risk of severe clinical courses.

Another important finding of the study was the description of the sequelae, which were mostly related to optical (papilledema and retinal hemorrhage) and auditory impairment. As described previously, neurological sequelae are more prominent in HIV-negative patients and can cause cognitive impairment in up to 78% of the reported cases [7]. The observed mortality in the present study was 57.2% (4/7) and thus higher than the mortality rates of 45.0% (10/22) as reported by Aye et al. (2016), 20.7% (304/1470) as reported by George et al. (2018), and 41.1% (65/108) as observed by Hevey et al. (2019) [11, 34, 35]. The high mortality rate in the here-described study may have been a consequence of late diagnosis. Such an association has been shown in a study conducted at the University of Alabama, which suggested that the prolonged time to diagnosis is responsible for increased 90 days mortality [4, 5]. Of note, the comparably low number of only 7 patients was associated with high impact of single fatal courses on the mortality rate.

Another aim of the study was the correlation of comorbidities with the acquisition of cryptococcosis. From the 7 patients assessed, the recorded comorbidities comprised arterial hypertension (n = 3), diabetes mellitus (n = 2), and tuberculosis (n = 1). Diabetes mellitus has been considered a risk factor for cryptococcosis previously [12]. Hyperglycemia can lead to a decline of the number of immune cells, a likely explanation for the association between cryptococcosis and diabetes mellitus [36]. Arterial hypertension can be associated with stroke as shown in the case of patient 7 (Table 1), and cerebral infarction in patients with neurocryptococcosis is associated with high mortality [37].

Cases with cryptococcosis and tuberculosis co-infection are common in places where tuberculosis is endemic. According to the health surveillance secretariat's report in 2018, a total of 72,788 new tuberculosis cases were recorded in Brazil. Amazonas is the state with the most tuberculosis cases in Brazil with an incidence rate of 72.9 cases per 100,000 inhabitants [38]. There is evidence that both cryptococcosis and tuberculosis show immunomodulatory activity in the host and that one disease may act as a gateway for the other, because they act synergistically in the dysregulation of the host's immune response [39]. The case report as detailed in the present work shows that the patient had ganglionic tuberculosis 2 years prior to the diagnosis of cryptococcosis and suggests that cryptococcosis may have possibly contributed to the reactivation of tuberculosis. *Cryptococcus* spp. isolates from the *C. neoformans*/*C. gattii* complex produce melanin and capsule polysaccharide (GXM) that cause suppression of immune cells by inactivating T cells, by preventing the migration of T lymphocytes, and by causing apoptosis of macrophages. All these mechanisms predispose patients to active tuberculosis or reactivation of the disease [40].

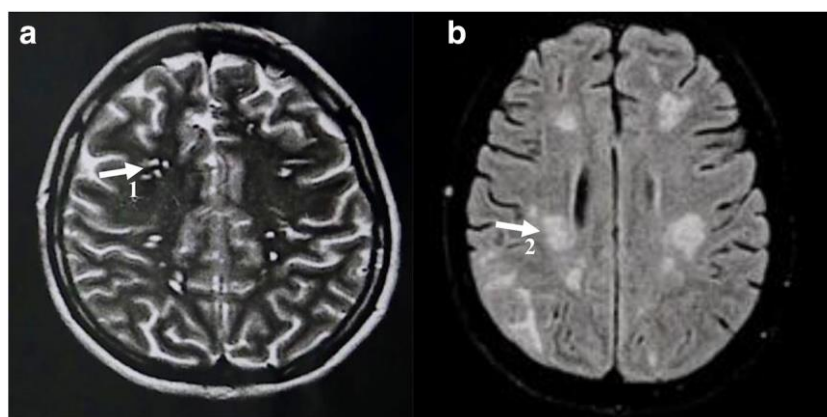



Fig. 3 Magnetic resonance imaging of the patient's brain. (A) Axial T2- treatment showing signs of alteration of the subcortical white substance weighted turbo-spin-echo image after 1 month of treatment showing mul- of the cerebral and cerebellar hemispheres, particularly abundant in the tiple lesions in the nucleo-capsular region as well as potentially related parieto-occipital regions (2), signs of a breakdown of the blood-brain gelatinous pseudo-cysts (1) due to cryptococcosis. (B) Image with the barrier, and an inflammatory process resulting from meningoencephalitis turbo-spin-echo technique in T2 in the axial plane after 7 months of

Infections by *C. gattii* of genotype VGII were observed in this study without exemption. This genotype is widely dispersed in Brazil and was also responsible for the Vancouver outbreak in Canada [2, 43, 44]. In addition, *C. gattii* infections have been described as common in HIV-negative hosts in Australia and South America [45]. The sequence types among the  Springer isolates in the present study were ST20 (VGIIa), followed by ST5, and the new sequence type

ST560. VGIIa strains are associated with high virulence, rapid reproducibility at 37 °C, and higher melanin production compared with other genotypes [46]. In particular, ST20 clades (VGIIa) have been responsible for the Vancouver outbreak in Canada in 1999. Probably, Canadian and South American ST20 strains have a common ancestor, suggesting that this clonal lineage originally came from South America [28, 47, 48]. Further, there have been descriptions of the occurrence of ST5 in Amazonas isolated from household dust, mainly in wooden houses [25].

Antifungal susceptibility testing indicated low amphotericin B and itraconazole MICs for the seven clinical isolates, ranging from <0.62–0.25 µg/mL to <0.62–0.12 µg/mL, respectively. Resistance to these antifungals is uncommon, although there has been a report on a clinical *C. gattii* VGII strain with a MIC of 2 µg/mL for amphotericin B [48]. All isolates were susceptible to fluconazole, with MICs ranging from 1 to 8 µg/mL. Lee et al. (2019) also described reliable clinical susceptibility of clinical strains of the clonal lineages VNI, VNII, VGI, and VGII that did not show high MICs in microdilution testing. In Lee's study, MIC variation of the strains of the VGII genotype was 0.5–0.5 µg/mL for amphotericin B, 2–4 µg/mL for fluconazole, and 0.015–0.03 µg/mL for itraconazole, respectively [49]. However, higher MICs against fluconazole ranging from 2 to 64 µg/mL have been described for individual strains of the VGII genotype [27, 48, 50]. In the presented study, none of the seven patients suffered from recurrent cryptococcosis, a condition with known association with resistance to antifungal drugs [51].

## Conclusion

In this study, seven cases of cryptococcal meningitis in HIV-negative patients in Northern Brazil were characterized. The patients' age ranged about several decades (10–53 years of age), observed comorbidities were only indirectly related or unrelated to the immune status, and the main sequelae were neurological ones. We highlighted the delay in diagnosing cryptococcosis with the risk of severe clinical courses and rapid dying even of HIV-negative patients. *C. gattii*, mainly of the molecular type VGIIa, was the only observed etiologic agent. This genotype is widely dispersed in Brazil and was also responsible for the Vancouver outbreak in Canada. Multilocus sequencing typing identified the sequence types ST20, ST5, and a newly described sequence type ST560. The antifungals amphotericin B, fluconazole, and itraconazole showed satisfactory inhibitory activity in microdilution testing against all *C. gattii* VGII strains.


**Acknowledgments** We thank the medical staff of the FMT-HVD and all participating patients for providing the clinical and epidemiological data. We thank the Mycology and Mycobacteriology laboratories of the National Research Institute of Amazonia (INPA) for assistance with equipment and reagents. In addition, we are also grateful to the Laboratory of Functional Genomics and Bioinformatics of Oswaldo Cruz Institute (Fiocruz, RJ) for the indispensable support regarding the DNA sequencing procedures and to Dr. Jaidson Nandi Becker for designing the map used in this publication.

**Funding** We wish to thank the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) program for financial support and the Amazonas Research Foundation (FAPEAM) for funding this research: Public Notice N. 001/2017 – PPSUS.

**Compliance with ethical standards**

**Conflict of interest** The authors declare that there are no conflicts of interest.

## References

1. Rajasingham R, Smith RM, Park BJ, Jarvis JN, Govender NP, Chiller TM, Denning DW, Loyse A, Boulware DR (2017) Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. *Lancet Infect Dis* 17:873–881
2. Chen SCA, Meyer W, Sorrell TC (2014) *Cryptococcus gattii* infections. *Clin Microbiol Rev* 27:980–1024
3. Williamson PR, Jarvis JN, Panackal AA, Fisher MC, Molloy SF, Loyse A, Harrison TS (2016) Cryptococcal meningitis: epidemiology, immunology, diagnosis and therapy. *Nat Rev Neurol* 13:13–24
4. Bratton EW, El Husseini N, Chastain CA, Lee MS, Poole C, Stürmer T, Juliano JJ, Weber DJ, Perfect JR (2012) Comparison and temporal trends of three groups with cryptococcosis: HIV-infected, solid organ transplant, and HIV-negative/non-transplant. *PLoS One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043582>
5. Brizendine KD, Baddley JW, Pappas PG (2013) Predictors of mortality and differences in clinical features among patients with cryptococcosis according to immune status. *PLoS One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060431>
6. Zhu LP, Wu JQ, Xu B, Ou XT, Zhang QQ, Weng XH (2010) Cryptococcal meningitis in non-HIV-infected patients in a Chinese tertiary care hospital, 1997–2007. *Med Mycol*. <https://doi.org/10.3109/13693780903437876>
7. Spec A, Raval K, Powderly WG (2016) End-stage liver disease is a strong predictor of early mortality in cryptococcosis. *Open Forum Infect Dis* 3:1–5
8. Pappas PG (2013) Cryptococcal infections in non-HIV-infected patients. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 124:61–79
9. Pappas PG, Perfect JR, Cloud GA et al (2001) Cryptococcosis in human immunodeficiency virus–negative patients in the era of effective azole therapy. *Clin Infect Dis*. <https://doi.org/10.1086/322597>
10. Yuchong C, Fubin C, Jianghan C, Fenglian W, Nan X, Minghui Y, Yalin S, Zhizhong Z (2012) Cryptococcosis in China (1985–2010): review of cases from Chinese database. *Mycopathologia* 173:329–335
11. Hevey MA, George IA, Raval K, Powderly WG, Spec A (2019) Presentation and mortality of cryptococcal infection varies by predisposing illness: a retrospective cohort study. *Am J Med*. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2019.04.026>
12. Beardsley J, Sorrell TC, Chen SC-A (2019) Central nervous system cryptococcal infections in non-HIV infected patients. *J Fungi* 5:71
13. St-Pierre J, Dufresne PJ, Carignan A, Lévesque É, Bernard F, Longtin J, LeBlanc L (2018) Case series: report of the first two human indigenous cases of *Cryptococcus gattii* infection in eastern Canada. *Mycopathologia* 183:399–406 

14. Bauer M, Wickenhauser C, Haak A et al (2018) Case report: a fatal case of cryptococcosis in an immunocompetent patient due to *Cryptococcus deuterogattii* (AFLP6/VGII). *JMM Case Reports*. <https://doi.org/10.1099/jmmcr.0.005168>
15. Aldemir Kocabaş B, Emin Parlak M, Özhak Baysan B, Karaali K, Bingöl A, Haspolat Ş (2018) Disseminated cryptococcosis with severe increased intracranial pressure complicated with cranial nerve palsy in a child. *Pediatr Infect Dis J* 37:373–375
16. Correa-Forero V, Pinilla-Monsalve GD, Valderrama-Chaparro JA, Amaya-Gonzalez P (2020) Cryptococcal meningitis presenting as acute flaccid paralysis: a case report. *J Infect Public Health* 13:143–148
17. Andreou M, Cogliati M, Kolonitsiou F, Stroumpos C, Stamouli V, Ravazoula P, Siagris D, Papadogeorgaki H, Christofidou M, Lekkou A (2020) *Cryptococcus gattii* infection in an immunocompetent host in Greece. *Med Mycol Case Rep* 27:1–3
18. Kwon-Chung KJ, Bennett JE, Wickes BL et al (2017) The case for adopting the “species complex” nomenclature for the etiologic agents of cryptococcosis. *mSphere* 2:1–7
19. Ferrer C, Colom F, Frasés S, Mulet E, Abad JL, Alió JL (2001) Detection and identification of fungal pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S ribosomal DNA typing in ocular infections. *J Clin Microbiol* 39:2873–2879
20. Meyer W, Castañeda A, Jackson S et al (2003) Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerg Infect Dis*. <https://doi.org/10.3201/eid0902.020246>
21. Meyer W, Aanensen DM, Boekhout T et al (2009) Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Med Mycol* 47:561–570
22. Dunn IS, Blattner FR (1987) Charons 36 to 40: multi enzyme, high capacity, recombination deficient replacement vectors with polylinkers and polystuffers. *Nucleic Acids Res* 15:2677–2698
23. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018) MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol* 35:1547–1549
24. Souto ACP, Bonfietti LX, Ferreira-Paim K et al (2016) Population genetic analysis reveals a high genetic diversity in the Brazilian *Cryptococcus gattii* VGII population and shifts the global origin from the Amazon rainforest to the semi-arid desert in the northeast of Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 10:1–19
25. Brito-Santos F, Barbosa GG, Trilles L, Nishikawa MM, Wanke B, Meyer W, Carvalho-Costa FA, Dos Santos Lazéra M (2015) Environmental isolation of *Cryptococcus gattii* VGII from indoor dust from typical wooden houses in the deep Amazonas of the Rio Negro basin. *PLoS One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115866>
26. Clinical and Laboratory Standards Institute (2008) Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard, 3rd edn. CLSI M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne
27. Rocha DFS, Cruz KS, Santos CSDS, Menescal LSF, Neto JRDS, Pinheiro SB, Silva LM, Trilles L, Braga de Souza JV (2018) MLST reveals a clonal population structure for *Cryptococcus neoformans* molecular type VNI isolates from clinical sources in Amazonas, northern-Brazil. *PLoS One* 13:1–15
28. Engelthaler DM, Hicks ND, Gillece JD et al (2014) *Cryptococcus gattii* in north American Pacific northwest: whole-population genome analysis provides insights into species evolution and dispersal. *MBio* 5:1–18
29. Carriconde F, Gilgado F, Arthur I, Ellis D, Malik R, van de Wiele N, Robert V, Currie BJ, Meyer W (2011) Clonality and  $\alpha$ -a recombination in the Australian *Cryptococcus gattii* VGII population - an emerging outbreak in Australia. *PLoS One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016936>
30. Alves GSB (2016) Genotipagem De *Cryptococcus neoformans* E *C. gattii* Isolados De Poeira Domiciliar E Avaliação Da Susceptibilidade a antifúngicos E Da Presença Do Aantígeno Em Moradores De Uma Comunidade Rural Do Amazonas. [Monografia] Universicade Fed do Amaz 1–71
31. Dos Santos WRA, Meyer W, Wanke B et al (2008) Primary endemic *Cryptococcus gattii* by molecular type VGII in the state of Pará, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103:813–818
32. Khell Da Silva B, Freire AK, Dos Santos Bentes A, De Lima Sampaio I, Oliveira Santos L, Silva Dos Santos M, De Souza JV (2012) Characterization of clinical isolates of the *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex from the Amazonas state in Brazil. *Rev Iberoam Micol* 29:40–43
33. Trilles L, Lazéra MDS, Wanke B, Oliveira RV, Barbosa GG, Nishikawa MM, Morales BP, Meyer W (2008) Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103:455–462
34. George IA, Spec A, Powderly WG, Santos CAQ (2018)

- Comparative epidemiology and outcomes of human immunodeficiency virus (HIV), non-HIV non-transplant, and solid organ transplant associated cryptococcosis: a population-based study. *Clin Infect Dis*. <https://doi.org/10.1093/cid/cix867>
35. Aye C, Henderson A, Yu H, Norton R (2016) Cryptococcosis—the impact of delay to diagnosis. *Clin Microbiol Infect* 22:632–635
  36. Lin KH, Chen CM, Chen TL, Kuo SC, Kao CC, Jeng YC, Ho MW (2016) Diabetes mellitus is associated with acquisition and increased mortality in HIV-uninfected patients with cryptococcosis: a population-based study. *J Inf Secur* 72:608–614
  37. Lan S-H (2001) Cerebral infarction in chronic meningitis: a comparison of tuberculous meningitis and cryptococcal meningitis. *Qjm* 94:247–253
  38. Ministério da Saúde Brasil (2019) Brasil Livre da Tuberculose: evolução dos cenários epidemiológicos e operacionais da doença. *Bol Epidemiológico* 50:1–18
  39. Van Tongeren L, Shaipanich T, Fleetham JA (2011) Coinfection with *Cryptococcus gattii* and *Mycobacterium tuberculosis* in an otherwise healthy 18-year-old woman. *Can Respir J* 18:62–64
  40. Huffnagle GB, Chen GH, Curtis JL, McDonald RA, Strieter RM, Toews GB (1995) Downregulation of the afferent phase of T cell mediated pulmonary inflammation and immunity by a high melanin-producing strain of *Cryptococcus neoformans*. *J Immunol* 155:3507–3516
  41. Decote-Ricardo D, LaRocque-de-Freitas IF, Rocha JDB, Nascimento DO, Nunes MP, Morrot A, Freire-de-Lima L, Previato JO, Mendonça-Previato L, Freire-de-Lima CG (2019) Immunomodulatory role of capsular polysaccharides constituents of *Cryptococcus neoformans*. *Front Med* 6:1–8
  42. Tajima K, Yamanaka D, Ishibashi K, Adachi Y, Ohno N (2019) Solubilized melanin suppresses macrophage function. *FEBS Open Bio* 9:791–800
  43. Kidd SE, Hagen F, Tschärke RL, Huynh M, Bartlett KH, Fyfe M, MacDougall L, Boekhout T, Kwon-Chung KJ, Meyer W (2004) A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *Proc Natl Acad Sci* 101:17258–17263
  44. Vilas-Bôas AM, Andrade-Silva LE, Ferreira-Paim K, Mora DJ, Ferreira TB, Santos D de A, Borges AS, Melhem M de SC, Silva-Vergara ML (2020) High genetic variability of clinical and environmental *Cryptococcus gattii* isolates from Brazil. *Med Mycol*:1–12
  45. Phillips P, Galanis E, Macdougall L et al (2015) Longitudinal clinical findings and outcome among patients with *Cryptococcus gattii* infection in British Columbia. *Clin Infect Dis* 60:1368–1376
  46. Ngamskulrungronj P, Serena C, Gilgado F, Malik R, Meyer W (2011) Global VGIIa isolates are of comparable virulence to the major fatal *Cryptococcus gattii* Vancouver Island outbreak genotype. *Clin Microbiol Infect*. <https://doi.org/10.1111/j.14690691.2010.03222.x>
  47. Science E, Engelthaler DM, Casadevall A (2019) Northwest: ballast tanks, tsunamis, and Black Swans. *MBio* 10:1–10
  48. Trilles L, Meyer W, Wanke B, Guarro J, Lazéra M (2012) Correlation of antifungal susceptibility and molecular type within the *Cryptococcus neoformans/C. gattii* species complex. *Med Mycol* 50:328–332
  49. Lee GA, Arthur I, Merritt A, Leung M (2019) Molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Western Australia and correlation with antifungal susceptibility. *Med Mycol* 1–7
  50. Chowdhary A, Randhawa HS, Sundar G, Kathuria S, Prakash A, Khan Z, Sun S, Xu J (2011) In vitro antifungal susceptibility profiles and genotypes of 308 clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii* serotype B from North-Western India. *J Med Microbiol* 60:961–967
  51. Rodriguez-Goncer I, Bongomin F, Doran HM, Novak-Frazer L, Masania R, Moore CB, Richardson MD (2018) A case of pulmonary cryptococcoma due to *Cryptococcus gattii* in the United Kingdom. *Med Mycol Case Rep* 21:23–25

**13. APÊNDICE A: ARTIGO 2:** *New ST623 of Cryptococcus neoformans isolated from a patient with non-Hodgkin's lymphoma in the Brazilian Amazon.*

CASE REPORT

Open Access



# New ST623 of *Cryptococcus neoformans* isolated from a patient with non-Hodgkin's lymphoma in the Brazilian Amazon

Lucyane Mendes Silva<sup>1,2</sup>, William Antunes Ferreira<sup>2,3</sup>, Roberto Alexandre Alves Barbosa Filho<sup>4</sup>, Marcus Vinicius Guimarães Lacerda<sup>5,6</sup>, Guilherme Motta Antunes Ferreira<sup>1,2</sup>, Maria de Nazaré Saunier<sup>1</sup>, Marielle Machado Macedo<sup>1,2</sup>, Denise de Almeida Cristo<sup>1,2</sup>, Marla Jalene Alves<sup>6</sup>, Ani Beatriz Jackisch-Matsuura<sup>6</sup> and Cristina Motta Ferreira<sup>1,2\*</sup>

## Abstract

**Background:** Cryptococcosis is a disease of wide geographic distribution. It is most critical when it affects immunocompromised patients, with AIDS, tuberculosis or other diseases that require prolonged hospitalization.

**Methods:** This study described a case report, molecular epidemiology, the phylogenetic relationship, along with antifungal susceptibility test of a new ST 623 of *C. neoformans* isolated in a patient with non-Hodgkin's Lymphoma, from Manaus, Brazil.

**Results:** The new *C. neoformans* was susceptible to all antifungal drugs tested. Our results showed that ST623 new clone has no evident evolutionary proximity to any other ST of the VNI subtype group identified in Brazil.

**Conclusions:** In the context of phylogenetic analysis, this new genotype belongs to VNI subtype, and subsequent complete genome studies are necessary to better understand the phylogenetic relationships amongst STs in this group.

**Keywords:** Phylogeny, *C. neoformans*, MLST, Non-Hodgkin disease, ST623

## Background

Cryptococcosis is a serious disease possessing a wide geographic distribution, with a global burden of 957,900 cases of cryptococcal meningitis per year, resulting in 624,700 deaths [1]. This disease is an opportunistic mycosis caused by a complex called *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* [2], classified into four subtypes: VNI-VNII, VNIII, VNIV and VGI, VGII, VGIII, VGIV [3]. They are frequently isolated from bird excreta and trees hol-

penetrating the human host by inhaling infectious propagules [4], or through injured skin, causing different infections such as pulmonary cryptococcosis, nodules on the skin, meningitis or cryptococcal fungemia [3, 5–8].

In Latin America, there are records of 2400 deaths per year [9]. In countries like Colombia, the annual incidence is 2.4/cases/10<sup>6</sup> inhabitants. In Mexico, the prevalence in patients with immunosuppression caused by



different diseases is 21%; while in Venezuela it is 19%; and in Argentina, the prevalence is 20% [10]. In the city of Rio de Janeiro, Brazil, the annual incidence of cryptococcal meningitis is 0.45 cases/10<sup>6</sup>

inhabitants, while in North eastern Brazil; it is considered endemic.

Brazilian Ministry of Health evidence annual incidence of 7000 cases of cryptococcal meningoencephalitis [11].



---

\*Correspondence: [cris\\_motta\\_ferr@yahoo.com.br](mailto:cris_motta_ferr@yahoo.com.br)

<sup>1</sup> Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas-HEMOAM,

© The Author(s) 2020. This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

As it is considered an opportunistic mycosis, and potentially severe in certain patients, the availability of more sensitive tests for an enhanced routine laboratory diagnosis and treatment efficacy are indispensable for the proper control and monitoring of cryptococcosis. This rapid communications describes the molecular epidemiology, the phylogenetic relationships and the results of antifungal susceptibility test of a new ST (Sequencing Typing) from *C. neoformans* (ST 623).

This study was approved by the Foundation Human Research Ethical Committee (CEP/HEMOAM) under CAAE N° 73548017.5.0000.0009, and all methods were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations. Patients and a parent or guardian of any child participant enrolled in the study provided their written informed consent, before specimens were collected and the results and data were used for the management of each respective patient.

### Case report

A 72 years old, retired farmer, living in the city of Manaus-Amazon-Brazil, sought care at the State Center of Reference in Dermatology—"Alfredo da Matta" Foundation; reported that he observed a tumor approximately 4 cm in diameter in the occipital region, among others distributed diffusely throughout the body. A posterior cervical lymph node biopsy was performed

and he was diagnosed with non-Hodgkin lymphoma. During the same period, an abdomen scan was ordered, and he was referred to the Foundation Hospital of Hematology and Hemotherapy Blood Center of Amazonas (HEMOAM), a reference center for Onco-hematologic Diseases.

On May 06, 2017, he was treated at HEMOAM with generalized pruritus symptom and palpable liver. He was medicated with antihistamine and antipruritic. On July 06, 2017 after consultations with hematologists, blood tests were performed complementary to the diagnosis to start chemotherapy of LYMPHOMA. On December 06, 2017 the patient presented: abdominal computed tomography (TC Abd): cervical region with expansive/ infiltrative lymph node mass, determining almost complete thrombosis of the left internal jugular vein + pulmonary emphysema + multiple mediastinal and axillary lymph node enlargement involving visceral/level and left internal mammary chain, retroperitoneal and mesenteric, inguinal, thoraco-lumbar and internal jugular vein thrombosis (tumor compression); and Hepatitis C (HCV) reagent. The patient was submitted to chemotherapy protocol from August 08, 2017 until October 10, 2017.

for lymphoma, the patient presented a fever 37.5 °C (99.5 °F), coryza, sneezing, and elevation of transaminases with rates three times above normal limits. Subsequently, he attended the HEMOAM emergency room reporting weakness, a febrile peak of 38 °C (100.4 °F), vertigo, lack of appetite, nausea and epigastralgia. The laboratory findings were as follows: Haemoglobin (Hb): 12.6 g/L; Hematocrit (Ht) 36.8%; Platelet: 101,000/mm<sup>3</sup>; neutrophil: 9.8%; leucocyte: 2400/mm<sup>3</sup>; positive blood culture for *Cryptococcus neoformans*, and the diagnosis of Aplasia after chemotherapy. The patient was admitted for parenteral treatment with the antibiotics cefepime + clarithromycin and blood cultures were performed. However, due to his worsening clinical conditions, he was transferred to a University Hospital in Manaus on November 06, 2017.

Remaining in the ward of the University Hospital, the patient started treatment with Fluconazol 200 mg for 14 days, after culture result identifying the presence of yeasts. The patient continued in the ward, with worsening clinical evolution of: pulmonary infection + Neurological syndrome (seizure absence? + disorientation + cognitive alteration) + Hydroelectrolytic disturbance (hypokalemia) + Intestinal constipation + Plaquetopenia.

Cefepime and Clarithromycin empirically therapy was discontinued,

substituted by the Meropenem antibiotic. From November 07, 2017 to November 09, 2017 the clinical condition evolved to cardio-respiratory arrest in Asystole, followed by resuscitation and transferred to the Intensive Care Unit (ICU); still critical under antibiotic therapy, another cardiac arrest on November 09, 2017 and, due to respiratory septic shock, evolved to death.

## Materials and methods

### Laboratorial identification and antifungal susceptibility test

Following the two positives blood cultures (BACT/ALERT FA PLUS, Biomérieux, Brasil), the subculture was carried out in modified Sabouraud dextrose agar medium [12] and later in the media of canothothin-glycine blue bromothymol (CGB) and Niger Seed Agar for species differentiation. The phenotypic identification and minimum inhibitory concentration (MIC) values for fluconazole, amphotericin B and flucytosine were performed using VITEK-2 Compact equipment (bioMérieux, Brazil). Aliquots of the *C. neoformans* were stored at -80 degrees Celsius (°C), in a cryotube with Brain Heat Infusion Broth (BHI) (Himedia, Hexasystens-Mumbai, India) + 20% Glycerol for further molecular testing.

### Determination of molecular type

DNA was extracted using DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. The molecular identification of the fungus was determined applying the enzymatic restriction protocol (PCR-RFLP). The reaction for amplification of the gene was carried out in a reaction volume of 25 µl. Each reaction contained 2 µl of genomic DNA extract (28 ng); 2.5 µl of 10× PCR buffer; 2.5 µl of MgCl<sub>2</sub> (50 mM); 5 µl of DNTp mix (2.5 µM) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); 0.5 µl of the primers FW-5'-ATGTCCTCCCAAGC CCTCGA CTCCG-3'; SJ01-5'-TTAAGACCTCTGAACACC

GCTCC-3' (10 µM) and 0.5 µl of Taq DNA polymerase (5 U/ml) (Invitrogen), Martins et al. [4]. Reactions were performed on a thermal cycler (Proflex PCR system, Applied Biosystems, Foster City, CA) at the following conditions: Initial denaturation at 95 °C for 5 min, followed by 40 cycles at 95 °C for 5 min; 95 °C for 45 s; annealing at 55 °C for 45 s (ranging from 55 °C, 56 °C, 56.5 °C to 57 °C), extension at 72 °C for 2 min, then final extension at 72 °C for 7 min, Martinset al. [4].

The PCR product was demonstrated by SYBR<sup>TM</sup> safe (Invitrogen) DNA gel electrophoresis on 1.5% agar gels. Following this, sequencing was performed using the ABI PRISM 3130 XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City,

CA), according to manufacturer's instructions. Sequences generated in the forward and reverse directions were read using Geneious v.11 software. A consensus sequence was extracted after being checked for discrepancies or mutations. The results were compared with the genomic DNA deposited in the site database (<http://mlst.mycologylab.org/>). The analysis of Multilocus Sequence Typing (MLST) for *C. neoformans* was performed according to the site protocol (<http://mlst.mycologylab.org/>).

Sequences of the MLST genes from *C. neoformans*, isolated from HEMOAM, were compared with other VNI subtypes sequences, selected due to genetic proximity criterion that ST623 has with this group. The sequences of the subtype are deposited in the MLST database (<http://mlst.mycologylab.org/>), totaling 174 samples. The nucleotide sequences of the seven alleles of the 174 samples were edited and aligned by the MEGA X program using the MUSCLE tool [13, 14]. The alignment were analysed using MEGA X and DnaSP 6.0 programs. The phylogenetic tree were edited using ITOL program (<https://itol.embl.de>) [15]. To reconstruct the phylogenetic relationship between STs and VNI subtypes, the sequence of the seven MLST markers were concatenated and analysed to choose the evolutive model 'Kimura 2

parameters' for analysis, with gamma distribution and invariable substitution rates. One tree underwent 1000 resamples per bootstrap. Pearson's correlation coefficient ( $r$ ) was used to analyze the correlation between nucleotide diversity and the number of MLST alleles, as well as the number of haplotypes and the MLST alleles.

## Results and discussion

The microbiological test realized identified *Cryptococcus neoformans*. MIC showed susceptibility to all antifungal tested, with values of 1  $\mu\text{g/ml}$  for fluconazole, 2  $\mu\text{g/ml}$  for flucytosine and 0.5  $\mu\text{g/ml}$  for amphotericin B. PCR–RFLP protocol identified the molecular type VNI, and comparative analyzes with the sequences deposited on the MLST website, made it possible to identify a new clone of *Cryptococcus neoformans* **ST623**. GenBank accession numbers of the *C. neoformans* allele from our case are MN065812, MN065813, MN065814, MN065815, MN065816, MN065817, and MN065818.

It was also observed that nucleotide diversity (Fig. 1) was higher when compared to all *C. neoformans* STs results studied by Muñoz et al. [16]. Of the seven genes analyzed, IGS1 presented the highest number of alleles (30) and highest nucleotide diversity (0.01864). The CAP53 presented the lowest values of alleles (13) and nucleotide diversity (0.0162).

A strong positive correlation of  $r=0.80$

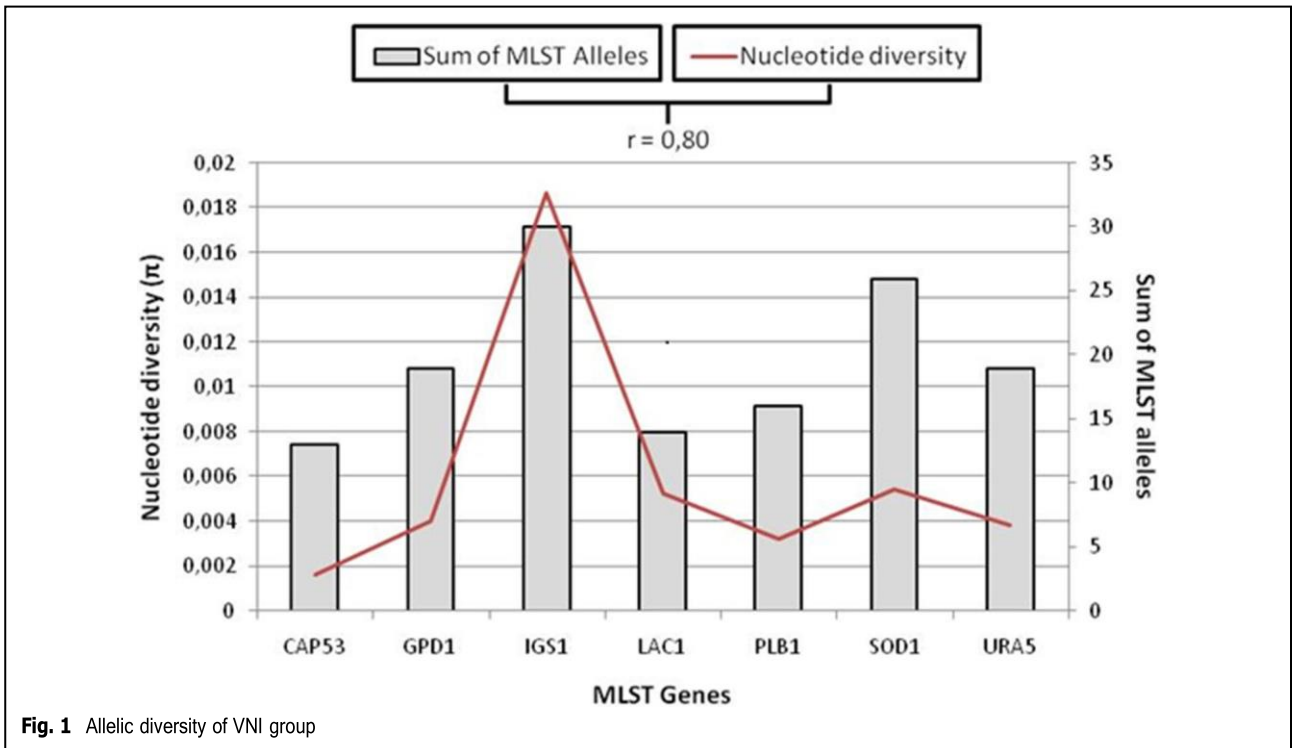
was observed between nucleotide diversity and the number of MLST alleles, as well as the number of haplotypes and the MLST alleles ( $r=0.85$ ). The fact that IGS1 corresponds to an intergenic region, contributes to the high nucleotide diversity observed in this region, characterizing it as a hypervariable marker, as described by Muñoz et al. [16, 17] (Fig. 1).

The analysis performed with the selected sequences for the evolutionary study of the new ST623 showed the ancestral relationship between monophyletic group (yellow) and the others groups studied. It was observed the proximity of ST623 and STs 341, 142, 55, 264, 322, 54 and 84, where these topologies are statistically supported by the high bootstrap values. It was also possible to reconstruct the ancestral relationship of the others monophyletic groups (green) formed by STs 145, 153, 147, 143, 145, 184, 144, 149, 148, 182, 171, 152, 151, 183, 150 and the others STs of the VNI subtype. Our results showed also that ST623 clone, has no evident evolutionary proximity to any other ST of the VNI subtype group, identified in Brazil by Rocha et al. and Ferreira-Paim et al. [11, 18], from clinical and environmental samples, as can be observed in Fig. 2.

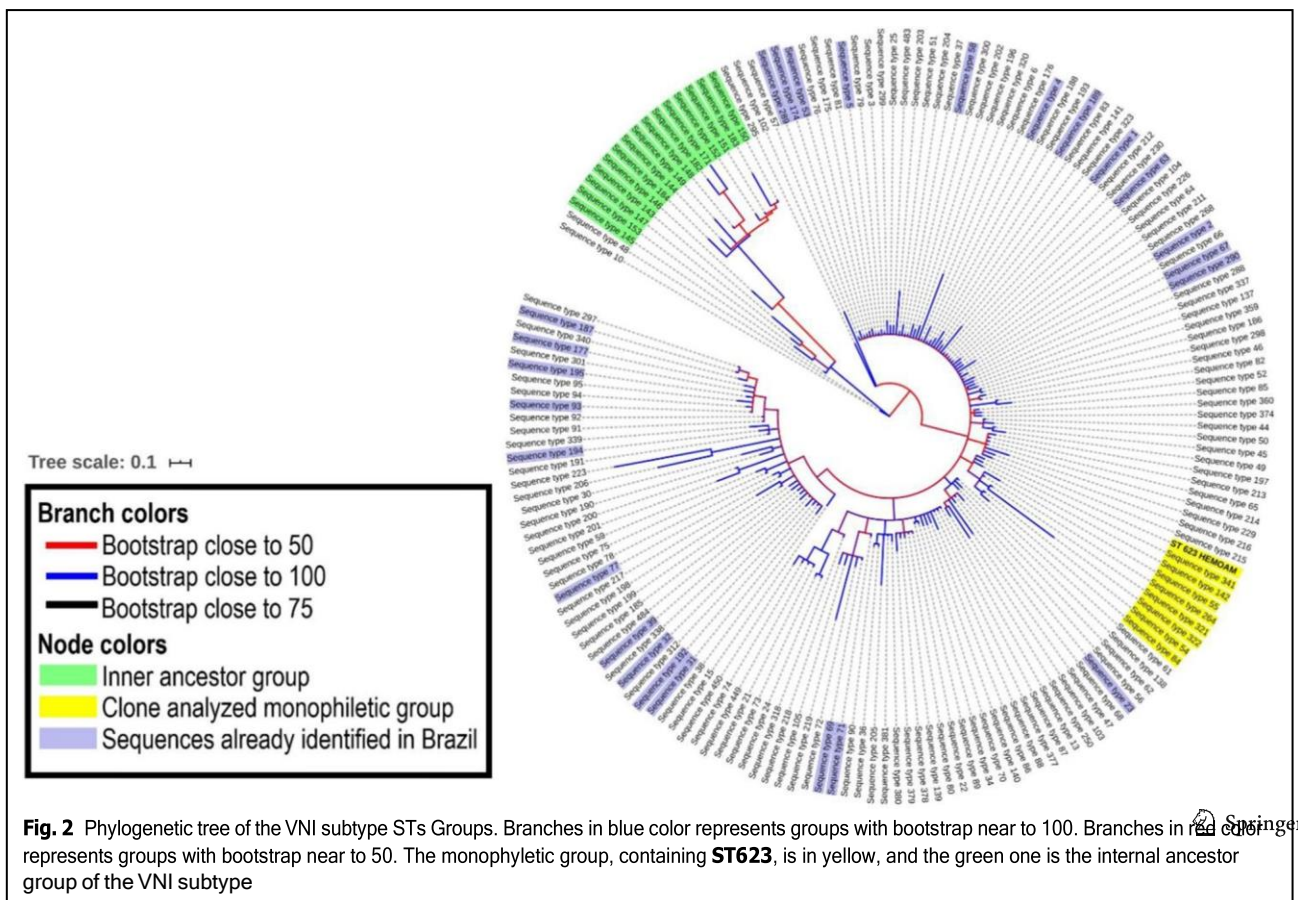
## Conclusions

The new ST623 genotype was isolated from a patient with non-hodgkin's lymphoma, which evolved to death. In the evolutionary

context of phylogenetic analysis, this genotype belongs to VNI subtype; however, the relationships between the STs in this group only can be elucidated after an approach with complete genome sequencing (WGS) studies.



**Fig. 1** Allelic diversity of VNI group



### Authors' contributions

Data Curation: LMS, RAABF, CMF, WAF; Investigation and Methodology: LMS, GMAF, MMM, DAC, MJA, ABJ-M, CMF, WAF; Software, formal analysis: RAABF, WAF; Visualization and Writing-Review & Editing: WAF, CMF, RAABF, MVGL; Original draft preparation: WAF, RAAF, MAS, ABJ-M, CMF; Conceptualization, Funding acquisition, Project Administration, Resources: CMF, WAF. All authors read and approved the final manuscript.

### Funding

The authors are grateful to acknowledge the support provided by the Amazonas State Research Foundation (FAPEAM) and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES).

### Availability of data and materials

All data generated or analysed during this study are included in this published article. Code availability Not applicable.

### Ethics approval and consent to participate

This study was approved by the Foundation Human Research Ethical Committee (CEP/HEMOAM) under CAAE N° 73548017.5.0000.0009, and all methods were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations. Patients and a parent or guardian of any child participant enrolled in the study provided their written informed consent, before specimens were collected and the results and data were used for the management of each respective patient.

### Competing interests

The authors report no competing interest. The authors alone are responsible for the content and the writing of the paper.

### Author details

<sup>1</sup> Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas – HEMOAM, Manaus, AM, Brazil. <sup>2</sup> Universidade do Estado do Amazonas-UEA, Manaus, AM, Brazil. <sup>3</sup> Fundação de Dermatologia Tropical e Venereologia Alfredo da Matta-FUAM, Manaus, Brazil. <sup>4</sup> Universidade Federal do Amazonas-UFAM, Manaus, AM, Brazil. <sup>5</sup> Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus, AM, Brazil. <sup>6</sup> Instituto Leônidas e Maria-Deane, FIOCRUZ, Manaus, AM, Brazil.

Received: 19 February 2020 Accepted: 7 May 2020

Published online: 20 May 2020

### References

1. Rajasingham R, Smith RM, Park BJ, Jarvis JN, Govender NP, Chiller TM, Denning DW, Loyse A, Boulware DR. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. *Lancet Infect Dis*. 2017;17:873–81.
2. Amburgy JW, Miller JH, Ditty BJ, Lune PV, Muhammad S, Fisher WS. *Cryptococcus gattii* in an immunocompetent patient in the Southeastern United States. *Case Rep Infect Dis* 2016; 8280915. <https://doi.org/10.1155/2016/8280915>
3. Meyer W, Castañeda A, Jackson S, Huynh M, Castañeda E. The IberoAmerican Cryptococcal Study Group. Molecular typing of Ibero American *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerg Infect Dis*. 2003;9:189–95.



4. Martins LMS, Wanke B, Lazéra MS, Trilles L, Barbosa GG, Macedo RCL, Cavalcanti MAS, Eulálio KD, Caastro JAF, Silva AS, Nascimento FF, Gouveia VA, Monte SJH. Genotypes of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* as agents of endemic cryptococcosis in Teresina, Piauí (northeastern Brazil). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011;106:725–30.
5. Lin Y-Y, Shiau S, Fang C-T. Risk factors for invasive *Cryptococcus neoformans* diseases: a case-control study. *PLoS ONE*. 2015;10:e 0119090.
6. Moreira LA, Batista SC, Gritti A, Silva JBM, Vido MHC. Meningoencefalite causada por *Cryptococcus neoformans* em pacientes portadores de HIV/ AIDS. *Revista Educação em Foco*. 2017;9:72–81.
7. Canavari IC, Vargas GH, Tinucci-Costa M, Camplesi AC. Criptococose: literature review. *Revista eletrônica de veterinária*. 2017;18:1–5.
8. Ellabib MS, Aboshkiwa MA, Husien WM, D'Amicis R, Cogliati M. Isolation, identification and molecular typing of *Cryptococcus neoformans* from Pigeon droppings and other environmental sources in Tripoli, Libya. *Mycopathologia*. 2016;81:603–8.
9. Leimann BC, Koifman RJ. Cryptococcal meningitis in Rio de Janeiro state, Brazil, 1994–2004. *Cad Saude Publica*. 2008;24:2582–92.
10. Firacative C, Lizarazo J, Illnait-Zaragozí MT, Castañeda E. Latin American Cryptococcal Study Group. The status of Cryptococcosis in Latin America. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2018;113:1–23.
11. Rocha DFS, Cruz KS, Santos CSdS, Menescal LSF, Neto JRdS, Pinheiro SB, Silva LM, Trilles L, Souza JVB. MLST reveals a clonal population structure for *Cryptococcus neoformans* molecular type VNI isolates from clinical sources in Amazonas. Northern-Brazil. *PLoS ONE*. 2018;13:e0197841.
12. Ferreira CM, Andrade DR, Souza VS, Ferreira GMA, Ferreira WA. Effectiveness of modified sabouraud medium in relation to the bacterial growth. *SOJ Microbiol Infect Dis*. 2016;4(2):1–3.
13. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol*. 2018;35:1547–9.
14. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*. 2004;32:1792–7.
15. Letunic I, Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res*. 2019;47:W256–9.
16. Muñoz M, Camargo M, Ramírez JD. Estimating the intra-taxa diversity, population genetic structure, and evolutionary pathways of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Front Genet*. 2018;9:1–16.
17. Meyer W, Aanensen DM, Boekhout T, Cogliati M, Diaz MR, Esposito MC, Fisher M, Gilgado F, Hagen F, Kaocharoen S, Litvintsevas P, Mitchell TG, Simwami SP, Trilles L, Viviani MA, Chung JK. Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Med Mycol*. 2009;47(6):561–70.
18. Ferreira-Paim K, Andrade-Silva L, Fonseca FM, Ferreira TB, Mora DJ, Andrade-Silva J, Khan A, Dao A, Reis EC, Alemida MTG, Maltos A, Junior VR, Trilles L, Rickerts V, Chindamporn A, Sykes JE, Cogliati M, Nielsen K, Boekhout T, Fisher M, Chung JK, Engelthaler K, Lazera M, Meyer W, Vergara MLS. MLST Based population genetic analysis in a global context reveals clonality amongst *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* VNI isolates from HIV patients in Southeastern Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11:29.

### Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.