

## CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS MOLECULARES DE ISOLADOS CLÍNICOS E AMBIENTAIS DE *Cryptococcus* spp. E A CORRELAÇÃO NA RESISTÊNCIA AO FLUCONAZOL

Diego Fernando Silva ROCHA<sup>1</sup>  
João Vicente Braga de SOUZA<sup>2</sup>  
Ana Karla Lima FREIRE<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Bolsista PAIC/FAPEAM; <sup>2</sup>Orientador CSAS/INPA; <sup>3</sup>Co-Orientador CSAS/INPA

### INTRODUÇÃO

A criptococose é uma importante micose sistêmica causada pelas leveduras patogênicas capsuladas *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. Esta micose é adquirida pela inalação de propágulos infectantes presentes nas fontes ambientais e pode acometer tanto aos indivíduos hígidos ou imunocomprometidos dependendo da espécie envolvida. Apresenta distribuição mundial e a sua principal manifestação clínica é a meningoencefalite que pode ser de evolução grave e até fatal (Consenso em criptococose 2008; Freire 2011).

*Cryptococcus neoformans* é considerada uma levedura cosmopolita que pode ser isolada da excreta de diversos tipos de aves, principalmente de pombos (*Columba livia*) presentes nos centros urbanos e também apresenta caráter oportunista devido a sua capacidade de acometer indivíduos imunocomprometidos, enquanto que *C. gattii* é mais restrito a regiões de clima tropical e subtropical e esta espécie pode ser isolada de material vegetal em decomposição de ocos e troncos de árvores e pode acometer tanto a indivíduos imunocompetentes quanto imunocomprometidos (Levitz 1991; Yamamura *et al.* 2013).

Técnicas de genotipagem utilizando PCR-RFLP do gene URA5 e PCR *Fingerprinting* com primer M13 permitiram a classificação destas duas espécies patogênicas em oito grupos moleculares, sendo que *C. neoformans* apresenta os genótipos VNI, VNII, VNIII e VNIV e *C. gattii* os genótipos VGI, VGII, VGIII e VGIV (Meyer *et al.* 1999). Destes oito grupos moleculares, o genótipo VNI é o mais isolado de pacientes com AIDS e é responsável pela maioria dos casos de criptococose em humanos em todo o mundo (Meyer *et al.* 2003). O genótipo VGII é outra variante que tem ganhado destaque, pois tem sido associada a surtos epidêmicos e ambos os grupos já foram identificados no Estado do Amazonas, sendo VNI o mais prevalente e recentemente foi encontrado o grupo molecular VNII nunca antes descrito na região norte do Brasil (Freire 2011).

Há relatos na literatura de que estas espécies têm apresentado resistência aos tratamentos de escolha, principalmente no uso de Fluconazol que é o azólico mais utilizado para o tratamento de diversas infecções fúngicas, sendo também empregado durante a terapia de manutenção nos casos de meningite criptocócica. Esta resistência tem sido atribuída à falência terapêutica e devido ao uso prolongado deste antifúngico, mas os mecanismos celulares e moleculares responsáveis por tal fato não são bem conhecidos e ainda permanecem pouco investigados (Rodero *et al.* 2003; Ngamskulrunroj *et al.* 2012).

É importante avaliar se a resistência ao Fluconazol tem alguma correlação com todos os oito grupos moleculares de *Cryptococcus* ou se está presente em algum grupo molecular especificamente. A realização de estudos de genotipagem e que avaliem o perfil de sensibilidade a antifúngicos tanto de isolados clínicos e ambientais de *Cryptococcus* da nossa região são necessários, pois estes dados são escassos e diante disto o presente estudo teve como objetivo caracterizar os grupos moleculares de isolados ambientais de *Cryptococcus* e avaliar a resistência ao Fluconazol *in vitro* utilizando o Etest.

### MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 13 isolados obtidos de material clínico procedente do Laboratório de Micologia da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) que foram cedidos com registro e aprovação do CEP-FMT/AM, processo n°. 763/2010-FMT-AM, CAAE – 0007.0.114.000-10. Estes isolados já haviam sido submetidos a genotipagem por PCR-RFLP do gene URA5 e PCR *Fingerprinting* utilizando primer M13 que identificaram 6 isolados de *C. neoformans* do genótipo VNI, 6 *C. gattii* do genótipo VGII e apenas 1 isolado não teve o genótipo definido.

Também foram utilizados 10 isolados obtidos de 2 amostras de material vegetal em decomposição de troncos de árvores na Reserva Florestal Adolpho Ducke (RFAD), 9 isolados obtidos de excretas de pombos coletadas no Largo São Sebastião, localizado na zona centro-sul de Manaus e também 13 isolados obtidos a partir de excretas de pombos coletadas em uma praça de alimentação no bairro Cidade Nova, zona norte de Manaus.

Os isolados da RFAD já haviam sido identificados através de testes fenotípicos como sendo de *C.gattii*, os do Largo São Sebastião foram caracterizados como sendo de *C.neoformans* do genótipo VNI utilizando apenas a PCR-RFLP do gene URA5 como ferramenta de genotipagem e os isolados da praça de alimentação da Cidade Nova foram identificados apenas a nível de gênero. Durante este projeto também foram coletadas 23 amostras em pontos da área urbana de Manaus, das quais 14 foram de excretas de aves e 9 amostras de material vegetal em decomposição de ocos e troncos de árvores.

O processamento das amostras ambientais coletadas na área urbana foi realizado no Laboratório de Micologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), onde 1g dessas amostras foram maceradas em gral com pistilo e homogeneizadas em 50 mL de solução salina a 0,85% com tween 80. Após agitação manual por 3 minutos e repouso durante 30 minutos, o sobrenadante foi aspirado e 100 µL foram semeados em placas com meio de sementes de girassol (*Helianthus annuus*) contendo cloranfenicol. Foram utilizadas 5 placas para cada amostra que foram deixadas em temperatura ambiente a 25 °C e observadas diariamente por cinco dias. Para a identificação fenotípica dos isolados, foi realizado o teste de urease em meio de Christensen e a produção da enzima fenol-oxidase observada inicialmente no meio de isolamento primário pela formação de colônias marrons devido à produção de melanina. Para a observação da cápsula polissacarídica foi realizada a microscopia com tinta nankin e para a identificação das espécies foi utilizado o meio CGB (Canavanina-glicina-azul de bromotimol) (Filiú *et al.* 2002).

A extração de DNA foi realizada por fenol:clorofórmio conforme descrito no protocolo de (Ferrer *et al.* 2001) e para a caracterização dos grupos moleculares foi realizada a genotipagem por PCR *Fingerprinting*, na qual foi utilizada a sequência específica do primer M13 e os amplicons gerados foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1.4% (Meyer *et al.* 1999). Também foram utilizadas cepas de referência concedidas pela Coleção de Culturas da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-RJ) que representam os oito genótipos de *Cryptococcus* spp. e que foram incluídas para auxiliar na caracterização molecular.

O Etest foi realizado para avaliar a atividade *in vitro* do antifúngico Fluconazol, sendo utilizado o meio RPMI 1640 (contendo L-glutamina, Sigma USA) acrescido de 2% de glicose e tamponado com MOPS. O valor de CIM (Concentração inibitória mínima) foi lido no ponto de intersecção entre o halo e a fita e a interpretação dos resultados foi realizada conforme descrito no documento M27-A2 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), sendo considerada resistência ao Fluconazol valores de CIM  $\geq 64$  µg/mL.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 23 amostras coletadas na área urbana de Manaus, obteve-se 8,6 % (2/23) de positividade para *Cryptococcus* spp. que correspondem a excretas secas de duas aves passeriformes presentes em gaiolas em uma residência no bairro Santo Antônio na zona oeste de Manaus. Os passeriformes cujas excretas apresentaram isolados de *Cryptococcus* spp. são conhecidos popularmente como “peito roxo” (*Sporophila castaneiventris*) e “bigode ou bigodinho” (*Sporophila lineola*).

As amostras de excretas de ambos os pássaros apresentaram incontáveis UFC's em cada placa semeada. Da amostra obtida do pássaro *S. lineola* foram selecionados 18 colônias e da amostra da ave *S. castaneiventris* foram selecionados 9 colônias para a identificação fenotípica e posterior caracterização molecular. Todos os isolados foram positivos quanto à capacidade de produção de melanina, também apresentaram positividade ao teste de urease, no exame direto com tinta nankin foi possível observar leveduras capsuladas e de formato esférico e através do meio CGB foram caracterizados fenotipicamente como *C. neoformans*.

Um total de 56 isolados ambientais foram caracterizados pela PCR *Fingerprinting* utilizando o primer M13. Foram identificados 46 isolados de *C. neoformans* do genótipo VNI, sendo que todos estes foram obtidos de excretas de aves coletadas na área urbana de Manaus e 10 isolados foram caracterizados como *C. gattii* do genótipo VGII e estes foram obtidos de material vegetal em decomposição de troncos de árvores na RFAD (Tabela 1).

Tabela 1. Grupos moleculares identificados em isolados ambientais.

Origem dos isolados e tipo de amostra coletada	Grupos moleculares identificados		Total de isolados caracterizados
	<i>C. neoformans</i> VNI	<i>C. gattii</i> VGII	
Largo São Sebastião (Excreta de pombos)	9	-	9
Cidade Nova (Excreta de pombos)	13	-	13
Ave <i>S. lineola</i> (Excreta)	9	-	9
Ave <i>S. castaneiventris</i> (Excreta)	15	-	15
Reserva Florestal Adolpho Ducke (Material vegetal em decomposição)	-	10	10
<b>Total por grupo molecular identificado</b>	<b>46</b>	<b>10</b>	<b>56</b>

O Etest foi realizado com um total de 38 isolados, dos quais 13 eram clínicos e 25 ambientais. Entre os isolados clínicos a concentração inibitória mínima (CIM) de Fluconazol variou de (0.25 a >256) e entre os isolados ambientais a CIM variou de (6 a >256). Foi observado que 77% (10/13) dos isolados clínicos e 60% (15/25) dos isolados ambientais, apresentaram resistência ao Fluconazol, totalizando 25 isolados resistentes á este antifúngico. Em relação aos grupos moleculares 80% (20/25) dos isolados resistentes eram de *C. neoformans* VNI e 16% (4/25) eram de *C. gattii* VGII e apenas 1 isolado clínico resistente não teve o genótipo definido (Tabela 2).

Tabela 2. Valores de CIM dos isolados clínicos e ambientais frente ao antifúngico Fluconazol, total de isolados analisados e resistentes por grupo molecular.

Isolados	FL (CIM)	Total de isolados analisados	Total de isolados resistentes ao Fluconazol	VNI	VGII
Clínicos	0.25 a >256	13	10	5	4
Largo São Sebastião	6 a >256	9	3	3	-
Cidade Nova	48 a >256	13	11	11	-
Ave <i>S. castaneiventris</i>	48 a >256	3	1	1	-
<b>Total</b>		<b>38</b>	<b>25</b>	<b>20</b>	<b>4</b>

## CONCLUSÃO

*Cryptococcus neoformans* pode ser facilmente isolado de excreta de aves passeriformes em cativeiro e esses substratos orgânicos representam uma importante fonte de infecção por essas leveduras no ambiente domiciliar. O genótipo VNI também foi o mais prevalente neste estudo e o único identificado a partir de excreta de aves e que também apresentou forte correlação com a resistência ao fluconazol seguido do genótipo VGII. Ambas as espécies patogênicas já apresentam mecanismos de resistência aos antifúngicos ainda no ambiente

## REFERÊNCIAS

- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standards M27-A2, v. 12 (<http://isoforlab.com/phocadownload/csli/M27-A2.pdf>). Acesso em 20/01/14.
- Consenso em Criptococose – 2008. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2008; 41(5): 524-544.
- Ferrer, C; Colom, F; Frasés, S; Mulet, M; Abad, J.L; Alió, J.L. 2001. Detection and identification of fungal pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S ribosomal DNA typing in ocular infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 2873–2879.
- Filiú, W.F.O; Wanke, B; Agüena, S.M; Vilela, V.O; Macedo, R.C.L; Lazéra, M. 2002. Cativeiro de Aves como fonte de *Cryptococcus neoformans* na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 35(6): 591-595.
- Freire, A.K.L. 2011. Caracterização molecular de agentes causadores de Criptococose isolados de pacientes atendidos em uma unidade terciária de saúde do Estado do Amazonas. Dissertação de Mestrado, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Amazonas. 62p.
- Levitz, S.M. 1991. The ecology of *Cryptococcus neoformans* and the epidemiology of cryptococcosis. *Reviews of Infectious Disease*, 13: 1163–1169.
- Meyer, W; Marszewska, K; Amirmostofian, M; Igreja, R.P; Hardtke, C; Methling, K.; *et al.* 1999. Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA - a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. *Electrophoresis*, 20:1790–1799.
- Meyer, W; Castañeda, A; Jackson, S; Huynh, M; Castañeda, E. 2003. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerging Infectious Disease*, 9:189-195.
- Ngamskulrungron, P; Chang, Y; Hansen, B; Bugge, C; Fischer, E; Kwon-chung, K.J. 2012. Characterization of the Chromosome 4 Genes That Affect Fluconazole-Induced Disomy Formation in *Cryptococcus neoformans*. *PLoS ONE*, 7(3): e33022.
- Rodero, L; Mellado, E; Rodriguez, A.C; Salve, A; Guelfand, L; Cahn, P; Estrella, M.C; Davel, G; Tudela, J.L.R. 2003. G484S amino acid substitution in lanosterol 14-alpha demethylase (ERG11) is related to fluconazole resistance in a recurrent *Cryptococcus neoformans* clinical isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(11): 3653-3656.
- Yamamura, A.A.M; Freire, R.L; Yamamura, M.H; Felix, A; Taroda, A. 2013. Estudo dos nichos ecológicos de leveduras patogênicas das espécies *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* na cidade de Londrina, PR. *Semina: ciências agrárias*; 34(2): 793-804.