

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ

MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL

Curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DETECÇÃO DE ANTIGENO CRIPTOCÓCICO NO LIQUIDO
CEFALORRAQUIDIANO POR “LATERAL FLOW ASSAY” EM CASOS SUSPEITOS
DE MENINGITE NO ESTADO DO PIAUI**

CARLOS ALBERTO MENDONÇA FILHO

**Teresina, Brasil
2015**

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ
MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL

Curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical

**DETECÇÃO DE ANTIGENO CRIPTOCÓCICO NO LÍQUIDO
CEFALORRAQUIDIANO POR “LATERAL FLOW ASSAY” EM CASOS SUSPEITOS
DE MENINGITE NO ESTADO DO PIAUÍ**

CARLOS ALBERTO MENDONÇA FILHO

Orientadores: Prof. Dra. Marcia dos Santos Lazera

Co-orientador: Prof. Dr. Maria do Amparo Salmito

Prof. Dr. Bodo Wanke

Dissertação apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Medicina Tropical
para obtenção do grau de Mestre.

Teresina – Brasil
2015

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

M539 Mendonça Filho, Carlos Alberto

Detecção de antígeno criptocócico no líquido cefalorraquidiano por "lateral flow assay" em casos suspeitos de meningite no Estado do Piauí / Carlos Alberto Mendonça Filho. – Teresina, 2015.
xii, 75 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2015.
Bibliografia: f. 64-75

1. CrAg. 2. Imunocromatográfico. 3. Criptococose. 4. *Cryptococcus* spp. I. Título.

CDD 616.82



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de dissertação de mestrado em Medicina Tropical de **Carlos Alberto Mendonça Filho**, sob orientação do Dr. Bodo Wanke e da Dr^a. Márcia dos Santos Lazéra. Ao décimo dia do mês de dezembro de dois mil e quinze, realizou-se às nove horas, no Auditório da FAPEPI, o exame da dissertação de mestrado intitulada: "**Detecção de antígeno criptocócico no líquido céfalo-raquidiano por "lateral flow assay" em casos suspeitos de meningite no estado do Piauí**" no programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração: Diagnóstico, Epidemiologia e Controle, na linha de pesquisa: Diagnóstico de Doenças Infecciosas e Parasitárias A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa - IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr^a. Clarissa Romero Teixeira - FIOCRUZ-PIAUÍ, Dr. Fabrício Pires de Moura do Amaral - UESPI/PI e como suplentes: Dr^a. Liline Maria Soares Martins - UFPI/PI e Dr. Regis Bernardo Brandim Gomes - FIOCRUZ-PIAUÍ. Após arguir o candidato e considerando que o mesmo demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela APROVAÇÃO da defesa da dissertação de mestrado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Mestre em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, a Coordenadora do Programa, Dr^a. Martha Cecília Suarez Mutis, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 10 de dezembro de 2015.

Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa (Presidente da Banca):

Dr^a. Clarissa Romero Teixeira (Membro da Banca):

Dr. Fabrício Pires de Moura do Amaral (Membro da Banca):

Dr^a. Martha Cecília Suarez Mutis (Coordenador do Programa):

DEDICATÓRIA

A Deus que abriu as portas e me permitiu caminhar até aqui superando dificuldades.

A meus pais Carlos e Socorro Mendonça que sempre deram suporte quando necessário.

A meus irmãos Lucas e Keila por seus incentivos e expectativas que estimularam essa caminhada

A minha esposa Poliana e minhas filhas Leticia, Barbara e Beatriz, motivos de meu esforço e desgaste para ser cada vez melhor, por amar cada uma intensamente.

AGRADECIMENTOS

A Profª. Amparo Salmito pelo apoio incondicional (maternal) na execução do trabalho, pela referência de amor à pesquisa científica e exemplo de auxílio aos mais frágeis;

Ao Prof. Filipe Anibal, pelo esforço incontestável no desenvolvimento deste curso e auxílio nesse trabalho;

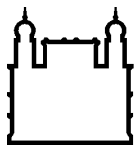
Aos Dr. Bodo Wanke e Drª Marcia Lazera pela ideologia do projeto e pelo cuidado em passar seus conhecimentos sobre micologia e pesquisa;

Ao Dr. Walfrido Salmito pelo incentivo e acompanhamento nas etapas de elaboração deste trabalho;

Aos funcionários do IDTNP que quando possível, favoreceram a realização deste trabalho.

“Raro o indivíduo que sabe o que é o Brasil. Piauí é uma terra. Ceará outra terra Pernambuco outra...”

Artur Neiva e Belisário Penna /1913- A Ciência a caminho da roça, Fundação Oswaldo Cruz. Casa de Oswaldo Cruz, 1991.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

DETECÇÃO DE ANTIGENO CRIPTOCÓCICO NO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO POR “LATERAL FLOW ASSAY” EM CASOS SUSPEITOS DE MENINGITE NO ESTADO DO PIAUÍ

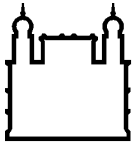
RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL

Carlos Alberto Mendonça Filho

INTRODUÇÃO: A criptococose é uma importante infecção fúngica, que causa um número estimado de 1 milhão de casos e 625 mil mortes por ano, principalmente sob a forma de meningoencefalite em pessoas com imunodeficiência no mundo. O diagnóstico da meningite criptocócica é realizado através de achados das estruturas do fungo em fluidos biológicos em pesquisa direta com tinta da china, cultivo, anatomopatológico, exames de imagem e pesquisa de antígeno criptocócico. Tem sido empregado um teste imunocromatográfico conhecido como CrAg-LFA para detecção do antígeno do polissacarídeo capsular de *Cryptococcus spp.*, em amostras de soro, urina e no líquido, este método tem se tornado um dos testes sorológicos a ser realizado na rotina de investigação micológica para criptococose. **OBJETIVO:** estimar a frequência de detecção de antígeno criptocócico obtido por CrAg-LFA em amostras de líquido cefalorraquidiano de pacientes com suspeita de meningite em um hospital de referência do estado do Piauí. **METODOLOGIA:** os pacientes internados com suspeita de meningite realizaram coleta do líquido para exames de tinta da China e CrAg-LFA. Dados como sexo, idade, procedência e resultados laboratoriais foram inseridos em um banco estruturado, essas informações foram obtidas a partir do livro de registro do laboratório, prontuários dos pacientes e fichas de investigação do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) **RESULTADOS:** Foram analisados os resultados de 140 pacientes atendidos no hospital de referência e que realizaram os exames de tinta da China e CrAg-LFA. Foi observado predomínio de *Cryptococcus spp* em pacientes do sexo masculino 10/19 (52,6%) e a faixa etária mais atingida foi de 22 a 45 anos 10/19 (52,6%). Observamos que em pessoas com infecção pelo HIV, a taxa de detecção de antígeno criptocócico no líquido foi de 6/15 (40%), em pacientes HIV-negativos esta taxa de positividade foi significativamente inferior e atingiu 13/125 (10,4%) ($p = 0,007$). Entre 14 pacientes positivos com Tinta da China, todos foram positivos ao CrAg-LFA, apontando para sensibilidade de 100%. Do total de 140 pacientes do estudo 19 foram positivos sendo 14 positivos para tinta da China e CrAg-LFA, e 5 apresentaram positividade apenas para o CrAg-LFA. **CONCLUSÃO:** na amostra estudada o CrAg-LFA mostrou ser mais sensível que a tinta da China.

Palavras-chave: CrAg, imunocromatográfico, Criptococose, *Cryptococcus spp.*



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

DETECÇÃO DE ANTIGENO CRIPTOCÓCICO NO LIQUIDO CEFALORRAQUIDIANO POR “LATERAL FLOW ASSAY” EM CASOS SUSPEITOS DE MENINGITE NO ESTADO DO PIAUI

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN MEDICINA TROPICAL

Carlos Alberto Mendonça Filho

INTRODUCTION: Cryptococcosis is an important fungal infection causing an estimated 1 million cases and 625 thousand deaths per year, primarily in the form of encephalitis in immunodeficient individuals. Diagnosis of cryptococcal meningitis is performed by detection of fungal structures in biological fluids in detection with India ink staining, culture, pathology, imaging and cryptococcal antigen testing. An immunoassay known as Crag-LFA for the detection of capsular polysaccharide antigens of *Cryptococcus spp.* in has been employed, serum samples, urine and spinal fluid, this method is becoming one of the serological tests to be carried out in routine mycological research for cryptococcosis. **OBJECTIVE:** To estimate the frequency of cryptococcal antigen detection obtained by Crag-LFA in cerebrospinal fluid samples from patients with suspected meningitis in a reference hospital of the state of Piauí. **METHODS:** Patients hospitalized with suspected meningitis held collection of CSF for India ink staining and Crag-LFA testing. Data such as gender, age, origin and laboratory results were entered into a structured database. Information was obtained from the laboratory log book, patient charts and records of investigation of the Information System of Diseases Notification (SINAN) **RESULTS:** A total of 140 patient were analyzed and treated at the hospital and underwent India ink staining and Crag-LFA testing. We observed a prevalence of *Cryptococcus spp.* in male patients 10/19 (52.6%) and the most affected age group was 22 to 45 years old 10/19 (52.6%). We noted that in patients with HIV infection, detection of cryptococcal antigen in the cerebrospinal fluid was 6/15 (40%) in HIV-negative patients this positivity rate was significantly lower and reached 13/125 (10.4%) ($p = 0.007$). Among 14 positive patients with India ink staining, all were positive for Crag-LFA detection, pointing sensitivity of 100%. Of the total of 140 patients in the study 19 and 14 were positive for India ink and Crag-LFA, respectively. Five patients were positive only for Crag-LFA detection. **CONCLUSION:** in the studied sample Crag-LFA proved to be more sensitive than India ink.

Keywords: CrAg, immunochomatographic, cryptococcosis, *Cryptococcus spp.*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - As espécies <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> evoluíram de um ancestral comum, estima-se que subdividiram à aproximadamente 18,5 e 9,5 milhões de anos, respectivamente (Adaptada de LIN & HEITMAN, 2006).	21
Figura 2 - Mapa da distribuição de tipos moleculares e número de casos isolados por estado, nas duas macrorregiões divididas no estudo. (Adaptado de TRILLES et al., 2008)	27
Figura 3 - Mecanismos utilizados pelo <i>Cryptococcus</i> para invasão do SNC. I - Cavalo de Troia- O fungo utiliza o transporte para o cérebro através do macrófago após fagocitose, II – Transocitose ocorre a passagem do fungo do lúmen dos vasos capilares para o parênquima cerebral de forma direta. (Adaptado de CASADEVAL, 2010).....	33
Figura 4 - Imagens da estrutura dos <i>Cryptococcus</i> spp. em exame com tinta da China.....	36
Figura 5 - Determinação das espécies de <i>C. neoformans</i> (A) e <i>C. gattii</i> (B) realizada através do aspecto (coloração) desenvolvido em meio de cultura CGB.	38
Figura 6 - A - Visualização esquemática do ensaio imunocromatográfico para detecção de antígeno criptocócico. B. Imagens de resultados positivo e negativo de CRAG LFA (Adaptado de KOZEL & BAUMAN, 2012)	40
Figura 7 - Roteiro para tratamento* das formas pulmonares de criptococose em HIV negativo. Pacientes com pesquisa de antígeno criptocócico e cultura em LCR negativas. (Adaptado de Consenso, 2008)	44
Figura 8 - Roteiro para tratamento das formas pulmonares de criptococose: HIV positivo ou cultura positiva de espécime respiratório, sem envolvimento do SNC. (Adaptado de Consenso, 2008).....	44
Figura 9 - Tratamento de pacientes HIV positivo e outras formas de imunodepressão com criptococose em sistema nervoso central ou doença disseminada. (Adaptado Consenso, 2008).....	45
Figura 10 - Desenho esquemático para realização do teste de Crag-LFA. (Adaptado de Inlab, 2012)	50
Figura 11 - Perfis bioquímicos e citológicos do LCR em pacientes com resultados de CrAg e diagnosticados com criptococose em comparação com pacientes com meningites de outras etiologias. IDTNP - 2015.	56
Figura 12 - Percentual de criptococose entre os grupos de pacientes infectados e não infectados por HIV. IDTNP, 2015	57
Figura 13 – Comparação entre os resultados obtidos em líquido de pacientes através dos métodos tinta da China e CrAg-LFA.....	60

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1 - Pesquisa de antígeno criptocócico com o CrAg-LFA em comparação com outras metodologias (Adaptado de KOZEL & BAUMAN, 2012)	42
Tabela 2 - Características epidemiológicas dos pacientes atendidos com suspeita de meningite e que cumpriram os critérios de inclusão da pesquisa. .	52
Tabela 3 - Distribuição dos casos de pacientes com criptococose por estado de procedência.	53
Tabela 4 - Distribuição dos pacientes com criptococose por município de origem atendidos no centro de referência no Estado do Piauí.	53
Tabela 5 - Frequência de resultados de antígeno criptocócico em LCR obtidos com o CrAg-LFA e Tinta da China entre pacientes infectados e não infectados por HIV. IDTNP, 2015.	58
Tabela 6 - Distribuição de resultados de antígeno criptocócico em LCR obtidos com o CrAg-LFA e Tinta da China. IDTNP, 2015.....	61
Quadro 1 - Taxas de detecção de antígeno criptocócico em líquido de pacientes com suspeita de meningite por faixa etária, em centro de referência no estado do Piauí. IDTNP, 2015.	54
Quadro 2 - Sensibilidade e Especificidade da detecção de antígeno criptocócico em líquido de pacientes com suspeita de meningite por faixa etária, em centro de referência no estado do Piauí, tomando-se a Tinta da China como padrão-ouro de diagnóstico.	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS – Síndrome da imunodeficiência Humana Adquirida

DNA – Ácido Desoxidoribonucleico

CGB – Canavanina-Glicina-azul de Bromotimol

CRAG – Antígeno Criptocócico

EIA – Imunoensaio Enzimático

IDSA - Infectious Diseases Society of America

HIV – Human Imundeficient Virus

IDTNP – Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela

LCR – Líquido Cefaloraquidiano

LA – Aglutinação de partículas de Látex

LFA – Lateral Flow Assay

SINAN – Sistema Nacional de Agravos de Notificação

SNC – Sistema Nervoso Central

TARV – Terapia AntirRetroViral

Sumário

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	OS FUNGOS	14
1.2	MICOSES SISTEMICAS	15
1.3	HISTORICO	17
1.4	CLASSIFICAÇÃO DO COMPLEXO	19
1.5	CRÍPTOCOCOSE NO MUNDO	22
1.6	CRÍPTOCOCOSE NO BRASIL	25
1.7	CRÍPTOCOCOSE NO PIAUI	27
1.8	NICHO ECOLÓGICO	28
1.10	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	30
1.10.1	INFECÇÃO PULMONAR	31
1.10.2	INFECÇÃO DO SNC	32
1.10.3	INFECÇÃO DISSEMINADA	35
1.11	O DIAGNÓSTICO	35
1.12	PRINCIPAIS MÉTODOS LABORATÓRIAS	35
1.12.1	EXAME DIRETO	35
1.12.2	CULTIVO	37
1.12.3	EXAMES SOROLÓGICOS	38
1.13	COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS DE PESQUISA DE ANTÍGENO	40
1.14	TRATAMENTO DA CRÍPTOCOCOSE	42
1.15	DESECHO DA DOENÇA	46
2	OBJETIVOS	48
2.1	OBJETIVO GERAL	48
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	48
3	METODOLOGIA	49
3.1	FONTE DE DADOS E DESENHO DO ESTUDO	49
3.2	AMOSTRAGEM, CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E DETECÇÃO DE ANTÍGENO CRÍPTOCOCÍCO POR CRAG-LFA	49
3.3	ASPECTOS ÉTICOS	51
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1	CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES INCLUÍDOS NO ESTUDO	52
4.2	TAXA DE DETECÇÃO DE ANTÍGENO CRÍPTOCOCÍCO POR CRAG-LFA EM PACIENTES COM SUSPEITA DE MENINGITE	54
4.3	TAXAS DE DETECÇÃO DE ANTÍGENO CRÍPTOCOCÍCO POR CRAG-LFA EM DIFERENTES PERFIS CITOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS LIQUÓRICOS	55
4.4	TAXAS DE DETECÇÃO DE ANTÍGENO CRÍPTOCOCÍCO OBTIDO POR CRAG-LFA EM PACIENTES HIV POSITIVOS E HIV NEGATIVOS	57
4.5	SENSIBILIDADE E A ESPECIFICIDADE DA DETECÇÃO DE ANTÍGENO CRÍPTOCOCÍCO OBTIDO POR CRAG-LFA, COMPARATIVAMENTE À COLORAÇÃO COM TINTA DA CHINA	58
5	CONCLUSÕES	62
6	PERSPECTIVAS	63
	REFERENCIAS	64
	APENDICE 1	76
	APENDICE 2	77

1 INTRODUÇÃO

A criptococose é uma importante micose sistêmica que ameaça a vida de humanos e animais, manifestando-se, predominantemente, por afecções do trato respiratório e meningoencefalite, colocando-se entre as infecções fúngicas emergentes de significativa morbiletalidade. A doença é causada por duas espécies do gênero *Cryptococcus*: *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* (DEL POETA; CASADEVALL, 2011; SPRINGER; CHATURVEDI, 2010). *Cryptococcus neoformans* tem distribuição mundial e é uma importante causa de morbiletalidade em indivíduos imunocomprometidos pela Aids, seguido por terapia com corticoide, desordens linfoproliferativas e transplante de órgãos. Em contraste, infecções por *C. gattii* prevalecem em regiões de clima tropical e subtropical, afetando predominantemente hospedeiros imunocompetentes. Além disso, *C. gattii* tem emergido em países de clima temperados, como em Vancouver na Columbia Britânica no Canadá e Noroeste dos Estados Unidos, o que demonstra que o fungo pode se adaptar a novos ambientes, causando surtos em humanos e animais (BYRNES *et al.*, 2010; D'SOUZA *et al.*, 2004; KIDD *et al.*, 2004).

No Brasil, a criptococose não é de notificação compulsória, isto tem limitado uma real estimativa sobre sua incidência e prevalência. O *C. neoformans* ocorre em todas as regiões do País; o *C. gattii* comporta-se como patógeno primário, infectando hospedeiros HIV-negativos e sem qualquer evidência de imunodepressão, de ambos os gêneros masculino e feminino. Estudos clinico-epidemiológicos mostram a importância da Criptococose endêmica por *C. gattii* em crianças e adultos jovens no Meio-Norte e Nordeste do Brasil, representando um terço dos casos internados, com letalidade que varia entre 35 a 50% (CAVALCANTI, 1998; CORREA *et al.*, 1999;

DARZÉ *et al.*, 2000; MARTINS *et al.*, 2011; MATOS *et al.*, 2012; NISHIKAWA *et al.*, 2003; SANTOS, 2000; SANTOS *et al.*, 2008).

1.1 OS FUNGOS

Micologia é a ciência que estuda os fungos, seres vivos de origem polifilética, situados entre plantas e animais, com organização celular e DNA limitados por membrana dupla (eucarióticos). Os fungos apresentam uma grande variabilidade de formas, funções e *habitats*, também uma extraordinária plasticidade, são cosmopolitas, heterótrofos (precisam de fontes de alimento, pois não sintetizam o seu próprio), e contam com representantes das mais diversas formas podendo ser macroscópicos, como os cogumelos, e microscópicos, como as leveduras e os fungos filamentosos (BENCHIMOL *et al.*, 2004).

A classificação desses organismos é bastante complexa e por muitas vezes controversa. Há pesquisadores que os classificam num único reino, o Fungi; outros, com base em estudos filogenéticos, consideram que participam de três reinos: Fungi, Stramenopila e Protista ((LACAZ *et al.*, 2002; ALEXOPOULOS & MIMS, 1996).

É interessante salientar que muitas potencialidades metabólicas dos fungos, tais como a produção de amplo espectro de enzimas e antibióticos, sua capacidade biodegradativa e resistência a estresses ambientais podem caracterizar os mesmos fungos como “heróis ou vilões” (MILANEZ, 2003).

A história da micologia no Brasil desenvolveu-se, em grande parte, graças à exploração da micota nativa por pesquisadores estrangeiros (FIDALGO, 1968).

No final do século XVIII, a Europa começou a manifestar interesse crescente pela flora e fauna dos continentes não europeus, com especial ênfase para as Américas. Nessa época, foram financiadas diversas viagens, obtendo-se extraordinária quantidade e variedade de material biológico descrito, catalogado, herborizado e prioritariamente conservado nos acervos dos locais de origem dos naturalistas. Fidalgo (1968) caracterizou a primeira etapa do estudo de fungos no Brasil como a dos “botânicos viajantes”, que incluíam cientistas renomados como Link, Ehrenberg e von Martius, entre outros (FIDALGO, 1968).

No Brasil um dos grandes colaboradores para o crescimento do conhecimento sobre os fungos foi o padre Johannes Rick (1896-1946) que atualmente pode ser considerado o pai da micologia brasileira por haver organizado no Colégio Anchieta, em Porto Alegre (RS), uma coleção com 12 mil a 15 mil exsiccatas de fungos, iniciando a publicação da sistemática das espécies em português (FIDALGO, 1968, LACAZ *et al.*, 2002).

Considera-se que a partir dessa etapa iniciou-se a preocupação de preservar os espécimes brasileiros no próprio país para fins de documentação da diversidade biológica e expansão dos conhecimentos (BENCHIMOL *et al.*, 2004).

1.2 MICOSES SISTÊMICAS

As micoses são geralmente subdivididas em – superficiais, cutâneas, subcutâneas e sistêmicas e/ou oportunistas. A instalação das micoses sistêmicas inicia-se na maior parte dos casos através da inalação de propágulos fungicos, portanto primariamente ocorre a lesão pulmonar com regressão espontânea em alguns casos.

A criptococose é uma das micoses sistêmicas de grande importância clínica pois estima-se que apenas 10% dos casos são detectados e tratados ainda na fase pulmonar, enquanto que a maioria dos casos, cerca de 90%, são diagnosticados após a disseminação para o sistema nervoso central (SNC), quando provocam meningite criptocócica, o que dificulta o tratamento e favorece o surgimento de sequelas e óbitos.

Em estudo realizado no Oregon, que avaliou as características clínicas das infecções causadas por *Cryptococcus gattii* (*C.gattii*), ocorridas no período de 2004 a 2010, foi observado que o sítio de infecção mais frequente foram os pulmões com 21 casos (46%) seguido por infecções no SNC com 12 (26%), e também pulmões e SNC em 9 (20%). Neste mesmo estudo relata que criptococomas focais foram comuns e vistos em 4 dos 21 pacientes com infecção do SNC, e em 16 dos 30 pacientes com infecção pulmonar. Trinta e quatro (74%) pacientes apresentavam condições clínicas crônicas, 24 (52%) tinham alguma imunossupressão, e 12 (26%) eram saudáveis antes da infecção. A doença pulmonar ocorreu em pacientes com diversas condições, e indivíduos saudáveis foram mais acometidos pela doença no SNC (FITZGIBBONS *et al.*, 2011).

Uma grande exposição aos propágulos fúngicos pode levar à inalação de carga expressiva, portanto com maior capacidade de causar doença. (MITCHEL & PERFECT, 1995; FILIU *et al.*, 2002) A pesquisa dos agentes da criptococose em amostras de ar mostra-se de grande importância para detecção das possíveis fontes de contaminação. A exposição aérea de placas de Petri, contendo meios de cultura, foi em vários estudos, utilizada como metodologia para avaliar a presença de *Cryptococcus spp.* no ar atmosférico de cidades brasileiras (PEDROSO *et al.*, 2009; SOARES *et al.*, 2005).

1.3 HISTORICO

O termo *Cryptococcus* foi criado por Kutzing em 1833 tendo origem da palavra grega Kryptos que significa escondido, obscuro (HEITMAN *et al.*, 2011).

A primeira descrição da criptococose pode ter sido registrada em 1861 por Zenker no entanto o caso não foi reconhecido pois não houve evidencias de isolamento e cultura do microrganismo, portanto o primeiro registro de criptococose está descrita na Alemanha por Otto Busse e Abraham Buschke em 1884.

O patologista Otto Busse observou em 1884, a presença de corpúsculos ovais em amostras da lesão de sarcoma em tibia de uma paciente com 31 anos, o isolamento da cultura dessa lesão foi realizado e a patogenicidade foi registrada após a re-inoculação do isolado na pele de outro paciente que acabou indo a óbito devido a disseminação da infecção. O físico Abraham Buschke acompanhava o paciente e realizou cultivo do patógeno da erupção cutânea e mencionou que o agente etiológico se tratava de um coccídeo. Busse denominou o fungo de *Saccharomyces* e a doença de *sacchromycopsis hominis*. Ainda em 1884, Francesco Sanfelice isolou na Itália uma levedura encapsulada a partir do suco de pêssego e o chamou de *Saccharomyces neoformans*, em 1885 Sanfelice relatou semelhança entre o fungo encontrado por Busse e o *Saccharomyces neoformans* registrado por ele.

No ano de 1885, o patologista Ferdinand Curtis descreveu na França uma levedura considerada por ele como “parasita vegetal” isolado de um tumor crural de um homem jovem e o denominou o fungo como *Saccharomyces subcutaneous tumefaciens*, pois não encontrou relação entre o seu achado e os de Busse e Sanfelice (HEITMAN *et al.*, 2011).

Em 1901, Vuillemin renomeou os fungos isolados por Busse e Sanfelice como *Cryptococcus*, sendo o encontrado em infecção humana por Busse da espécie *Cryptococcus hominis* e o registrado por Sanfelice em suco de pêsego da espécie *Cryptococcus neoformans*, está renomeação se deu, pois, os fungos registrados por Busse e Sanfelice não eram capazes de formar ascósporos, nem fermentar fontes de carbono, o que é característico do gênero *Saccharomyces*. Em 1902, Frothingham comprovou a patogenicidade da levedura também em animais através do registro da lesão pulmonar em um cavalo em Massachusetts, onde o fungo apresentava semelhança aos isolados por Busse e Buschke.

A meningite provocada por *Cryptococcus* foi relatada por Verse em 1914 em uma mulher. No ano de 1916 Stoddard e Cutler também relataram outros casos e nomearam de *Torula histolytica*.

Em 1935, Benham realizou estudo utilizando várias leveduras isoladas de humanos incluindo os isolados de Busse e utilizando de observações sobre as características desses fungos concluiu que todos os isolados humanos eram de apenas uma espécie, *Cryptococcus hominis* e pertenciam a duas variedades, sendo uma delas referente ao achado de Curtis (1885) então foi desconsiderado o nome originalmente usado por Curtis e renomeado como *Cryptococcus hominis* (*C.hominis* var *tumefaciens*). Ainda Benham em 1950 propôs a substituição dos termos *Torulosi* e *Torula meningite* pelo termo *Criptococose* e o agente causador da doença fosse mantido como *Cryptococcus neoformans* (HEITMAN *et al.*, 2011).

Em 1970, Gatti e Eeckels no Zaire, isolaram de uma criança com meningoencefalite uma cepa de *C. neoformans*. O isolado foi descrito, ainda em 1970 por Vanbreuseghem e Takashio, como uma cepa que na cultura assemelhava-se ao

C. neoformans mas produzia células alongadas “in vivo” e, portanto, reconhecido como uma nova variedade e denominada *C. neoformans* var *gattii*. Kwon-Chung *et al.* 1978 determinaram que as cepas *C. neoformans* var *neoformans* e *C. neoformans* var. *gattii* apresentavam diferenças consideráveis em suas características morfo-bioquímicas e sorológicas e que a cepa isolada no Zaire era na verdade uma cepa teleomorfa de *Filobasidiella bacillispora*, portanto foram considerados sinônimos após essa pesquisa. Em 2002 o nome *C. bacillisporus* foi renomeado como *C.gattii* pois era um termo mais utilizado mundialmente (SIDRIM; MOREIRA, 1999).

No Brasil, o primeiro relato de caso humano de criptococose foi registrado por Almeida e Lacaz na cidade de Rio Preto no estado de São Paulo no ano de 1941, seguida por um novo registro de caso também no estado de São Paulo em 1944 (REIS-FILHO *et al.*, 1985; PAPPALARDO & MELHEM, 2003).

1.4 CLASSIFICAÇÃO DO COMPLEXO

Desde os primeiros isolamentos de *Cryptococcus*, sua taxonomia vem sofrendo revisão. Com base em diferenças genéticas o sorotipo A de *Cryptococcus neoformans* foi considerado como variedade distinta (*Cryptococcus neoformans* var *grubii*) do sorotipo D (FRANZOT; SALKIN; CASADEVAL, 1999).

Os agentes da criptococose *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* correspondem à forma assexuada de basidiomicetos zoopatógenos. Apresentam-se como leveduras globosas ou ovaladas, com 3 a 8 µm de diâmetro, com brotamento único ou múltiplo, de colo estreito, e envolvidas por característica cápsula mucopolissacáride. Em laboratório apresenta-se como colônia de cor branca a creme, brilhante, de textura mucóide, margem lisa e inteira, após três dias à temperatura de

25 a 37°C, em cultivo nos meios como Agar Sabouraud glicose 2% e Agar extrato de malte e levedura. O componente capsular predominante é glucuronoxilomana, determinante dos sorotipos A, B, C, D e AD. A capacidade de produção de melanina com formação de colônias marrons em meios com extrato de sementes de *niger* é característica de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, não ocorrendo em outras espécies do gênero *Cryptococcus*, nem outras leveduras de interesse médico, com raras exceções (WANKE, LAZERA, SALMITO *et al.*, 2008).

Atualmente, *Cryptococcus spp.* são classificados em cinco sorotipos capsulares e nove genótipos moleculares. A classificação do sorotipo é baseada nas reações de aglutinação dos antígenos dos polissacarídeos capsulares. As cepas com sorotipos A e D e o híbrido AD pertencem a *C. neoformans*, enquanto as cepas com sorotipos B e C são classificadas como *C. gattii*. As cepas do sorotipo A foram nomeadas *C. neoformans var. grubii*, e as cepas do sorotipo D foram nomeadas *C. neoformans var. neoformans*. Essa classificação baseou-se nas diferenças das estruturas capsulares e de DNA, assim como na comparação completa do sequenciamento genômico entre esses dois sorotipos (variedades) (FRANZOT *et al.*, 1999). (Figura – 1)

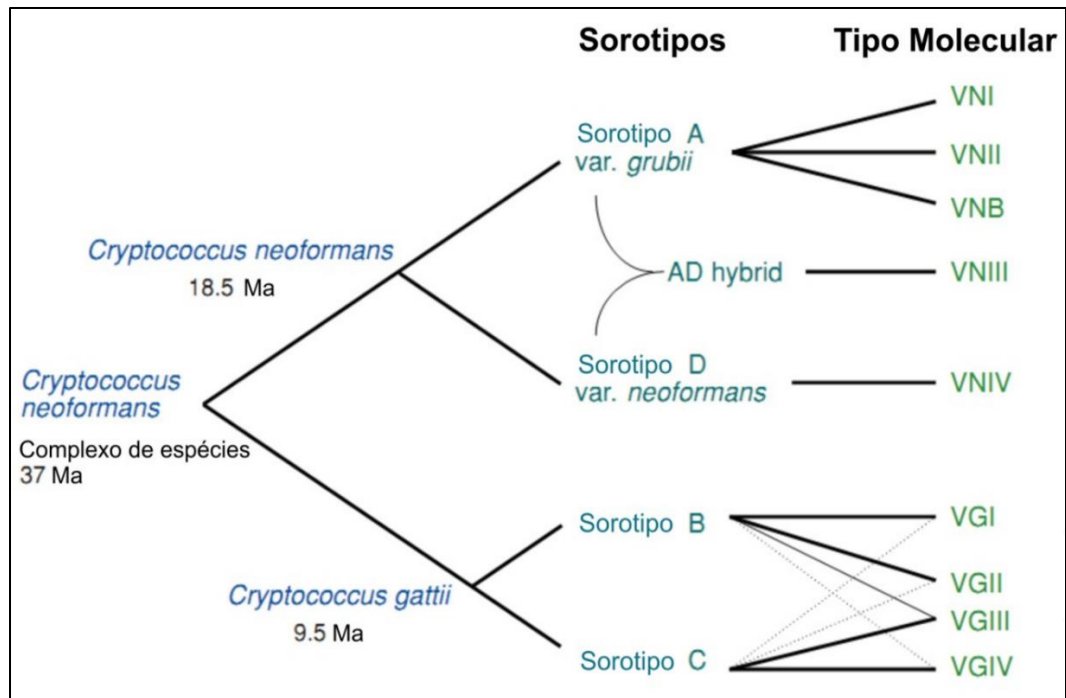


Figura 1 - As espécies *C. neoformans* e *C. gattii* evoluíram de um ancestral comum, estima-se que subdividiram à aproximadamente 18,5 e 9,5 milhões de anos, respectivamente (Adaptada de LIN & HEITMAN, 2006).

Esta designação tem sido progressivamente utilizada por diversos autores. Em recente revisão filogenética, diferentes genes (URA5, CNLAC1, CAP59, CAP64, IGS e ITS rRNA, mtLrRNA) de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* e de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* foram analisados (KATSU *et al.*, 2004). Independente do marcador utilizado, a variedade *gattii* constituiu grupo monofilético distinto e divergente da variedade *neoformans*. De fato, são reconhecidas pelo menos duas espécies do complexo *Cryptococcus neoformans*: *Cryptococcus gattii* (*Cryptococcus neoformans* var. *gattii*) e *Cryptococcus neoformans* (*Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*) (KWON-CHUNG & BENNETT, 1984).

1.5 CRIPTOCOCOSE NO MUNDO

A criptococose apresenta basicamente dois quadros clínicos epidemiológicos distintos e predominantemente reconhecidos: 1 - criptococose por *Cryptococcus neoformans* (*C.neoformans*), infecção oportunista, cosmopolita, associada a condições de imunodepressão celular, como a Aids; 2 - criptococose por *Cryptococcus gattii* (*C.gattii*), endêmica em áreas tropicais e subtropicais, que atinge principalmente indivíduos imunocompetentes, similar a outras micoses sistêmicas. No entanto, ocorrem outras formas clínicas com variação de etiologia, como por exemplo, infecção fatal por *C.neoformans* em imunocompetente ou infecção por *C.gattii* em Aids (KWON-CHUNG & BENNETT, 1992; LAZERA *et al.*, 2005).

Antes da epidemia de HIV, a infecção criptocócica era uma infecção sistêmica incomum que ocorria em pacientes com outras causas de imunodepressão, geralmente associada ao uso de corticoides, diabetes melito, doença de Hodgkin, lúpus eritematoso sistêmico ou a outro tratamento imunossupressor (KWON-CHUNG & BENNETT, 1992; MITCHEL & PERFECT, 1995).

Entretanto, durante as últimas duas décadas, a incidência da criptococose aumentou significativamente. A infecção por HIV esteve associada a mais de 80% de casos de criptococose em todo o mundo (HAJJEH *et al.*, 1999).

A criptococose pode disseminar-se para outros sistemas além de acometer o sistema nervoso e respiratório. Lesões cutâneas de caráter diverso acometem principalmente a face sendo representada por macula avermelhada, pápulas, pústulas, nódulos ou úlceras. Pacientes com infecção pelo HIV são geralmente acometidos na região da face, orelha, pescoço, mãos e pés. Em indivíduos que fazem

uso de corticosteróides é observado celulite com eritema e endurecimento (TRILLES, 2000).

A meningite criptococcica é a maior causa de meningite subaguda e morte em pacientes com infecção HIV avançada, afetando um número significativo de pessoas ao ano especialmente na África Sub-Saariana (PARK *et al.*, 2009; JARVIS *et al.*, 2010).

O *C.neoformans* variedade *grubii* era e continua sendo a maior responsável (até 99%) pela criptococose em indivíduos infectados pelo HIV, em todo o mundo com exceção da África (MITCHELL & PERFECT, 1995; PAPPALARDO & MELHEM, 2003).

Segundo o Grupo Colombiano de Estudo em Criptococose, até 2004 dos 811 sobreviventes com 684 isolados recuperados, maioria das cepas de pacientes com Aids na Colômbia são do sorotipo A (95,5%) e do sorotipo D (0,3%), entre os *C.gattii* sorotipo B (3,6%) e sorotipo C (0,6%) estavam presentes em pacientes imunocompetentes. Na Colômbia é crescente o número de casos de criptococose reportados em pacientes infectados pelo HIV (ESCANDON *et al.*, 2006).

O *C.neoformans* ganhou maior visibilidade com o advento da Aids, *C.gattii* manteve-se um agente de doença, quase que exclusivo, de pessoas sem imunossupressão aparente. Por isso, até hoje, os inúmeros casos de criptococose por *C.neoformans* em Aids têm incidência crescente, enquanto a taxa de infecções por *C.gattii* tem-se mantido, relativamente, estável nos últimos anos (GILLECE *et al.*, 2011).

Segundo os achados de Kwon-Chung (1984) as infecções causadas por *C.gattii* eram descritas, apenas, em indivíduos que residiam perto de florestas tropicais ou viviam em países de climas tropical ou subtropical. Desde os anos 90 novas pesquisas surgem e relatam novos dados sobre a epidemiologia das infecções por

C.gattii. Em regiões endêmicas, como Austrália e Nova Guiné, houve a comprovação de que *C.gattii*, ao contrário de *C.neoformans*, infectava, preferencialmente, pessoas imunocompetentes (ELLIS *et al.*, 1990).

A importância da infecção por *C.gattii* ficou, assim, em segundo plano, por muitos anos, até o surgimento de um surto, na ilha de Vancouver, Canadá, que foi responsável por mais de 200 casos de criptococose em indivíduos, aparentemente, saudáveis além de casos veterinários (CDC, 2010).

No continente asiático infecções por *C. gattii* foram relatados no Vietnã, Camboja, Tailândia, Coreia, Japão, Índia, Malásia, China e Nepal. No Vietnã, um estudo mostrou que 30% dos pacientes com meningite criptocócica e não-infectados pelo HIV estavam infectados com *C.gattii* do tipo molecular VGI (GILLECE *et al.*, 2011).

A presença de *C.gattii* como agente infectante não é incomum, particularmente, nos países situados nos trópicos e subtropicais. Na Venezuela, um estudo mostrou que *C.gattii* representa entre 4% a 9,1% dos isolados clínicos (PEREZ, 2008).

Na América do Sul, um grande e pioneiro estudo ibero-americano mostrou que os quatro tipos moleculares de *C.gattii* ocorrem na América-Latina, com predomínio do sorotipo VGII (MEYER *et al.*, 2003).

Houve, a descrição de vários casos humanos na costa oeste dos Estados Unidos e no estado de Oregon, que resultaram em 19 mortes, além de relatos de infecção sintomática em centenas de animais. Foi demonstrado que um subtipo molecular de VGII, mais virulento que os demais, foi à causa do surto canadense-norte americano (CDC, 2010).

A distribuição de *C. gattii* permaneceu, por muito tempo, limitada a áreas geográficas onde as temperaturas não eram muito baixas no inverno (KWON-CHUNG & POLACHEC, 1982).

Esses dados ressaltam a importância clínica dessa espécie, que até duas décadas atrás era deixada em segundo plano e também fortalece a relevância da tipagem molecular dos agentes da criptococose.

1.6 CRIPTOCOCOSE NO BRASIL

Assim como ocorrido em todo o mundo a criptococose teve atenção maior após o surgimento da Aids em grandes proporções a partir da década de 80 quando foram registrados mais de 215.000 pacientes com Aids no Brasil entre 1980 e 2002, 6% foram diagnosticados com criptococose (NUCCI *et al.*, 2010).

No Brasil a criptococose causada por *C. neoformans* ocorre em todas as regiões e causa micose sistêmica em pacientes com Aids sendo a terceira principal causa de infecção do sistema nervoso central nesses pacientes (JUNIOR *et al.*, 2006).

Várias pesquisas relatam que nos estados do Rio de Janeiro e São Paulo a maioria dos pacientes apresenta infecções por *C. neoformans* (CALVO *et al.* 2001; TÁVORA *et al.*, 2003; ROZENBAUM *et al.*, 1992; MARTINS *et al.*, 2003; NISHIKAWA *et al.*, 2003). Isso pode ser explicado porque nas grandes zonas urbanas do Sul e Sudeste do país, vive mais de 70% da população com Aids que tem como agente da criptococose a espécie *C. neoformans* (BRITO *et al.*, 2001).

O *C. gattii* é predominantemente patógeno primário, acometendo principalmente indivíduos imunocompetentes, incluindo crianças e jovens adultos no Norte e Nordeste, esses casos são considerados endêmicos nos estados do

Amazonas, Para, Roraima Piauí, Pernambuco e Bahia. (TRILLES *et al.*, 2008) Nas regiões Sul e Sudeste são observadas infecções esporádicas por *C.gattii* (SEVERO *et al.*, 2009; MORA *et al.*, 2010; PINTO *et al.*, 2010).

Estudos clínico-epidemiológicos realizados no Brasil mostram a importância da criptococose por *C.gattii* do sistema nervoso central (SNC) em adultos jovens de ambos os sexos e crianças nas regiões N e NE, com letalidade que varia entre 35% a 50% (CORREA, 1999).

A criptococose causada por *C.neoformans* ocorre em todas as regiões. *C.gattii* causa criptococose endêmica em hospedeiros imunocompetentes principalmente nas regiões norte e nordeste do Brasil (TRILLES *et al.*, 2008; LAZERA *et al.*, 2000).

LINDEMBERG (2008) em análise retrospectiva dos casos ocorridos em Mato Grosso do Sul de 1995 a 2005 observou que de 123 casos, cento e quatro (84,9%) casos tinham associação com HIV, seis (4,9%) tinham outra condição predisponente e 13 (10,6%) eram imunocompetentes. Houve predomínio de pacientes do sexo masculino (68,3%) e a idade variou de 19 a 69 anos (média de 35,9 anos). Também observou que o envolvimento do sistema nervoso central ocorreu em 103 (83,7%) pacientes e os sintomas mais frequentes foram cefaleia e vômitos. Em 77 casos foi possível identificar a espécie do agente, sendo 69 (89,6%) *C.neoformans* e oito (10,4%) *C.gattii*.

No Brasil, estudos revelam que o sorotipo A é o mais prevalente, seguido dos sorotipos B, D e AD. TRILLES *et al.* (2008) em seu trabalho de revisão mostram os trabalhos realizados no Brasil sendo os principais tipos moleculares relatados, a criptococose causada por *C.neoformans* demonstra ampla distribuição de tipos moleculares, sendo que apenas VN IV não foi descrito em casos clínicos. Para *C.gattii*,

todos os tipos moleculares foram relatados, com menor identificação do tipo molecular VG I (NISHIKAWA, 2003). (Figura – 2)

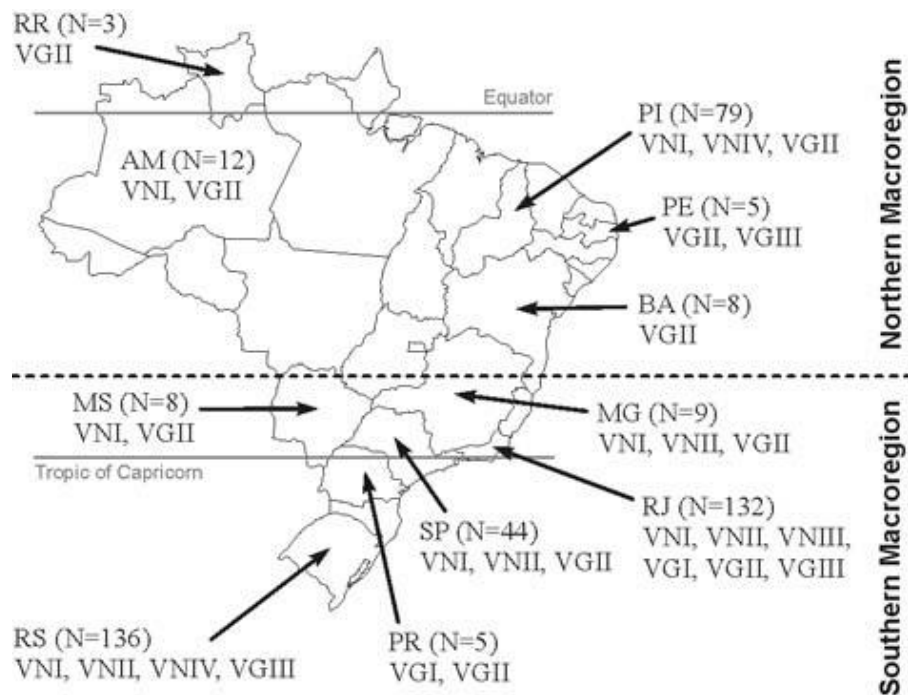


Figura 2 - Mapa da distribuição de tipos moleculares e número de casos isolados por estado, nas duas macrorregiões divididas no estudo. (Adaptado de TRILLES *et al.*, 2008)

1.7 CRIPTOCOCOSE NO PIAUI

No Piauí, estudos anteriores observaram que a criptococose causada por *C.gattii* é fortemente associada a pacientes HIV negativos, e acontecem significativamente em crianças e jovens adultos (CAVALCANTI M.A.S., 1995; MARTINS LMS, 2003).

Estudo realizado por MARTINS (2011), identificou a meningite criptocócica causada por *C. gattii* VGII ocorrendo em seis crianças aparentemente saudáveis (abaixo de 12 anos de idade) e em sete adolescentes e jovens adultos com idades de 13 a 19 anos; todos os pacientes HIV negativos, 38,4%(5/13) dos pacientes morreram.

Em outra análise foi observado o *C.neoformans* VNI em pacientes HIV positivos e com *C.gattii* VGII em pacientes HIV negativos (21/26, 80,8%). Somente 3/37 (8,1%) dos pacientes HIV positivos foram causados por *C.gattii* VGII, entre esses 5/21 (23,8%) dos pacientes HIV negativos foram causados por *C.neoformans* VNI (MARTINS *et al.*, 2011).

1.8 NICHOS ECOLÓGICOS

Os patógenos *C.neoformans* e *C.gattii* são fungos ubíquos e isolados de origem clínica já foram relatados em todo o mundo. O nicho ecológico original é relacionado a madeira em decomposição, mas diferentes substratos orgânicos são encontrados positivos e vinculados a habitats naturais. Excretas secas de diversas aves como pombos, periquitos, incluindo aves de cativeiro constituem fontes ambientais importantes, sendo que os pombos se comportam como carreadores do fungo, contaminando o solo, diferentes substratos e até mesmo poeira doméstica. Também pode ser encontrado em ocos de árvores de diferentes espécies (LAZERA, 1989).

A variedade *neoformans* tem distribuição cosmopolita e está relacionada a fontes ambientais como solos contaminados naturalmente com excretas de aves, principalmente pombos (REOLON *et al.*, 2004).

Recentemente tem sido observada a presença de *C.neoformans* em ocos de diferentes árvores como *Cassia grandis*, *Senna multijuga* e *Ficus microcarpa*, independente de sua variedade, indicando novas fontes naturais desse fungo. Dessa forma, pode não haver uma relação definida entre o fungo e um tipo específico de habitat (LÁZERA *et al.*, 1998).

Encontrado na poeira domiciliar (cerca de 15% em casas no Rio de Janeiro) e também em gaiolas de pássaros domésticos, mostra-se ubíquo e de fácil inalação através de formas dessecadas das leveduras presentes no meio e possivelmente de basidiósporos, fruto da reprodução sexuada. Estudo no Rio de Janeiro mostrou risco aumentado de adquirir criptococose para moradores com Aids em casas positivas, quando comparado ao de pacientes com Aids moradores de casa onde a poeira foi negativa (PASSONI *et al.*, 1998). Este sorotipo (A) é encontrado em ambientes rurais e também já foi encontrado em cacaueteiro e árvore nativa de mata amazônica, indicando habitats naturais em áreas preservadas ou com pouca intervenção humana (PASSONI *et al.*, 1998).

Em estudo realizado na Colômbia, foram isolados *Cryptococcus neoformans* em 92 (3,2%) das 2816 amostras de detritos de árvores e fezes de aves coletadas em regiões de Cali, Cauotá, Candinamarca e Medellín. Trinta e cinco isolados do *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A), foram recuperados de fezes de pássaros e detritos de árvores de *Eucaliptus* spp., *Laurus* spp. e *Pinus* spp.; 57 isolados de *Cryptococcus gattii* (sorotipo B) foram recuperados de detritos de *Eucaliptus* spp. e *Laurus* spp. (ESCANDON *et al.*, 2006).

O *C. neoformans* var. *gattii* supostamente teria alcançado várias partes do mundo através de sementes do *Eucaliptus camaldulensis* oriundos da Austrália, os quais continham micélios dicarióticos. Nesse país, o *C. neoformans* var. *gattii* foi isolado a partir de folhas, sementes, flores e cascas de eucalipto (*Eucaliptus camaldulensis*). O principal propágulo responsável pela infecção corresponde aos basidiósporos encontrados nas flores dessa árvore que funcionaria como hospedeiro para o fungo em uma associação biotrófica (MELO *et al.*, 1993)

1.10 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

As apresentações clínicas relacionam-se diretamente ao estado imunológico do hospedeiro, variando desde manifestações localizadas autolimitadas até doença disseminada com falência respiratória (SORRELL, 2001).

O ar atmosférico torna-se, via de regra, o meio de dispersão mais utilizado e mais bem-sucedido dessa micose, possivelmente com o transporte de leveduras dessecadas e basidiósporos que por seu tamanho (inferior a 3 μm) encontram facilidade de deposição nos alvéolos pulmonares e posterior disseminação para o SNC (PERFECT; CASADEVALL, 2002; SORREL; ELLIS, 1997).

Conforme descrito em estudos presentes é evidente a ocorrência de diagnóstico tardio dos casos, pois estima-se cerca de 90% dos diagnósticos em países em desenvolvimento e subdesenvolvidos ocorrem de forma tardia e apenas quando a infecção já apresenta comprometimento do SNC.

As enzimas produzidas pelo fungo, a sua termotolerância (crescimento a 37°C) e especialmente sua parede celular são consideradas fatores de virulência da levedura que contribuem para o desenvolvimento da doença e do fungo no organismo infectado. Entre os fatores de virulência um dos mais relevantes é a cápsula do fungo, pois inibe a fagocitose, impede ligação de imunoglobulina G (IgG), bloqueia fixação de C3 e da via clássica do complemento suprimindo a proliferação das moléculas de adesão impedindo a resposta do hospedeiro à infecção (MORETTI *et al.*, 2008; SÁNCHEZ; ESCANDÓN; CASTAÑEDA, 2008).

1.10.1 INFECÇÃO PULMONAR

A hipótese teoricamente mais plausível da infecção inicial causada por *Cryptococcus* é pelo diâmetro reduzido (1,2-1,8 µm) dos propágulos fúngicos (basidiósporos) que facilmente são transportados pelo ar e após inalação tem deposição alveolar e, na temperatura de 37°C, encontram um sitio de desenvolvimento perfeito, então transformam-se em leveduras capsuladas e tem assim início a infecção pulmonar (COHEN; PERFECT; DURACK, 1982; ZIMMER; HEMPEL; GOODMAN; 1984).

Em alguns casos, a inalação do *Cryptococcus* produz uma infecção pulmonar assintomática e autolimitada, a depender da resposta imune do hospedeiro, do tamanho do inóculo e virulência do microrganismo pode estabelecer focos residuais com elementos fúngicos viáveis que podem reativar após anos. Algumas vezes, apresenta semelhança a tuberculose, com lesões nodulares sem calcificação e eventual cavitação. Outras apresentações incluem massa localizada semelhante a neoplasia e, às vezes, manifesta-se como pneumonia que pode evoluir para insuficiência respiratória aguda. A forma pulmonar é a segunda mais frequente e acomete 35,7% dos pacientes HIV negativos (JONGWUTWES *et al.*, 2008; MORETTI *et al.*, 2008).

Mitchell *et al.* (1992), descreve casos de consolidação do lobo superior com apresentação típica de síndrome de Pancoast. A criptococose pulmonar causada por *C. gattii* pode clínica e radiologicamente simular câncer de pulmão (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

A defesa do hospedeiro contra leveduras de *Cryptococcus* requer resposta imune celular. A evolução da infecção é determinada por respostas de vários tipos de células e citocinas com envolvimento de Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF α), Interleucina 12 (IL-12), Interleucina 18 (IL-18) e Interferon gama (IFN- γ). As células T, Natural Killer (NK) e macrófagos são os tipos mais predominantes que montam resposta inflamatória associada à proteção contra a infecção por *Cryptococcus*. Células T CD4⁺ e CD8⁺ desempenham papel fundamental na erradicação da infecção (MARR *et al.*, 2006; SALKOWSKI; BALISH, 1991; YAUCH *et al.*, 2004).

A disseminação pulmonar a outros órgãos pode potencialmente ocorrer como resultado de uma infecção primária ou secundária. No estágio de disseminação da localização pulmonar, o cérebro torna-se o órgão com maior propensão a ser o sítio alvo da doença clínica. Por isso, a maioria dos dados é de manifestações da doença no pulmão ou no sistema nervoso central (SNC) (COHEN, 1982).

1.10.2 INFECÇÃO DO SNC

Uma vez no pulmão, *C. neoformans* ou *C. gattii* atravessam a barreira hematoencefálica (BHE) e atingem o sistema nervoso central (SNC), ocasionando meningoencefalite e criptococomas cerebrais, sendo consideradas as formas mais graves da doença.

Existem vários mecanismos propostos como responsáveis pelo tropismo que o *Cryptococcus* apresenta pelo SNC, esse neurotropismo é atualmente associado a concentração de nutrientes assimiláveis pelo fungo e que existem no líquido tais como tiamina, ácido glutâmico, dopamina. Carboidratos, glutamina e minerais, além de ser

relacionado também a baixa atividade da resposta inflamatória do tecido cerebral e a ausência de atividade do sistema complemento no líquido (COHEN *et al.*, 1982; LIN; HEITMAN, 2006; LITTMAN; SCHNEIERSON, 1959).

Casadevall (2010), descreve que o mecanismo de invasão do SNC pelo *Cryptococcus* envolve basicamente dois processos: invasão direta do SNC conhecido como transcitose que ocorre após chegada do criptococo por dispersão hematológica, após transporte por macrófagos, nos capilares cerebrais e um segundo mecanismo descrito como “Cavalo de Troia” que ocorre após fagocitose do criptococo por macrófago que libera o fungo dentro no SNC após passagem do macrófago “infectado” do compartimento venoso para o parênquima cerebral (Figura - 3).

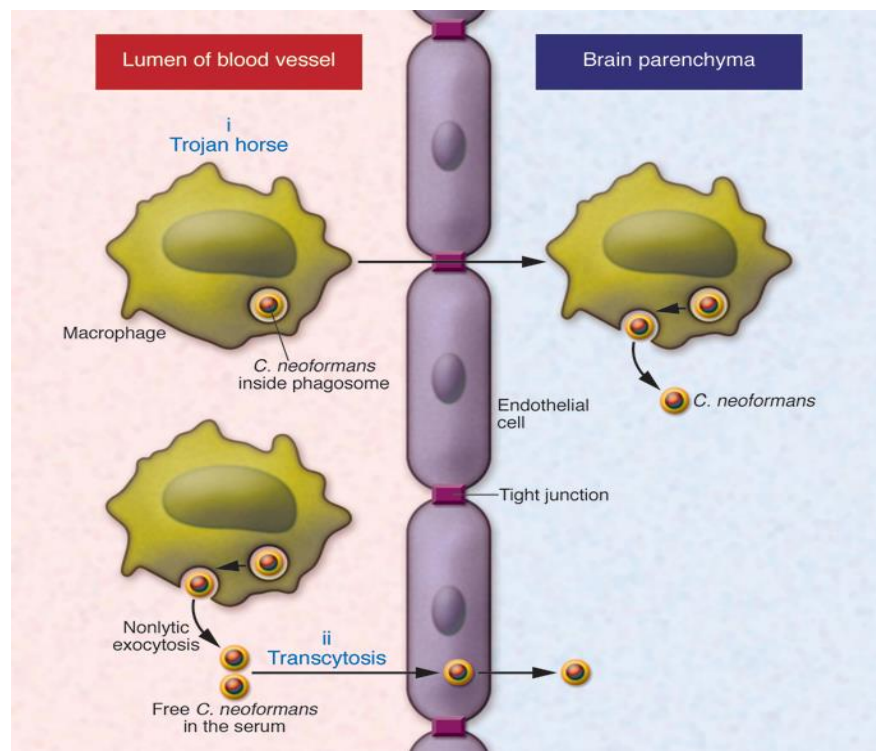


Figura 3 - Mecanismos utilizados pelo *Cryptococcus* para invasão do SNC. I - Cavalo de Troia- O fungo utiliza o transporte para o cérebro através do macrófago após fagocitose, II – Transcitose ocorre a passagem do fungo do lúmen dos vasos

capilares para o parênquima cerebral de forma direta. (Adaptado de CASADEVAL, 2010)

As apresentações clínicas mais comuns são meningite ou meningoencefalite aguda ou subaguda, entretanto lesões focais únicas ou múltiplas em SNC, simulando neoplasias, associadas ou não ao quadro meníngeo são observadas em especial no hospedeiro imunocompetente. Estima-se que a meningoencefalite é a forma clínica mais diagnosticada, ocorrendo em mais de 80% dos casos, quer sob forma isolada ou associada ao acometimento pulmonar (ROZENBAUM; GONÇALVES, 1994).

Nos pacientes imunocompetentes o quadro clínico que resulta da inflamação do SNC é acentuada, com sinais meníngeos evidentes, tais como, náuseas, vômitos e rigidez de nuca, os sinais de meningoencefalites em parte dos pacientes na admissão são alterações de consciência, déficit de memória de linguagem e cognição, ocorre também o acometimento de pares cranianos, apresentando estrabismo, diplopia e/ou paralisia facial III, IV, VI e VII, apesar do grande pleomorfismo clínico da criptococose a demência pode ser a única manifestação da doença.

Déficit visual ou amaurose que pode ser de caráter temporário ou definitivo ao longo da evolução e tratamento, refletem lesão do I par craniano (oftálmico) sendo descrita com mais frequência em adultos jovens e pessoas de meia idade, em especial pacientes do sexo masculino (ARAGÃO *et al.*, 2008).

A suspeita de infecção do SNC por *Cryptococcus spp.* exige exame clínico e neurológico rigoroso, incluindo avaliação dos sinais focais e fundo de olho. A recomendação de punção lombar com raquimanometria para os pacientes com suspeita de criptococose, devido a incidência elevada de hipertensão intracraniana (HIC), devendo ser precedida por exames de imagem para excluir as possibilidades de lesões expansivas intracerebrais e prevenir possíveis complicações.

1.10.3 INFECÇÃO DISSEMINADA

Na infecção disseminada, observa-se o desenvolvimento de infecções cutâneas na forma de pápulas, pústulas ou nódulos subcutâneos. Há casos de infecção cutânea primária, sem disseminação, e ainda de infecções em outros órgãos (KROCKENBERGER *et al.*, 2010; LIN; HEITMAN, 2006; WEATHERHEAD *et al.* 2006).

1.11 O DIAGNOSTICO

O diagnóstico da meningite criptocócica é realizado laboratorialmente através de achados das estruturas do fungo em fluidos biológicos com realização de pesquisa direta com tinta da china, cultivo, exame anatomopatológico ou ainda com teste positivo de antígeno criptocócico (GANIEM *et al.*, 2009).

Quanto ao diagnóstico de criptococose ainda na fase pulmonar é fundamental garantir que não ocorra a disseminação da doença, especialmente para o SNC, devido à necessidade de um tratamento mais agressivo nos casos de neurocriptococose (SEVERO *et al.*, 2009).

1.12 PRINCIPAIS METODOS LABORATÓRIAS

1.12.1 EXAME DIRETO

A pesquisa de leveduras encapsuladas do fungo através de microscopia direta utilizando tinta da china (tinta nanquim) é um teste bastante difundido e amplamente utilizado por ser rápido, baixo custo de execução e não requerer tecnologia avançada.

A técnica pode ser realizada imediatamente após a punção lombar, visualizando-se as leveduras encapsuladas com diâmetro médio de 5-20 μm . A microscopia apresenta sensibilidade que varia entre 30 e 50% de em casos de meningite criptocócica em pacientes sem Aids, e de até 80% em pacientes com meningite criptocócica associada à Aids (CHAYAKULKEEREE & PERFECT, 2006). A levedura pode ser vista no escarro, lavado brônquico, LCR, pus de abscesso, urina, aspirados de medula óssea e de gânglios, fragmentos de tecidos, com grande sensibilidade. No LCR, a microscopia é geralmente positiva quando a contagem de células fúngicas estão acima 10⁴ UFC/ml, não sendo preditora de evolução.

O hidróxido de potássio com tinta *Parker superchrome blue black* ou solução de 0,1% de branco de calco flúor (microscópio de imunofluorescência) facilitam a visualização dos elementos fúngicos que associada a centrifugação do LCR por 10 minutos aumenta a sensibilidade. (Figura – 4)

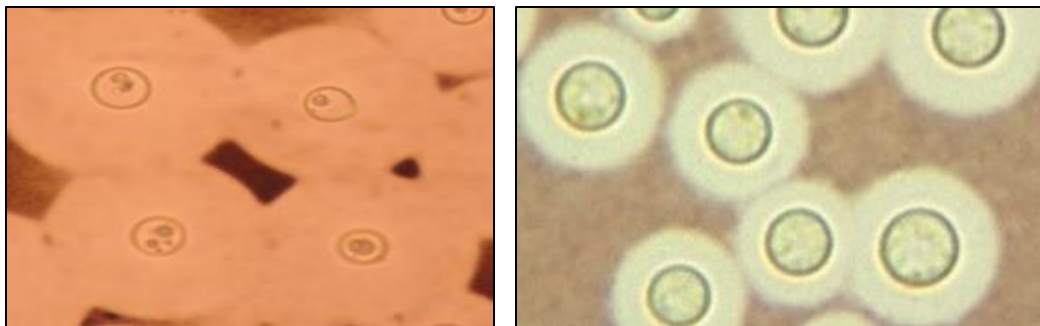


Figura 4 - Imagens da estrutura dos *Cryptococcus spp.* em exame com tinta da China.

1.12.2 CULTIVO

C. neoformans e *C. gattii* crescem facilmente a partir de amostras biológicas semeadas em meios de cultivo de rotina, como ágar Sabouraud-dextrose, e as colônias podem ser observadas após 48-72 h de incubação a 30-35°C em condições aeróbicas.

Os isolados de *Cryptococcus spp.* podem ser diferenciados das espécies de *Candida spp.* através do meio enriquecido com sementes de *Guizotia abyssinica* (ágar niger.), que contém substratos fenólicos e detecta a atividade da fenoxidase presente em *Cryptococcus spp.* formando melanina, de modo que as colônias ficam marrons.

As espécies podem ser determinadas baseando-se nas características das cores no meio de L-Canavanina-Glicina-azul de Bromotimol (CGB) (KWON-CHUNG & POLACHEC, 1982).

A cultura é o exame comprobatório da doença. O *Cryptococcus spp.* cresce bem em vários meios de cultivos, que não contenham ciclo-heximidina: Agar-sangue, Agar-Sabouraud e Agar infusão de cérebro-coração. Pode crescer em temperaturas entre 25°C e 37°C, mas cresce melhor a 30°C. A termo tolerância máxima é de 40°C. Colônias mucóides de tonalidade creme podem ser observadas em 48h de incubação. A habilidade de utilizar a glicina como fonte de carbono e nitrogênio e a resistência a canavanina azul de bromotimol permite a separação de *Cryptococcus gattii* do *Cryptococcus neoformans*, no meio de CGB. (Figura - 5)

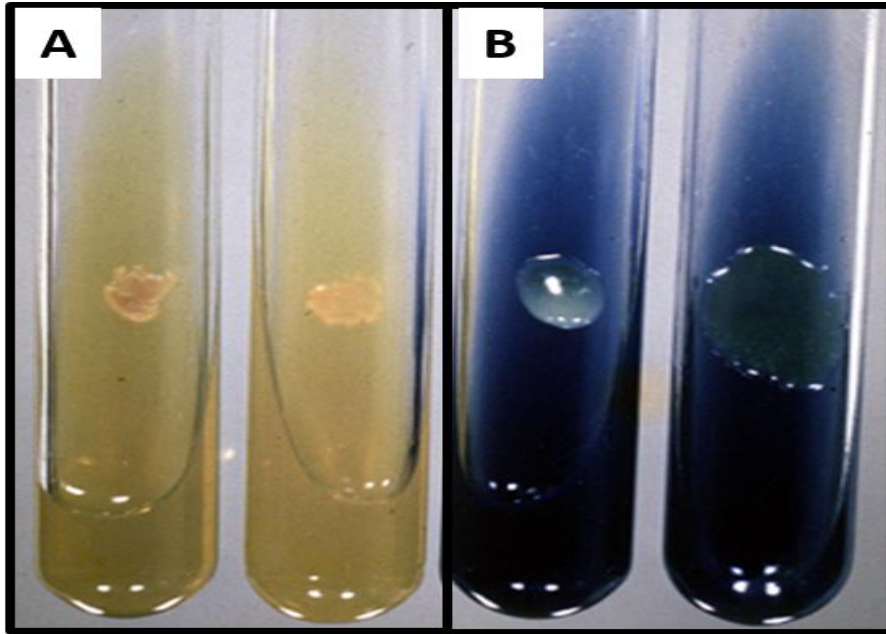


Figura 5 - Determinação das espécies de *C. neoformans* (A) e *C. gattii* (B) realizada através do aspecto (coloração) desenvolvido em meio de cultura CGB.

A cultura de LCR é positiva em 89% dos pacientes sem infecção por HIV e em 95-100% dos pacientes com AIDS.

A hemocultura pode revelar a presença do fungo no sangue na doença disseminada.

1.12.3 EXAMES SOROLÓGICOS

A detecção do antígeno do polissacarídeo capsular de *Cryptococcus spp.* no soro, urina e no líquido cefalorraquidiano tem sido bastante utilizada, sendo um dos principais testes sorológicos realizados na rotina micológica. A detecção desse antígeno envolve diferentes técnicas – Imunoensaio Enzimático (EIA), Aglutinação de partículas de Látex (LA) e Imunocromatografia por Lateral-Flow-Assay (CrAg LFA).

O LA utiliza partículas de látex revestidas com anticorpos policlonais para a cápsula criptocócica. A sensibilidade e a especificidade desses testes de aglutinação para antígeno criptocócico encontram-se entre 93-100% e 93-98%, respectivamente.

(KAUFFMAN *et al.*, 1981). A detecção de antígeno capsular polissacarídeo de *Cryptococcus* pela aglutinação do látex, pode ser realizada no sangue, urina, lavado brônquio alveolar e no LCR. No entanto, na prática, a detecção de antígeno é mais comumente realizada em amostras de LCR e soro (SWINNE & DE VROEY, 1992). Os resultados da pesquisa de antígeno criptocócico são positivos no LCR e soro em mais de 90% dos pacientes com meningite criptocócica, já em infecções fora do SNC fornecem menor positividade do teste.

A pesquisa de antígeno trata-se de teste acurado, simples, rápido e disponível no comércio. Títulos de 1:4 no LA sugerem fortemente que a infecção por *Cryptococcus* e títulos superiores a 8 indicam doença em atividade. A sensibilidade chega a 90% em pacientes com Aids, pois em geral possuem títulos elevados. A maioria dos falsos positivos ocorre em reação cruzada com fator reumatoide, e mais raramente pode ocorrer reação cruzada com *Trichosporon* ou por contaminação. Testes falsos negativos ocorrem raramente e estão associados a baixos títulos de antígenos, presença de imunocomplexos, altos títulos de antígenos (fenômeno prozona) e infecção por *Cryptococcus* com pouca cápsula ou não encapsulados. Os testes de ELISA foram desenvolvidos para detecção tanto de antígenos como de anticorpos. O teste de ELISA detecta antígenos em títulos mais baixos e mais precocemente na infecção criptocócica. No entanto, o teste é mais demorado e laborioso. Os anticorpos em geral, não estão presentes durante a infecção ativa e podem aparecer durante o tratamento e com a recuperação do paciente.

Atualmente foi desenvolvido um ensaio imunocromatográfico para pesquisa de antígeno criptocócico no soro, urina e LCR, conhecido como Lateral-Flow-Immunoassay (CrAg LFA). O CrAg LFA é um teste altamente sensível, rápido, com baixo custo e de fácil execução, portando, uma alternativa acessível e segura para

diagnóstico de criptococose em indivíduos com suspeita de infecção por *Cryptococcus* spp. (Figura - 6)

GANIEM *et al.* (2014), em estudo realizado com pacientes HIV positivo na Indonésia relata a que o uso do screening de CRAG como rotina após punção lombar associado ao uso de tratamento antifúngico preventivo nos casos positivos provavelmente ajudam a reduzir a mortalidade.

Desenho esquemático do Cryptococcal Lateral Flow Assay.

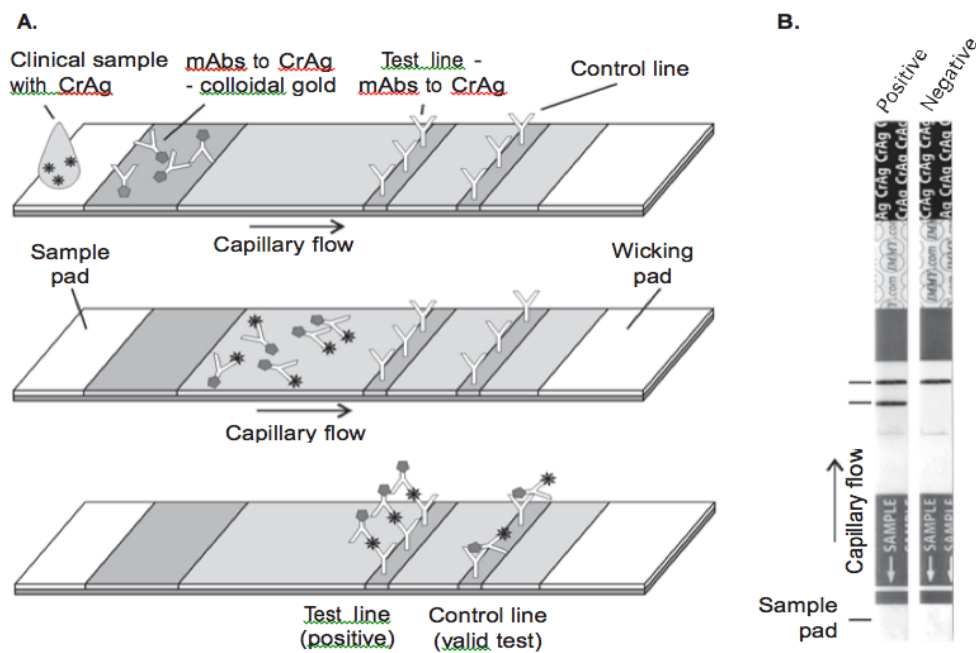


Figura 6 - A - Visualização esquemática do ensaio imunocromatográfico para detecção de antígeno criptocócico. B. Imagens de resultados positivo e negativo de CRAG LFA (Adaptado de KOZEL & BAUMAN, 2012)

1.13 COMPARAÇÃO ENTRE METODOS DE PESQUISA DE ANTIGENO

O antígeno criptocócico pode ser encontrado no soro de pacientes infectados com *Cryptococcus* antes da presença de suspeita clínica da meningite. Em um estudo de coorte realizado na África revelou que a realização de screening identificou

adequadamente e de forma antecipada pacientes em risco de desenvolver meningite criptocócica e morte por criptococose (JARVIS *et al.*, 2009).

Quando comparada em pareado os métodos EIA e LA, ensaios realizados em 185 amostras de sangue e 164 amostras de LCR sendo as amostras respectivamente 44 e 33 de pacientes HIV negativo com criptococose. Observou-se que em títulos superiores a 1:256 no sangue e 1:32 no LCR o teste de EIA é melhor indicador de positividade da doença que o LA. No entanto o teste EIA não detectou 18,4% das amostras positivas através do LA realizadas no sangue e 7,8% das positivas confirmadas por LA no LCR. Foi observada uma maior sensibilidade do LA sobre o EIA principalmente em paciente sem HIV (PANACKAL *et al.*, 2014). O ensaio de CRAG LFA realizados em amostras de LCR apresenta alta sensibilidade e especificidade na detecção de meningite criptocócica. Adicionalmente, os títulos de CrAg LFA no LCR se correlacionam diretamente com o tempo de diagnóstico da infecção fúngica e apresenta associação com a redução da mortalidade entre 2 e 10 semanas. O CrAg LFA é um teste rápido, de baixo custo e sem necessidade de uma estrutura avançada além de requerer treinamento mínimo do utilizador, o CrAg LFA se apresenta com um teste eficaz para diagnóstico de meningite criptocócica em lugares com recursos limitados (KABANDA *et al.*, 2013). Outros achados acrescentam evidências de que o LFA é um ensaio com alta acurácia para o diagnóstico de meningite criptocócica. Em estudo incluindo amostras de nove pacientes com cultura de LCR para fungos positivas, todas tiveram os resultados de LFA no LCR positivos (MCMULLAN *et al.*, 2012). Um segundo estudo comparando LFA em LCR e EIA para o teste de antigenemia determinou uma sensibilidade perfeita (15/15) e 99,7% de especificidade (395/394) (HANSEN; SLECHTA; GATES-HOLLINGSWORTH, 2013). Fica claro que os achados evidenciam que o LFA é possivelmente mais sensível que

a cultura de fungos dependendo dos diferentes estágios da doença (KABANDA *et al.*, 2013).

A sensibilidade analítica do teste de CrAg LFA tem se demonstrado consistentemente superior ao LA e EIA na detecção de antígenos de todos os sorotipos para até mais de 200-diluições (faixa de 19 a 222 diluições) A especificidade analítica do LFA é extremamente alta, com baixos registros de reações cruzadas.

Tabela 1 - Pesquisa de antígeno criptocócico com o CrAg-LFA em comparação com outras metodologias (Adaptado de KOZEL & BAUMAN, 2012)

<u>CRAG LFA</u>
<ul style="list-style-type: none"> - Não requer pré-tratamento da amostra - Alta sensibilidade para todos os sorotipos de <i>Cryptococcus</i> - Pode ser realizado com o mínimo de infraestrutura e com treinamento básico - Resultados rápidos – 10 minutos - Baixo custo de realização
<u>AGLUTINAÇÃO DE LATEX (LA)</u>
<ul style="list-style-type: none"> - Requer pré-tratamento do soro com Pronase - Sensibilidade reduzida para o sorotipo C - Não disponível para uso com pouca infraestrutura - Resultados em tempo intermediário – 10 a 30 minutos (dependendo da espécie) - Custo Intermediário
<u>ENZIMA IMUNOENSAIO (EIA)</u>
<ul style="list-style-type: none"> - Não requer pré-tratamento da amostra - Sensibilidade reduzida aos sorotipos C e D - Requer infraestrutura avançada e treinamento técnico qualificado - Tempo longo para obtenção dos resultados – 35 a 45 minutos - Custo elevado

1.14 TRATAMENTO DA CRIPTOCOCOSE

Os pacientes com meningite criptocócica requerem tratamentos complexos e hospitalizações prolongadas (pelo menos 14 dias) com custo elevado (PERFECT *et al.*, 2010).

Segundo a Infectious Diseases Society of America (IDSA), o manejo da criptococose continua sendo um desafio, com poucas drogas novas ou sem estudos recentes definitivos de sua eficácia. No entanto, se o diagnóstico é feito precocemente, se os clínicos aderirem aos princípios básicos das guias de manejo da Aids e se a doença predisponente é controlada, então, a criptococose pode ser tratada com êxito na maioria dos pacientes (PERFECT *et al.*, 2010).

O tratamento da meningoencefalite criptocócica atualmente ainda é baseado no pequeno número de acompanhamentos clínicos, porém estudos mais recentes tem reforçado as limitações dos mesmos e reflete a necessidade de novos antifúngicos e os avanços médicos (JACKSON & HOSSEINIPOUR, 2010; WARKENTIEN; CRUMCIANFLONE, 2010).

A escolha do antifúngico depende do sítio de infecção e da imunidade do paciente. Os principais antifúngicos utilizados são anfotericina B (0,5-1,0 mg/kg/dia) e seus derivados lipídicos, fluconazol (400 mg/dia) e 5-flucitosina (100 mg/kg/dia, em combinação com anfotericina B devido ao frequente surgimento de resistência em monoterapia (GANIEM *et al.*, 2009). Infelizmente, a 5-flucitosina apesar de sua boa eficácia não é uma droga de fácil acesso no Brasil (SEVERO *et al.*, 2009).

O Consenso em Criptococose - 2008 estabeleceu algumas diretrizes para o tratamento de criptococose no Brasil com base na compilação de tratamentos preestabelecidos e avaliação de vários profissionais e suas experiências regionais com a doença. Para melhor definição de tratamento sugere-se algumas categorias de força de evidencia.

Em pacientes com a presença de forma pulmonar da doença o Consenso 2008, recomenda tratamentos distintos entre pacientes HIV negativos (Figura - 8) e pacientes HIV positivo.

Tratamento da Forma Pulmonar em paciente HIV Negativo

Estado imunológico	Forma clínica	Tratamento	Duração (dose total)	Evidência
Imunocompetente ou	leve/	fluconazol 200-400mg/d ou	6 a 12 meses	AIII
Imunodeprimido:	moderada	itraconazol 200-400mg/d VO ou		BIII
HIV negativo		anfotericina B 0,5-1mg/kg/d		BIII
	grave	tratar como meningoencefalite		

*em todos os casos determinar *Cryptococcus* no LCR: se cultura ou pesquisa direta e/ou látex positivos: tratar como infecção em SNC

Figura 7 - Roteiro para tratamento* das formas pulmonares de criptococose em HIV negativo. Pacientes com pesquisa de antígeno criptocócico e cultura em LCR negativas. (Adaptado de Consenso, 2008)

Nos casos de tratamento de pacientes HIV Positivo com a forma pulmonar é recomendado em todos os casos determinar *Cryptococcus spp.* no LCR: se cultura ou pesquisa direta e/ou látex positivos os pacientes devem ser tratados como infecção em SNC. Em pacientes com Aids e linfócitos T CD4+ > 100 a 200 células/mm³ por mais de 6 meses e aderentes a TARV, pode ser considerada a suspensão da terapêutica antifúngica de manutenção (CIII) (Consenso, 2008). (Figura – 9)

Tratamento da Forma Pulmonar em paciente HIV Positivo

Forma leve/moderada		
Antifúngico	Dose e duração	Evidência
Fluconazol	200 a 400mg/dia VO por 6 a 12 meses	AIII
Ou	(vide observação)	
Itraconazol	200 a 400mg/dia VO por 6 a 12 meses	BIII
	(vide observação)	
Manutenção	fluconazol 200 a 400mg/dia ou itraconazol 200 a 400mg/dia	CIII
Forma grave	tratar como meningoencefalite	

Figura 8 - Roteiro para tratamento das formas pulmonares de criptococose: HIV positivo ou cultura positiva de espécime respiratório, sem envolvimento do SNC. (Adaptado de Consenso, 2008)

Pacientes diagnosticados com meningite criptocócica são tratados com administração oral de fluconazol ou intravenoso de anfotericina B. A anfotericina B desoxicolato tem sido administrado com sucesso terapêutico em casos de meningite criptocócica, por apresentar rápida depuração do *Cryptococcus spp.*, entretanto, essa droga pode ocasionar nefrotoxicidade importante. A anfotericina B lipossomal quando disponível é utilizada como substituto, pois apresenta a vantagem de reduzir essa toxicidade (SUBRAMANIAN & MATHAI, 2005).

No tratamento de pacientes HIV positivo, segundo o Consenso 2008, o uso de Fluconazol deverá ser iniciado na fase de consolidação, quando paciente apresentar melhora clínica definida por: melhora do status mental, febre, cefaléia, sinais meníngeos e/ou negativação da cultura do LCR na segunda semana. Os pacientes com CD4+ > 100 a 200 células/mm³ por mais de 6 meses e aderentes a TARV, recomenda-se a suspensão da terapêutica antifúngica de manutenção (BI/BIII); reiniciar a terapêutica de manutenção se CD4 cair para < 100 cels/mm³ (CIII) (BENSON *et al.*, 2004; MUSSINI *et al.*, 2004; VIBHAGOOOL *et al.*, 2003). (Figura – 11)

Indução	Consolidação	Evidência
Anfotericina B: 0,7 a 1mg/kg/dia + 5-Fluocitosina: 100mg/kg/dia + 4 doses VO por 2 semanas	fluconazol: 400mg/dia VO por 10 semanas	AI ^{20,21}
Esquemas alternativos		
anfotericina B: 0,7 a 1mg/kg/dia por 6 a 10 semanas		BI ²²
anfotericina B lipossomal 4 a 6mg/kg/dia por 6 a 10 semanas		BI ²³
anfotericina B complexo lipídico 4 a 5 mg/kg/dia por 6 a 10 semanas		BI ^{24,25}
Em casos de intolerância ou impossibilidade de uso de anfotericina B e suas formulações lipídicas		
fluconazol: 800 a 1600mg /dia associado 5 FC 100mg/Kg/dia ÷ 4 doses VO, ou fluconazol: 1600 a 2000mg/dia por dia por 6 a 10 semanas ou fluconazol: 400 a 800mg/dia por 10 a 12 semanas		BI ²⁶ CI ²⁷
*Manutenção 12 a 24 meses		
fluconazol: 200 a 400mg/dia, 1x dia, VO		AI ²⁸
itraconazol: 200mg/dia 1X, VO		CI ²⁹

Figura 9 - Tratamento de pacientes HIV positivo e outras formas de imunodepressão com criptococose em sistema nervoso central ou doença disseminada. (Adaptado Consenso, 2008)

Estudos realizados sugerem que o tratamento possui geralmente entre 50 a 80% de efetividade, pois as drogas antivirais causam toxicidade em até um terço dos pacientes, a taxa de mortalidade provocada pelo uso de terapia antifúngica é alta (aprox. 20%), e essa mortalidade varia consideravelmente dependendo do estado imune do hospedeiro (BENNETT *et al.*, 1979; VAN der HORST *et al.*, 1997; DROMER *et al.*, 1996; PAPPAS *et al.*, 2001).

Em estudo realizado por LINDEMBERG *et al.* (2008), relata que em uma serie de casos estudados o antifúngico mais utilizado foi anfotericina B (106/123) seguido de fluconazol em aproximadamente 60% dos casos.

1.15 DESFECHO DA DOENÇA

Ainda que seja oferecido ao paciente um tratamento adequado a letalidade hospitalar da criptococose é considerada alta em países com recursos limitados, com taxas superiores a 40% chegando a 49,2% na Colômbia (LIZARAZO *et al.*, 2012; LESSELLS *et al.*, 2011; MOREIRA, 2006).

Um episódio de meningite criptocócica pode evoluir com um número significativo de sequelas e déficits neurológicos. As mais frequentes são diminuição da capacidade mental (30%), redução da acuidade visual (8%) e paralisia permanente de nervos cranianos (5%) e hidrocefalia. A forma disseminada da doença pode apresentar-se como febre de origem indeterminada, com hepatoesplenomegalia febril, bem como através do acometimento de adrenais, rins, linfonodos de mediastino, pele, ossos, miocárdio, endocárdio, tireoide, testículo, hipófise entre outros.

Estudos histológicos das vias ópticas de pacientes com infecção por *C.neoformans* var. *gattii*, demonstraram pequenas reações inflamatórias nas células, devido à invasão por *Cryptococcus*. Isto leva à hipótese de pelo menos dois mecanismos que poderiam levar à disfunção do nervo óptico. Primeiramente, a resposta celular nas meninges cercado o nervo óptico pode causar um estrangulamento do nervo e comprometimento do seu suprimento vascular e como segundo mecanismo uma invasão direta do tecido neural pelo *Cryptococcus* que pode ser combinada com uma resposta do hospedeiro inflamatória celular causando edema no nervo óptico (SEATON *et al.*, 1997).

Em análise isolada dos pacientes com comprometimento do SNC, a confusão mental e ausência de cefaleia foram consideradas sintomas relacionados com pior prognóstico. Pacientes com criptococose pulmonar e derrame pleural também apresentam pior prognóstico (IGREJA *et al.*, 2004).

Em estudo realizado no Brasil a taxa de letalidade dos pacientes diagnosticados com criptococose foi de 49,6%, sendo 51% entre os pacientes infectados pelo HIV e 41,2% entre os não infectados pelo HIV (LINDENBERG *et al.*, 2008).

O presente trabalho justifica-se pela necessidade de se disponibilizar dados sobre a utilização do método diagnóstico ágil e confiável em pacientes com suspeita de meningite, visando o diagnóstico e tratamento precoce da criptococose.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a frequência de detecção de antígeno criptocócico obtido por CrAg-LFA em amostras de líquido cefalorraquidiano de pacientes com suspeita de meningite em um hospital de referência do estado do Piauí.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Comparar as taxas de detecção de antígeno criptocócico obtido por CrAg-LFA em diferentes perfis citológicos e bioquímicos líquóricos;

Comparar as taxas de detecção de antígeno criptocócico obtido por CrAg-LFA em pacientes HIV positivos e HIV negativos;

Descrever os perfis bioquímico e citológicos do líquido cefalorraquidiano dos pacientes positivos para o antígeno criptocócico obtido por CrAg-LFA;

Avaliar a sensibilidade e a especificidade da detecção de antígeno criptocócico obtido por CrAg-LFA, comparativamente à coloração com Tinta da China.

3 METODOLOGIA

3.1 FONTE DE DADOS E DESENHO DO ESTUDO

O estudo foi realizado na cidade de Teresina, capital do Piauí, no hospital de referência no tratamento de doenças infecciosas que recebe pacientes de vários municípios do Piauí e de outros estados. A cidade de Teresina situada no meio-norte do País com clima tropical, é a única capital do Nordeste que não se encontra no litoral. A sua localização favorece o desenvolvimento de sua economia que guarda íntima relação com a área da saúde. Por ser reconhecida como polo de saúde a cidade atende casos de pacientes procedentes de vários municípios vizinhos e até de alguns estados próximos, como Maranhão, Pará e Ceará.

Foi realizado um estudo de casos com coleta de dados de pacientes de atendidos com suspeita de meningite no Instituto de Doenças Tropicais Dr. Natan Portela-IDTNP em Teresina-PI no período de novembro de 2014 a março de 2015. Para obter os dados necessários foram utilizadas as informações coletadas do Livro de Registro de Laboratório, prontuários dos pacientes e das suas fichas de investigação de meningites no SINAN.

3.2 AMOSTRAGEM, CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E DETECÇÃO DE ANTIGENO CRIPTOCOCICO POR CRAG-LFA

Os critérios de inclusão do estudo são os pacientes atendidos no Hospital com suspeita de meningite e submetidos à realização do teste de CrAg no LCR. Foram

excluídos do estudo os dados de pacientes que não foram encontrados resultados dos exames de pesquisa direta de fungos e/ou tinta da china e/ou aglutinação látex e/ou cultura para pesquisa de *Cryptococcus spp.*

O teste CrAg assim como o teste de tinta da China é realizado pelo hospital e já faz parte da rotina adotada não sofrendo o paciente nenhuma interferência por conta da pesquisa. Os dados de cultura do líquido para diagnóstico de criptococose e dados de hemocultura não foram incluídos devido à ausência dos dados em grande parte dos pacientes.

O exame foi realizado pelo hospital logo após punção lombar para obtenção de líquido do paciente. Para detecção de antígeno criptocócico no líquido foi utilizado o teste rápido imunocromatográfico LFA (INLAB - Alamar Tecno Científica Ltda), para a análise qualitativa é realizada adição de 40 µL da amostra em tubo de reação, adicionada uma gota do diluente de reação do kit de CrAg-LFA, e em seguida a parte reagente da fita é mergulhada nessa solução. O resultado é interpretado após 10 minutos, os positivos podem ter sua titulação estimada através da diluição da amostra e análise conforme recomendação do fabricante do teste. (Figura - 12)

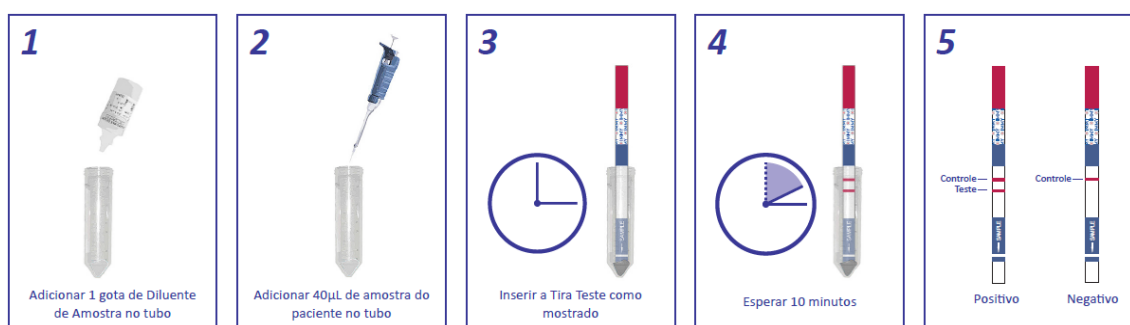


Figura 10 - Desenho esquemático para realização do teste de Crag-LFA. (Adaptado de Inlab, 2012)

O método mais comumente utilizado para o diagnóstico de meningite criptocócica no Hospital é o teste da tinta da China que já faz parte da rotina de exames realizados pelo serviço em amostras de LCR dos pacientes com suspeita de meningite, o teste consiste na análise do líquido do paciente em um microscópio, após a adição de 20 µL da amostra em uma lamina de vidro e 20 µL de tinta tipo nanquim (tinta da China). Essa mistura é coberta com lamínula e analisada em microscópio para visualização das estruturas característica do fungo que, são representadas pela capsula polissacarídica do *Cryptococcus*.

Os dados dos pacientes que atenderam aos critérios de inclusão e exclusão foram coletados e analisados e não interferiram no diagnóstico e tratamento da doença.

Os dados levantados através de questionários estruturados com variáveis categóricas e variáveis contínuas foram processadas no programa Epiinfo 4.1, observando vários parâmetros como: idade do paciente, gênero do paciente, cor/raça, zona de moradia, data da investigação, ocupação, sinais e sintomas, tempo de internação, aspecto do LCR, tinta da china, resultado do CrAg, cultura, aglutinação pelo látex, critério de confirmação, desfecho, data de desfecho, diagnóstico final, condições de imunossupressão.

3.3 ASPECTOS ÉTICOS

Por tratar-se de um estudo com obtenção dos dados de prontuários e fichas no SINAN não houve riscos aos participantes da pesquisa.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual do Piauí / FACIME.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES INCLUÍDOS NO ESTUDO

Dos pacientes participantes do estudo 78/140 (55,7%) são do gênero masculino e 62/140 (44,3%) do gênero feminino, os pacientes atendidos tem idades que variam de 1 a 71 anos com média geral de idade de 34,6 anos. Entre os pacientes com resultado de CrAg-LFA positivo e diagnosticados com meningite criptocócica o gênero masculino apresentou discreta superioridade na distribuição com 10/19 (52,6%) dos casos e o gênero feminino com 9/19 (47,4%) dos casos, a média de idade foi de 37,4 anos nos pacientes positivos.

Tabela 2 - Características epidemiológicas dos pacientes atendidos com suspeita de meningite e que cumpriram os critérios de inclusão da pesquisa.

CARACTERÍSTICAS	TOTAL DE PACIENTES N = 140		CASOS POSITIVOS N = 19	
	N	%	N	%
SEXO				
MASCULINO	78	55,7	10	52,6
FEMININO	62	44,3	9	47,4
FAIXA ETARIA				
1 a 12	16	11,4	2	10,5
13 a 21	15	10,7	2	10,5
22 – 45	70	50,0	10	52,6
46 – 60	31	22,1	4	21,1
> 60	8	5,7	1	5,3
HIV				
POSITIVO	15	10,7	6	31,6
NEGATIVO	125	89,3	13	68,4

O perfil sorológico dos pacientes atendidos que realizaram exame para investigação de criptococose no líquido revelou que 15/140 (10,7%) dos pacientes

apresentavam positividade para o HIV, entre os pacientes que tiveram confirmação de resultado no CrAg-LFA este número é de 6/19 (31,6%).

Os pacientes com resultados positivos para criptococose eram procedentes de diversas cidades no próprio estado e também de estados vizinhos, estes pacientes foram diagnosticados e realizaram tratamento no Hospital de referência. Observou-se que 11/19 (57,9%) dos pacientes eram do estado do Piauí e 8/19 (42,1%) do estado do Maranhão. (Tabela – 4)

Tabela 3 - Distribuição dos casos de pacientes com criptococose por estado de procedência.

<i>Estado</i>	<i>Sexo</i>				<i>Total/Estado</i>	
	<i>Masculino</i>		<i>Feminino</i>		<i>N</i>	<i>%</i>
	<i>N</i>	<i>%</i>	<i>N</i>	<i>%</i>		
Piauí	4	21,1	7	36,8	11	57,9
Maranhão	6	31,6	2	10,5	8	42,1
Total/ Sexo	10	52,6	9	47,4	19	100

As cidades que apresentaram um maior número de casos de criptococose foram Teresina-PI 6/19 (31,6%) dos casos e Caxias-MA 3/19 (15,8%) dos casos.

(Tabela – 5)

Tabela 4 - Distribuição dos pacientes com criptococose por município de origem e atendidos no centro de referência no Estado do Piauí.

PIAUI (N=11)			MARANHÃO (N=8)		
<i>Cidades</i>	<i>N</i>	<i>%</i>	<i>Cidades</i>	<i>N</i>	<i>%</i>
TERESINA	6	31,6	CAXIAS	3	15,8
ARRAIAL	1	5,3	TIMON	1	5,3
REGENERAÇÃO	1	5,3	ALDEIAS ALTAS	1	5,3
GUADALUPE	1	5,3	LAGOA DA MATA	1	5,3
PIRIPIRI	1	5,3	IMPERATRIZ	1	5,3
CAMPO MAIOR	1	5,3	COELHO NETO	1	5,3

4.2 TAXA DE DETECÇÃO DE ANTÍGENO CRITOCÓCICO POR CRAG-LFA EM PACIENTES COM SUSPEITA DE MENINGITE

A taxa geral de positividade para antígeno criptocócico foi de 19/140 (13,6%). Esta taxa foi de 10/78 (12,8%) em homens e 9/62 (14,5%) em mulheres ($p = 0,808$). Houve detecção do antígeno criptocócico em todas as faixas etárias. A taxa de detecção não variou significativamente nas diferentes faixas, atingindo 2/16 (12,5%) em crianças com idade até 12 anos e 10/70 (14,3%) em pessoas com idade entre 21 e 45 anos. Estes resultados estão sumarizados no Quadro 1.

Quadro 1 - Taxas de detecção de antígeno criptocócico em líquido de pacientes com suspeita de meningite por faixa etária, em centro de referência no estado do Piauí. IDTNP, 2015.

Faixa etária (anos)	Negativos	Positivos
1 a 12	14 (87,5%)	2 (12,5%)
13 a 21	13 (86,7%)	2 (13,3%)
22 – 45	60 (85,7%)	10 (14,3%)
46 – 60	27 (87,1%)	4 (12,9%)
> 60	7 (87,5%)	1 (12,5%)

Entre os pacientes com resultado positivo para criptococose neste estudo a faixa etária predominante foi de pacientes entre 22 e 45 anos 10/19 (52,6%). Este resultado é compatível com resultados obtidos por MOREIRA *et al.* (2006), quando relata a presença de criptococose em hospital de Uberlândia-SP que na faixa etária

de 21 a 40 anos concentra 67,7% dos casos de criptococose nos pacientes da pesquisa.

A criptococose é relatada com maior frequência em adultos jovens e pessoas de meia idade, sendo mais comum em pacientes do gênero masculino. Alguns estudos relatam uma frequência de 80 a 85% de todos os casos ocorrendo entre os 20 e 60 anos de idade (MANFREDI *et al.*, 1993; GOODMAN *et al.*, 1970; HUNG *et al.*, 1995). Outros autores também relatam predomínio de casos de criptococose em pacientes na faixa etária de 30 a 60 anos (DARZÉ, GOMES, MELO, 2000; PIRES *et al.*, 2000; SAAG *et al.*, 2000).

Os resultados obtidos no presente estudo são compatíveis com estudos realizados na África (com média de idade de 34 anos), na França (média de 33 anos para mulheres e 36 anos para homens) e na Austrália (37 anos para homens e 48 para mulheres) (MILLOGO *et al.*, 2004; DROMER *et al.*, 2004; JENNEY *et al.*, 2004).

MEZZARI *et al.* (2013), em estudo realizado analisando 42 prontuários de pacientes com criptococose em um hospital de Porto Alegre, relata que dos pacientes infectados 50% encontravam-se na faixa etária de 30 a 39 anos. Assim como LEAL *et al.*, que avaliando a meningite criptocócica em pacientes também no Rio Grande do Sul relata a média de idade de 36 anos entre os infectados.

4.3 TAXAS DE DETECÇÃO DE ANTÍGENO CRITOCÓCICO POR CRAG-LFA EM DIFERENTES PERFIS CITOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS LIQUÓRICOS

As médias de concentração de glicose no líquido cefalorraquidiano foram 56,83 ± 20,7 mg/dL nos pacientes negativos e 57,50 ± 19,6 mg/dL nos pacientes positivos

($p = 0,928$). As médias de concentração de proteína no líquido cefalorraquidiano foram $53,85 \pm 38,95$ mg/dL nos pacientes negativos e $51,29 \pm 25,40$ mg/dL nos pacientes positivos ($p = 0,810$).

As médias de contagem relativa de células mononucleares foi $77,7\% \pm 3,6\%$ nos pacientes negativos e $84,9\% \pm 6,2\%$ nos pacientes positivos ($0,326$). Com relação à média de contagem relativa de células polimorfonucleares, esta foi ligeiramente superior no grupo negativo, atingindo $18,6\% \pm 2,9\%$. No grupo CrAg – positivo esta média foi de $10,1\% \pm 3,2\%$ ($p = 0,059$).

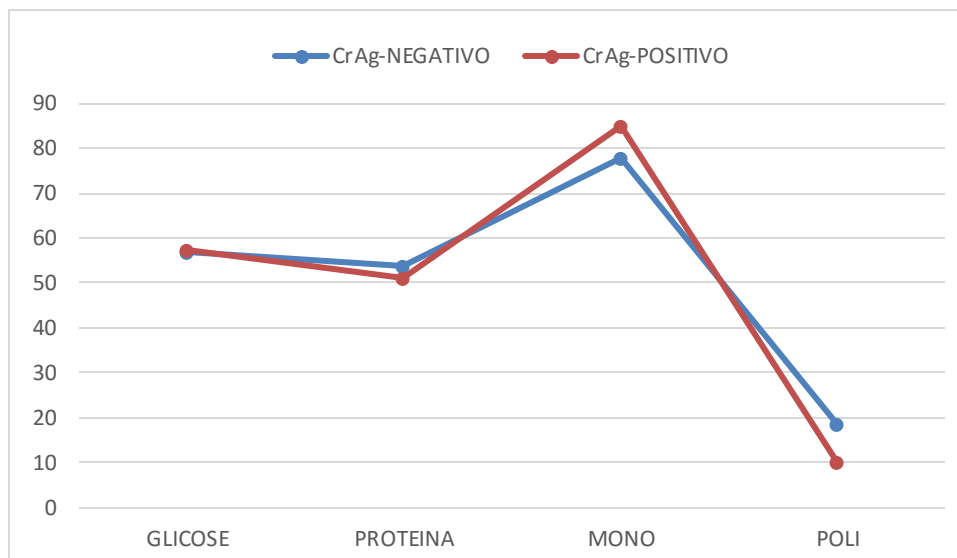


Figura 11 - Perfis bioquímicos e citológicos do LCR em pacientes com resultados de CrAg e diagnosticados com criptococose em comparação com pacientes com meningites de outras etiologias. IDTNP - 2015.

Como evidenciado no gráfico acima os resultados obtidos a partir dos exames citológicos e bioquímicos no líquido da população participante da pesquisa não guardam diferenças significativas entre os dois grupos que permitam inferir uma distinção clara utilizando apenas desses parâmetros, para diferenciar pacientes com meningite criptocócica e os pacientes que apresentam meningite de outras etiologias.

4.4 TAXAS DE DETECÇÃO DE ANTÍGENO CRIPTOCÓCICO OBTIDO POR CRAG-LFA EM PACIENTES HIV POSITIVOS E HIV NEGATIVOS

Em pessoas com infecção pelo HIV, a taxa de detecção de antígeno criptocócico no líquido de pacientes com suspeita de meningite foi de 6/15 (40%). Entre os pacientes HIV-negativos esta taxa de positividade foi significativamente inferior e atingiu 13/125 (10,4%) ($p = 0,007$). (Figura – 14)

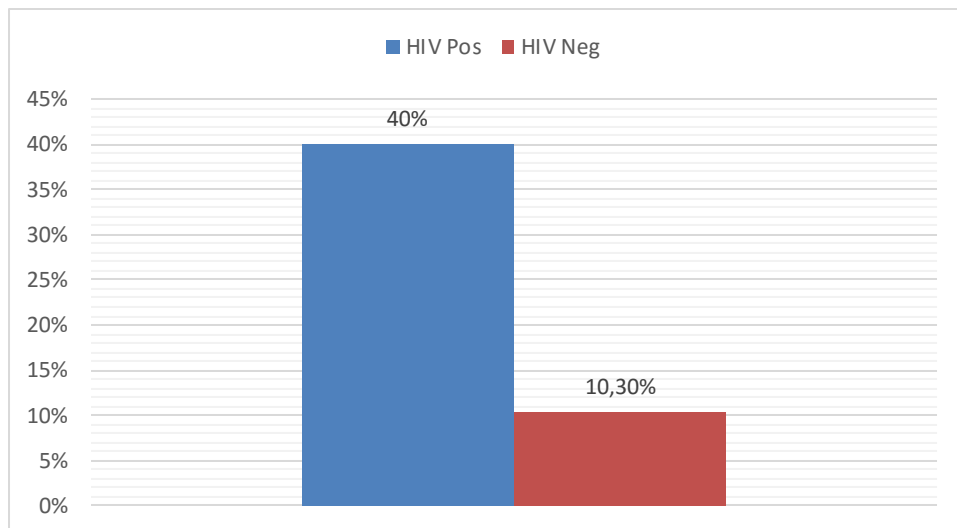


Figura 12 - Percentual de criptococose entre os grupos de pacientes infectados e não infectados por HIV. IDTNP, 2015

Alguns autores relatam a ocorrência de criptococose em cerca de 6 a 13% dos pacientes com infecção pelo HIV, sendo esta a causa mais frequente de meningite nesses pacientes (VICHKOVA-LASHKOSKA *et al.*, 2004; BARAIA-ETXABURU *et al.*, 1996).

Tabela 5 - Frequência de resultados de antígeno criptocócico em LCR obtidos com o CrAg-LFA e Tinta da China entre pacientes infectados e não infectados por HIV. IDTNP, 2015.

Pacientes	CrAg-LFA				Tinta da China			
	Negativo		Positivo		Negativo		Positivo	
	N	%	N	%	N	%	N	%
HIV +	9	6,4	6	4,3	12	8,6	3	2,1
HIV -	112	80,0	13	9,3	113	80,7	12	8,6
Total	121	86,4	19	13,6	125	89,3	15	10,7

4.5 SENSIBILIDADE E A ESPECIFICIDADE DA DETECÇÃO DE ANTÍGENO CRIPTOCÓCICO OBTIDO POR CRAG-LFA, COMPARATIVAMENTE À COLORAÇÃO COM TINTA DA CHINA.

Devido a dificuldades enfrentadas pelo Serviço na realização da Cultura para fungos (padrão-ouro), a não localização dos resultados em prontuários, esse dado não foi incluído no trabalho.

Dos 14 pacientes positivos pela com Tinta da China, todos foram igualmente positivos ao Crag, apontando para sensibilidade de 100%. Os resultados estão sumarizados na Quadro 2.

Quadro 2 - Sensibilidade e Especificidade da detecção de antígeno criptocócico em líquido de pacientes com suspeita de meningite, em centro de referência no estado do Piauí.

TINTA DA CHINA E CRAG-LFA						
			CRAG		Total	
			NEG	POS		
TINTA	NEG		121	5	126	
		% TINTA	96,00%	4,00%	100,00%	
		% CRAG	100,00%	26,30%	90,00%	
	POS		0	14	14	
		% TINTA	0,00%	100,00%	100,00%	
		% CRAG	0,00%	73,70%	10,00%	
Total			121	19	140	
			% TINTA	86,40%	13,60%	100,00%
			% CRAG	100,00%	100,00%	100,00%

Segundo BOULWARE *et al.* (2014), a sensibilidade da tinta da China é baixa (86%) e altamente dependente da carga fungica, a sensibilidade pode apresentar uma redução para 42% nos indivíduos com cultura de LCR < 1000 UFC/mL, ainda no mesmo estudo estima que, a tinta da China utilizada como único teste de diagnóstico da meningite criptocócica aproximadamente 8,8% dos casos de meningite ficariam sem confirmação diagnóstica.

Existem evidências de que o teste de CrAg-LFA é mais sensível até que a cultura de fungos especialmente nas fases iniciais da doença. KABANDA *et al.* (2013), descreve dois casos em que os pacientes tinham baixos títulos de LFA (1:10), confirmados com o teste de Látex, apresentavam cultura fungica negativa e apenas um tinha confirmação da tinta da China, ambos os pacientes foram submetidos a repetição dos testes no prazo de 14 dias e só então tiveram confirmação de meningite criptocócica através da cultura positiva e da tinta da China.

Entre os 126 pacientes com resultados negativos para coloração com Tinta da China 5 pacientes eram positivos para criptococose, em contrapartida eles foram corretamente identificados pelo CrAg-LFA, demonstrando a superioridade do CrAg-LFA na detecção da criptococose em 5/19 (26,3%) dos pacientes quando comparados os dois testes. Os dados obtidos tornam-se de extrema importância pois confirmam a melhor capacidade de detecção e diagnóstico da criptococose com auxílio do teste CrAg-LFA. (Figura – 15)

As técnicas tiveram concordância de 96,4%, com estatística Kappa de 0,829.

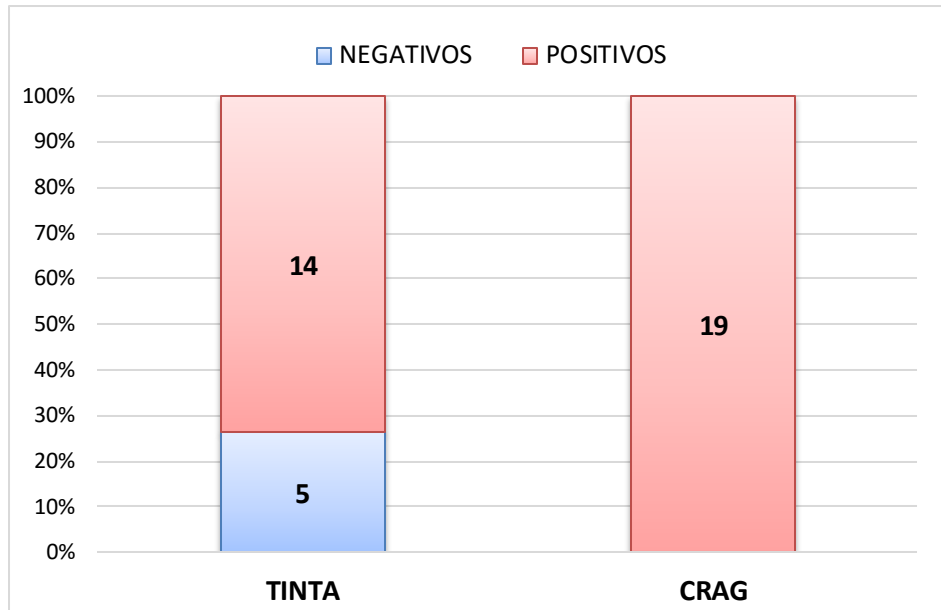


Figura 13 – Comparação entre os resultados obtidos em líquido de pacientes através dos métodos tinta da China e CrAg-LFA.

Diversos autores relatam que o CrAg-LFA é altamente sensível e relativamente mais específico que a cultura e o LA. A pesquisa de LA e CrAg-LFA apresentam elevada concordância nas amostras de plasma e LCR (96% e 97%, respectivamente). A cultura e tinta da China possuem baixa concordância com CrAg-LFA (85% e 87%, respectivamente).

É importante ressaltar que uma baixa concordância também foi encontrada entre a cultura e tinta da China quando comparados com LA, sugerindo que os resultados positivos obtidos com o CrAg-LFA não significam que são resultados falso-positivos, mas representam que o CrAg-LFA é mais sensível na detecção de infecção criptocócica que a cultura e tinta da China. (KOZEL & BAUMAN, 2012)

Este dado reforça o que foi descrito por alguns autores quando referem que o teste de CrAg-LFA é um teste altamente preciso para o diagnóstico da meningite criptocócica e reforça a deficiência do teste de tinta da China pois seu resultado está

intimamente relacionado a carga fungica. (KABANDA *et al.*, 2013; KOZEL & BAUMAN, 2012)

Do ponto de vista de diagnóstico do paciente o exame de CrAg-LFA detectou que 4% dos pacientes considerados negativos pela Tinta da China, haviam recebido um resultado falso-negativo.

Se a tinta da China fosse o único teste utilizado para diagnóstico da criptococose no estudo 5/19 (26,3%) dos pacientes com criptococose receberiam um resultado falso-negativo, sendo assim teriam seu diagnóstico e conseqüentemente o tratamento retardado, o que favoreceria um mal prognóstico para os pacientes.

Tabela 6 - Distribuição dos casos de meningite criptocócica e resultados da análise do LCR obtidos com o CrAg-LFA e Tinta da China. IDTNP, 2015.

CARACTERÍSTICAS	TOTAL DE PACIENTES N = 140		CASOS POSITIVOS N = 19	
	N	%	N	%
CRAG-LFA				
NEG	121	86,4	0	0,0
POS	19	13,6	19	100,0
TINTA DA CHINA				
NEG	126	90,0	5	26,3
POS	14	10,0	14	73,7

BOULWARE *et al* (2014), considera que o teste CrAg-LFA poderá mudar dramaticamente o diagnóstico da criptococose, em especial nas áreas menos favorecidas e ainda permite o diagnóstico na fase inicial da doença.

5 CONCLUSÕES

- O estudo mostrou que dos 140 pacientes 19 foram positivos para o CrAg-LFA no LCR e 15 para tinta da China, mostrando o CrAg mais sensível que a tinta da China;
- Os perfis citobioquímicos dos LCR estudados nos pacientes positivos e negativos para criptococose não mostrou significância estatísticas entre os grupos;
- Os dados obtidos demonstraram taxas de positividade do CrAg-LFA entre os pacientes HIV positivos similares as detectadas em países de alta endemicidade de HIV;
- Entre os pacientes HIV negativos a taxa de positividade é superior aos relatados na maior parte dos trabalhos no Brasil;
- Os resultados do teste de CrAg-LFA confirmam uma sensibilidade de 100%, resultado idêntico ao descrito por diversos autores;
- A relação existente entre carga fúngica e resultado de tinta da China foi a possível causa de resultado falso-negativo observado em 5/19 (26,9%) dos pacientes diagnosticados com meningite criptocócica.

6 PERSPECTIVAS

- Ampliação do uso do CrAg-LFA na rotina dos serviços de saúde para todos os pacientes que adentrem o serviço com diagnóstico de meningite;
- Realizar estudos caso-controle para análise mais apurada de resultados;
- Aprimorar informações epidemiológicas em prontuários e fichas de notificação.
- Incluir a criptococose como uma doença de notificação compulsória para revelar a real situação da criptococose no Meio-Norte do Brasil.

REFERENCIAS

- ALEXOPOULOS, C. J., MIMS, C. W., BLACKWELL, M. *Introductory Mycology*. 4.ed. *New York: John Wiley & Sons*, 1996.
- ALMEIDA, F. P. *Mycologia Medica*. Estudo das mycoses humanas e de seus cogumelos. São Paulo: Melhoramentos, 1939.
- ARAGÃO, R.E.M.; BARREIRA,C.M.M.A.; RIBEIRO, D.C.S.; TIMÓTEO, C.N.G. Amaurose bilateral por meningoencefalite criptocócica: relato de caso. *Arq Bras Oftalmol* v.71. n.1 São Paulo. 2008.
- BARAIA-ETXABURU J, CAREAGA J, ZUBERO Z, MUÑOZ J, TEIRA R, CISTERNA R, SANTAMARÍA JM. Cryptococcosis cutânea em dos pacientes com SIDA. ***Revista Clínica Española***. 1996;196(6):412-3.
- BENNETT JE, DISMUKES WE, DUMA RJ, MEDOFF G, SANDE MA, GALLIS H, LEONARD J, FIELDS BT, BRADSHAW M, HAYWOOD H, MCGEE ZA, CATE TR, COBBS CG, WARNER JF, ALLING DW. A comparison of amphotericin B alone and combined with flucytosine in the treatment of cryptococcal meningitis. *N. Engl. J. Med.* 301:126 –131. 1979.
- BENSON CA, KAPLAN JE, MASUR H, PAU A, HOLMES KK, CDC - Centers for Disease Control; National Institutes of Health; Infectious Diseases Society of America. Treating opportunistic infections among HIV infected adults and adolescents. *MMWR -Morbidity and Mortality Weekly Report* 53 (RR15): 1-112, 2004.
- BENCHIMOL, JL., AND SÁ, MR., EDS. AND ORGS. *Adolpho Lutz*. Dermatologia e Micologia = Dermatology and Micology [online]. Rio de Janeiro: Editora *FIOCRUZ*, 2004. 620 p. Adolpho Lutz *Obra Completa*, v.1, book 3. ISBN: 85-7541-043-1. Available from SciELO Books <<http://books.scielo.org>>.
- BOULWARE D.R., ROLFES M.A., RAJASINGHAM R, VON HOHENBERG M, QIN Z, TASEERA, SCHUTZ C, KWIZERA R, BUTLER E.K., MEINTJES G, MUZOORA C, BISCHOF J.C, MEYA D.B. Multisite Validation of Cryptococcal Antigen Lateral Flow Assay and Quantification by Laser Thermal Contrast. *Emerging Infectious Diseases* • www.cdc.gov/eid • Vol. 20, No. 1, January 2014
- BRASIL. 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.
- BRITO AM, CASTILHO EA, SZWARCOWALD CL. AIDS e infecção pelo HIV no Brasil: uma epidemia multifacetada. *Rev Soc Bras Med Trop* 34: 207-217, 2001.

- BYRNES EJ, LI W, LEWIT Y, ET AL. Emergence and Pathogenicity of Highly Virulent *Cryptococcus gattii* Genotypes in the Northwest United States. Howlett BJ, ed. *PLoS Pathogens*. 2010;6(4): e1000850. doi:10.1371/journal.ppat.1000850.
- CASADEVALL A. "Cryptococci at the brain gate: break and enter or use a Trojan horse?" *J Clin Invest*. 2010 May 3;120(5):1389-92. doi: 10.1172/JCI42949. Epub 2010 Apr 26. PMID: 20424319
- CAVALCANTI MAS. Criptococose e seu agente no meio-norte, estados do Piauí e Maranhão, Brasil. PhD Thesis, Universidade Federal do Piauí/Fundação Oswaldo Cruz, Teresina/Rio de Janeiro, 154 pp. 1995.
- CDC. Emergence of *Cryptococcus gattii* – Pacific Northwest, 2004. 2010. *Morb Mortal Wkly Rep* 2010; 59: 865–868.
- CALVO B, COLOMBO A, ET AL. Antifungal susceptibilities, varieties, and electrophoretic karyotypes of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* from Brazil Chile, and Venezuela. *J Clin Microbiol* 2001; 39(6): 2348-2350.
- CHAYAKULKEEREE M, PERFECT JR. Cryptococcosis. *Infect Dis Clin North Am*. 2006;20(3):507-44, v-vi.
- CORREA MPSC, OLIVEIRA EC, DUARTE RRBS, PARDAL PPO, OLIVEIRA FM, SEVERO LC. Criptococose em crianças no estado do Pará, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 32:505-508,1999.
- COHEN J. The pathogenesis of cryptococcosis. *J Infect*. 1982;5(2):109-16.
- COHEN J, PERFECT JR, DURACK DT. Cryptococcosis and the basidiospore. *Lancet*. 1982;1(8284):1301.
- CURRIE B, CASADEVALL A, ET AL. Estimation of the prevalence of cryptococcal infection among patients infected with the human immunodeficiency virus in New York City. *Clin Infect Dis* 1994; 19(6): 1029-1033.
- D'SOUZA C.A., HAGEN F., BOEKHOUT T., COX G.M. & HEITMAN J. Investigation of the basis of virulence in serotype A strains of *Cryptococcus neoformans* from apparently immunocompetent individuals. *Curr. Genet*. 46:92-102. 2004.
- DARZÉ C, LUCENA R, GOMES I, MELO A. Características clínicas laboratoriais de 104 casos de meningoencefalite criptocócica. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 33:21-26, 2000.
- DEL POETA M, AND CASADEVALL A. Ten challenges on *Cryptococcus* and Cryptococcosis. *Mycopathologia*. 173:303-310. 2011.
- DROMER F, MATHOULIN S, DUPONT B, BRUGIERE O, LETENNEUR L.. Comparison of the efficacy of amphotericin B and fluconazole in the treatment of cryptococcosis in human immunodeficiency virus-negative patients: retrospective analysis of 83 cases. French Cryptococcosis Study Group. *Clin. Infect. Dis*. 22(Suppl 2):S154 –S60. 1996

DROMER F, MATHOULIN-PÉLISSIER S, FONTANET A, RONIN O, DUPONT B, LORTHOLARY O, FRENCH Cryptococcosis Study Group. Epidemiology of HIV-associated cryptococcosis in France (1985–2001): comparison of the pre- and post HAART eras. *AIDS* 2004; 18:555–62.

ELLIS D, PFEIFFER T, *ET AL.* Ecology, life cycle and infectious propagule of *Cryptococcus neoformans* *Lancet* 1990; 336 (8720) : 923-925.

ESCANDON P., SANCHEZ A, MARTINEZ M, MEYER W, CASTANEDA E. Molecular epidemiology of clinical and environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex reveals a high genetic diversity and the presence of the molecular type VGII mating type a in Colombia. *FEMS Yeast Res* 6 (2006) 625–635 2006 *Federation of European Microbiological Societies*.

BRATTON E.W, HUSSEINI N.EL, CHASTAIN C.A, LEE M.S, POOLE C, STURMER T, JULIANO J.J, WEBER D.J, PERFECT J.R. Comparison and Temporal Trends of Three Groups with Cryptococcosis: HIV-Infected, Solid Organ Transplant, and HIV-Negative/Non-Transplant

FIDALGO, O. Introdução à história da micologia brasileira. São Paulo: Rickia, 1968. v.3, p.1-44.

FILIU W F, WANKE B, *ET AL.*. Avian habitats as sources of *Cryptococcus neoformans* in the city of Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2002; 35(6): 591-595.

FITZGIBBONS L, DEBESSE E, WINTHROP K, FIALA S, WONG B, CIESLAK P., *OR* Clinical Characteristics and Outcomes of *Cryptococcus gattii* Infection, Oregon 2004-2010. *Oregon Division of Public Health, Portland* . 2011.

FRANZOT SP, SALKIN IF, CASADEVALL A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999;37(3):838-40.

GANIEM AR, PARWATI I, WISAKSANA R, VAN DER ZANDEN A, VAN DE BEEK D, STURM P, *ET AL.*. The effect of HIV infection on adult meningitis in Indonesia: a prospective cohort study. *AIDS*. 2009; 23:2309_16.

GANIEM AR *ET AL.*. Asymptomatic cryptococcal antigenemia is associated with mortality among HIV-positive patients in Indonesia. *Journal of the International AIDS Society* 2014, 17:18821

GATES-HOLLINGSWORTH MA, KOZEL TR. Serotype sensitivity of a lateral flow immunoassay for cryptococcal antigen. *Clin Vaccine Immunol*. 2013;20:634–5. <http://dx.doi.org/10.1128/CVI.00732-12>

GILLECE J D, J M SCHUPP, *ET AL.* Whole genome sequence analysis of *Cryptococcus gattii* from the Pacific Northwest reveals unexpected diversity. *PLoS One* 2011; 6(12): e 28550.

GOODMAN JS, KOENIG MG. Amphotericin B - Specifics of Administration. *Mod Treat.* 1970;7(3):581-95.

HANSEN J, SLECHTA ES, GATES-HOLLINGSWORTH MA, ET AL.. Large-scale evaluation of the immuno-mycologics lateral flow and enzyme-linked immunoassays for detection of cryptococcal antigen in serum and cerebrospinal fluid. *Clin Vaccine Immunol* 2013; 20: 52-5.

HAIJEH RA, CONN LA, STEPHENS DS, BAUGHMAN W, HAMILL R, GRAVISS E, ET AL.. Cryptococcosis: population-based multistate active surveillance and risk factors in human immunodeficiency virus-infected persons. Cryptococcal Active Surveillance Group. *J Infect Dis.* 1999;179(2):449-54.

HEITMAN, J.; KOZEL, T.R.; KWON-CHUNG, K.J.; PERFECT, J.R.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus* from human pathogen to model yeast. 2nd ed *Washington: ASM Press*, 2011. 620 p.

HUNG PC, WANG HS, CHOU ML, SUN PC, HUANG SC. Cerebral cryptococcosis in a child. *Zhonghua Min Guo Xiao Er Ke Yi Xue Hui Za Zhi.* 1995;36(2):131-5.

IGREJA RP, LAZÉRA MS, WANKE B, GALHARDO MC, KIDD SE, MEYER W. Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients of the Brazilian city, Rio de Janeiro. *Medical Mycology* 42:229-238, 2004.

JACKSON A, HOSSEINIPOUR MC. Management of cryptococcal meningitis in sub-Saharan Africa. *Curr. HIV/AIDS Rep.* 7:134 –142. 2010.

JARVIS JN, MEINTJES G, WILLIAMS A, BROWN Y, CREDE T, HARRISON TS. Adult meningitis in a setting of high HIV and TB prevalence: findings from 4961 suspected cases. *BMC Infect Dis.* 2010;10:67.

JARVIS JN, LAWN SD, VOGT M, BANGANI N, WOOD R, HARRISON TS. Screening for cryptococcal antigenemia in patients accessing an antiretroviral treatment program in South Africa. *Clin Infect Dis.* 2009;48:856_62.

JARVIS JN, PERCIVAL A, BAUMAN S, PELFREY J, MEINTJES G, WILLIAMS GN, ETAL.. Evaluation of a novel point-of-care cryptococcal antigen test on serum, plasma, and urine from patients with HIV-associated cryptococcal meningitis. *Clin Infect Dis.* 2011;53:1019–23. <http://dx.doi.org/10.1093/cid/cir613>

JENNEY A, PANDITHAGE K, FISHER DA, CURRIE BJ. Cryptococcus infection in Tropical Australia. *J Clin Microbiol* 2004; 42:3865–68.

JONGWUTIWES, U.; SUNGKANUPARPH, S.; KIERTIBURANAKUL, S. Comparison of clinical features and survival between cryptococcosis in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative patients. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 61 (2008), pp. 111–115

JUNIOR VLP, GALHARDO MCG, LAZÉRA M, WANKE B, REIS RS, PEREZ M. Criptococose associada à Aids: a importância do cultivo da urina no seu diagnóstico. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2006 (39): 230-232. 2006.

KATSU M, KIDD S, ANDO A, MORETTI-BRANCHINI ML, MIKAMI Y, NISHIMURA K, MEYER W. The internal transcribed spacers and 5.8S rRNA gene show extensive diversity among isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *FEMS Yeast Research* 4:377-388, 2004.

KAUFFMAN CA, BERGMAN AG, SEVERANCE PJ, MCCLATCHEY KD. Detection of cryptococcal antigen. Comparison of two latex agglutination tests. *Am J Clin Pathol.* 1981;75(1):106-9.

KIDD S.E., HAGEN F., TSCHARKE R.L., HUYNH M., BARTLETT K.H., FYFE M., MACDOUGALL L., BOEKHOUT T., KWON-CHUNG K.J. & MEYER W. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 101:17258-17263. 2004.

KOZEL T, BAUMAN S. CrAg lateral flow assay for cryptococcosis. *Expert Opin Med Diagn.* 2012;6(3):245-251.

KROCKENBERGER MB, MALIK R, NGAMSKULRUNGROJ P, TRILLES L, ESCANDON P, DOWD S, ALLEN C, HIMMELREICH U, CANFIELD PJ, SORRELL TC, MEYER W. Pathogenesis of pulmonary *Cryptococcus gattii* infection: a rat model. *Mycopathologia* 170:315–330. 2010. 10.1007/s11046-010-9328-z

KWON-CHUNG KJ & BENNETT JE. Cryptococcosis. *In: Medical Mycology*; pp.397-446. *Lea & Febiger*, Philadelphia, PA. 1992.

KWON-CHUNG KJ, KOZEL TR, EDMAN JC, POLACHECK I, ELLIS D, SHINODA T, ET AL.. Recent advances in biology and immunology of *Cryptococcus neoformans*. *J Med Vet Mycol.* 1992;30 Suppl 1:133-42.

KWON-CHUNG KJ, BENNETT JE. Epidemiologic differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *American Journal of Epidemiology* 120:123-130, 1984.

KWON-CHUNG K, POLACHEC I, ET AL. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var *gattii* (serotypes B and C). *J Clin Microbiol* 1982;15(3): 535-537.

LACAZ, C. DA S. História da micologia médica no Brasil. *Ciência e Cultura*, v.35, n.11, p.1599-1607, nov. 1983.

LACAZ, C. DA S., PORTO, E., MARTINS, J.E.C., HEINS-VACCARI, E. M., MELO, N. T. DE. *Tratado de micologia médica*. 9.ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LAZERA MS. Fontes saprofitas de *Cryptococcus neoformans* na cidade do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. *Dissertação [Mestrado em Doenças Infecciosas e Parasitárias]*- Faculdade de Medicina da UFRJ; 1989

- LAZÉRA MS, CAVALCANTI MAS, TRILLES L, NISHIKAWA MM, WANKE B. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in a pottery tree hollow - evidence for a natural habitat related to decaying wood. *J Med Vet Mycol* 36: 119-122, 1998.
- LAZERA MS, CAVALCANTI MAS, LONDERO AT, TRILLES L, NISHIKAWA MM, WANKE B. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. *Med Mycol*;38:379–83. 2000.
- LAZERA MS, GUTIERREZ-GALHARDO MC, CAVALCANTI MAS, WANKE B. Criptococose. In: JR Coura (ed.), *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias, Guanabara Koogan*, Rio de Janeiro, p. 1223-1236. 2005.
- LESSELLS RJ, MUTEVEDZI PC, HELLER T, NEWELL ML. Poor longterm outcomes for cryptococcal meningitis in rural South Africa. *S Afr Med J.*;101:251-2. 2011.
- LEAL AL, FAGANELLO J, FUENTEFRIA AM, BOLDO JT, BASSANESI MC, VAINSTEIN MH. Epidemiological Profile of Cryptococcal Meningitis Patients in Rio Grande do Sul, Brazil. *Mycopathologia* 2008; 166:71–75.
- LIN, X. AND J. HEITMAN. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annu.Rev.Microbiol.* 60:69-105. 2006.
- LINDENBERG, A.S.C.; CHANG, M.R.; PANIAGO, A.M.M.; LAZÉRA, M.S.; MONCADA, P.M.F.; BONFIM, G.F.; NOGUEIRA, S.A. & WANKE, B. Clinical and epidemiological features of 123 cases of cryptococcosis in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 50(2): 75-78, 2008.
- LITTMAN, ME L. Cryptococcosis (torulosis): Current concepts and therapy. *The American journal of medicine*, v. 27, n. 6, p. 976-998, 1959.
- LIZARAZO J, CHAVES O, PEÑA Y; ESCANDÓN P, AGUDELO CI, CASTAÑEDA E. Comparación de los hallazgos clínicos y de supervivência entre pacientes VIH positivos y VIH negativos com criptococosis meníngea en un hospital de tercer nivel. *Acta Med Colomb.* 2012;37:49-61.
- MARTINS LMS. Epidemiologia da cryptococcosis em crianças e adultos jovens e diversidade de *Cryptococcus neoformans* no meio norte do Brasil, *MSc Thesis, Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz*, Rio de Janeiro, 87 pp. 2003
- MARTINS LMS, WANKE B, LAZÉRA MS, TRILLES L, BARBOSA GG, DE MACEDO RCL, CAVALCANTI MAS, EULÁLIO KD, DE CASTRO JAF, DA SILVA AS, DO NASCIMENTO FF, GOUVEIA VA, DO MONTE SJH. Genotypes of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* as agents of endemic cryptococcosis in Teresina, Piauí (northeastern Brazil). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106: 725-730. 2011.
- MARTINS MA, PUKINSKAS SRBS, ET AL. Variedades de cepas de *Cryptococcus neoformans* no Estado de São Paulo: dez anos de estudo multicêntrico. *Rev Instituto Adolfo Lutz.* 2003;62(suppl 2): 12.

- MARR K.J., JONES G.J., ZHENG C., HUSTON S.M., TIMM-MCCANN M., ISLAM A., BERENGER B.M., MA L.L., WISEMAN J.C.D., MODY C.H. *Cryptococcus neoformans* directly stimulates perforin production and rearms NK cells for enhanced anticryptococcal microbicidal activity. *Infect. Immun.* 2009;77:2436–2446.
- MANFREDI R, NANETTI A, MAZZONI A, MASTROIANNI A, CHIODO F. The incidence, etiology and clinical significance of visceral mycoses in patients with AIDS. *Minerva Med.* 1993;84(7-8):383-91. Italian.
- MATOS CS ET AL. Microbiological characteristics of clinical isolates of *Cryptococcus* spp in Bahia, Brazil: molecular types and antifungal susceptibilities. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; 31: 1647-52
- MEZZARI, A. ; WIEBBELING, A. M. P. ; FREITAS, G. S. O. ; MAY, G. G. ; ALBE, G. C. ; FILIK, H. P. ; PORTICH, J. P. ; KISSMANN, N. ; BEHAR, P. ; VILELA, R. M. M. Criptococose em um Hospital Público de Porto Alegre: dados epidemiológicos. *Journal of Infection Control*, v. 2, p. 135-139, 2013.
- MCMULLAN BJ, HALLIDAY C, SORRELL TC, ET AL. Clinical utility of the cryptococcal antigen lateral flow assay in a diagnostic mycology laboratory. *PLoS One* 2012; 7: e49541.
- MELO N.T., LACAZ C.S., CHARBEL C.E., PEREIRA A.D., HEINS-VACCARI E.M., FRANÇA-NETO A.S., MACHADO L.R. & LIVRAMENTO J.A. Quimiotipagem do *Cryptococcus neoformans*. Revisão de Literatura. Novos dados epidemiológicos sobre a criptococose. Nossa experiência com o emprego do meio C.G.B. no estudo daquela levedura. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 35(5):469-478. 1993.
- MEYER W, CASTANEDA A, JACKSON S, HUYNH M, CASTANEDA AE, MELHEM MSC. IberoAmerican Cryptococcal Study Group. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerg Infect Dis.* 2003;9: 189-95.
- MILLOGO A, KI-ZERBO GA, ANDONABA JB, LANKOANDÉ D, SAWADOGO A, YAMEOGO I ET AL. Cryptococcal meningitis in HIV-infected patients at Bobo-Dioulasso hospital (Burkina Faso). *Bull Soc Pathol Exot* 2004; 97:119–21.
- MITCHELL TG, PERFECT JR. Cryptococcosis in the era of AIDS--100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Microbiol Rev.* 1995;8(4):515-48.
- MITCHELL DH, SORRELL TC. Pancoast's syndrome due to pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. *Clin Infect Dis.* 1992;14(5):1142-4.
- MILANEZ, A. I. Fungos: heróis ou vilões? Conferência apresentada no XIV Encontro de Biólogos, Cuiabá, Mato Grosso. *Livro de resumos*, 2003. p.43.
- MORA DJ, PEDROSA AL, RODRIGUES V, MAFFEI CML, TRILLES L, LAZERA M DOS S, SILVA-VERGARA ML. Genotype and mating type distribution within clinical *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates from patients with cryptococcal meningitis in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. *Med Mycol* 48: 2010. p-561-569.

MOREIRA T DE A, FERREIRA MS, RIBAS RM, BORGES AS. Cryptococcosis: clinical epidemiological laboratorial study and fungi varieties in 96 patients. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2006; 39: 255-8.

MORETTI, M. L. ET AL. Consenso em criptococose: 2008. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.41, n.5, p.524-544, 2008

MUSSINI C, PEZZOTTI P, MIRÓ JM, MARTINEZ E, DE QUIRÓS JCL, CINQUE P, BORGHI V, BEDINI A, DOMINGO P, CAHN P, BOSSI P, DE LUCCA A, MONFORTE AA, NELSON M, NWOKOTO N, HELOU S, NEGRONI R, JACCHETTI G, ANTINORI S, LAZZARIN A, COSSARIZZA A, ESPÓSITO R, ARTINORI A, ABERG J. A for the international working group on cryptococcosis. *Clinical of Infectious Diseases* 38:565-571, 2004.

NISHIKAWA MM, LAZERA MS, BARBOSA GG, TRILLES L, BALASSIANO BR, MACEDO RC, BEZERRA CC, PÉREZ MA, CARDARELLI P, WANKE B. Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Brazil: analysis of host and regional patterns. *Journal of Clinical Microbiology* 41:73-77, 2003.

NUCCI M, QUEIROZ-TELLES F, TOBÓN AM, RESTREPO A, COLOMBO AL. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. *Clin Infect Dis* 51: 561-570. 2010.

OLIVEIRA F DE M, SEVERO CB, GUAZZELLI LS, SEVERO LC. *Cryptococcus gattii* fungemia: report of a case with lung and brain lesions mimicking radiological features of malignancy. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2007;49(4):263-5.

PANACKAL AA, DEKKER JP, PROSCHAN M, BERI A, WILLIAMSON PR. Enzyme Immunoassay versus Latex Agglutination Cryptococcal Antigen Assays in Adults With non-HIV-related Cryptococcosis. *J. Clin. Microbiol.* doi:10.1128/JCM.02017-14. 2014.

PAPPALARDO MCSM, MELHEM MSC. Cryptococcosis: a review of the brasilian experience for the disease. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 2003; 45(6): 299-305.

PAPPAS PG, PERFECT JR, CLOUD GA, LARSEN RA, PANKEY GA, LANCASTER DJ, HENDERSON H, KAUFFMAN CA, HAAS DW, SACCENTE M, HAMILL RJ, HOLLOWAY MS, WARREN RM, DISMUKES WE. Cryptococcosis in human immunodeficiency virus-negative patients in the era of effective azole therapy. *Clin. Infect. Dis.* 33:690–699. 2001.

PARK BJ, WANNEMUEHLER KA, MARSTON BJ, GOVENDER N, PAPPAS PG, CHILLER TM. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS.* 2009;23:525_30.

PASSONI LFC, WANKE B, NISHIKAWA MM, LAZÉRA MS. *Cryptococcus neoformans* isolated from human dwellings in Rio de Janeiro, Brazil: An analysis of domestic

environment of AIDS patients with and without cryptococcosis. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, v.36, p.305 – 311, 1998.

PEDROSO R, FERREIRA JC, LAVRADOR, MAS, MAFFEI CML, CANDIDO RG. The isolation and characterization of virulence factors of *Cryptococcus* spp from saprophytic sources in the city of Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. *Microbiol Res* 2009;164(2): 221-227.

PEREZ C, M DOLANDE *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*: serotypes in Venezuela. *Mycopathologia*. 2008;166(3): 149-153.

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;50:291-322.

PERFECT, J.R.; CASADEVALL, A. Cryptococcosis. *Infect. Dis. Clin. N. Am.*, 16: 837-874, 2002.

PINTO JUNIOR VLP, PONE MVP, PONE SM, CAMPOS JMS, GARRIDO JRP, BARROS ACM, TRILLES L, BARBOSA GG, MORALES BP, BEZERRA CCF, LAZÉRA M DOS S. *Cryptococcus gattii* molecular type VGII as agent of meningitis in a healthy child in Rio de Janeiro, Brazil: report of an autochthonous case. *Rev Soc Bras Med Trop* 43: 2010. p-746-748.

PIRES NETO RJ, GUIMARÃES MC, MOYA MJ, OLIVEIRA FR, LOUZADA JR P, MARTINEZ R. Hipo-gamaglobulinemia como fator de risco para infecção por *C. neoformans*: a propósito de dois casos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 33:603-608, 2000.

RAJASINGHAM R, MEYA D, ROLFES M, BIRKENKAMP K, BOULWARE DR. Cost-benefit of integrating cryptococcal antigen screening and pre-emptive treatment into routine HIV care. In: *International AIDS Society Conference*. Washington D.C.2012.

REIS-FILHO, J.B.; NEVES, A.C.; ZYMBERG, S.T. & OLIVEIRA, R.M.C. O líquido cefalorraquiano inicial nas meningoencefalites por *Cryptococcus neoformans*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 27:173, 1985.

REOLON A., PEREZ L.R.R. & MEZZARI A. Prevalência de *Cryptococcus neoformans* nos pombos urbanos da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, 40(5):293-298. 2004.

ROZENBAUM R, GONCALVES AJ, ET AL. *Cryptococcus neoformans* varieties as agents of cryptococcosis in Brazil. *Mycopathologia*. 1992;119(3): 133-136.

ROZENBAUM R, GONÇALVES AR. Clinical epidemiological study of 171 cases of Cryptococcosis. *Clinical of Infectious Diseases*. 18:369-380, 1994.

SANFELICE F. Contributo alla morfologia e biologia dei blastomiceti che si sviluppano nei succhi di alcuni frutti. *Ann. Igiene*.1894; 4:463–95 .

- SANTOS LO. Criptococose no estado do Amazonas: estudo de 75 casos diagnosticados na Fundação de Medicina Tropical/FMT/IMTM (1988-1998), Msc Thesis, Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, Rio de Janeiro, 154 pp. 2000.
- SANTOS WRA, MEYER W, WANKE B, COSTA SPSE, TRILLES L, NASCIMENTO JLM, MEDEIROS R, MORALES BP, BEZERRA CCF, MACÊDORCL, FERREIRA SO, BARBOSA GG, PEREZ MA, NISHIKAWA MM, LAZÉRA MS. Primary endemic *Cryptococcus gattii* by molecular type VGII in the state of Pará, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103: 813-818. 2008.
- SAAG MS, GRAYBILL RJ, LARSEN RA, PAPPAS PG, PERFECT JR, POWDERLY WG, SOBEL JD, DISMUKES WE. Practice guidelines for the management of cryptococcal disease. Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*. 30:710-718, 2000.
- SALKOWSKI CA, BALISH E. Inflammatory responses to cryptococcosis in congenitally athymic mice. *J Leukoc Biol* 49: 533–541. 1991.
- SÁNCHEZ A, ESCANDÓN P, CASTAÑEDA E. Determinación in vitro de la actividad de los factores asociados con la virulência de aislamientos clínicos del complejo *Cryptococcus neoformans*. *Rev Iberoam Micol*. 2008; 25: 145-149.
- SAHA DC, XESS I, BISWAS A, BHOWMIK DM, PADMA MV. Detection of *Cryptococcus* by conventional, serological and molecular methods. *J Medical Microbiol*. 2009;58(Pt 8):1098-1105.
- SPRINGER DJ, CHATURVEDI V. Projecting global occurrence of *Cryptococcus gattii*. *Emerg Infect Dis* 16: 14-20. 2010.
- SEATON RA, VERMA N, NARAQI S, WEMBRI JP, WARRELL DA. Visual loss in immunocompetent patients with *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* meningitis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1997;91(1):44-9. Comment in: *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1997;91(6):727-8.
- SEVERO CB, XAVIER MO, GAZZONI AF, SEVERO LC. Cryptococcosis in children. *Paediatr Respir Ver*. 2009.10: 166-171.
- SEVERO CB, GAZZONI AF, SEVERO LC. Curso de Atualização – Micoses Capítulo 3 - Criptococose pulmonar*. *J Bras Pneumol*. 2009;35(11):1136-1144
- SIDRIM, J.J.C.; MOREIRA, J.L.B. *Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica*. Rio de Janeiro – RJ. Guanabara Koogan, 1999.
- SOARES M, PAULA C, ET AL. Environmental strains of *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* in the city of Santos, SP, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2005;47(1): 31-36.
- SORRELL, T. C.; ELLIS, D. H. Ecology of *Cryptococcus neoformans*. *Revista Iberoamericana de Micologia*, 14: 42-43. 1997

SORRELL TC. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. *Med Mycol* 39: 155-168. 2001.

Subramanian S, Mathai D. Clinical manifestations and management of cryptococcal infection. *J Postgrad Med*. 2005; 51 Suppl 1:S21-6.

SWINNE D, DE VROEY C. Detection of circulating capsular polysaccharide antigen from *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Clinical Microbiology*. 30:2521, 1992.

TASEERA KABANDA, MARK J. SIEDNER, JEFFREY D. KLAUSNER, CONRAD MUZOORA, DAVID R. BOULWARE. Point-of-Care Diagnosis and Prognostication of Cryptococcal Meningitis with the Cryptococcal Antigen Lateral Flow Assay on Cerebrospinal Fluid. *Clinical Infectious Diseases Advance*. Access published September 24, 2013

TÁVORA L, GAMBALE W, ET AL. Comparative performance of two air samplers for monitoring airborne fungal propagules. *Braz J Med Biol Res* 2003;36(5): 613-616. *Trends Microbiol* 2011; 19(11):564–71

TRILLES L. Tipagem Molecular de cepas Brasileiras de *Cryptococcus neoformans*. 2000.80p. Tese (*Mestrado em Biologia Celular e Molecular*) – Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2000.

TRILLES L, LAZÉRA MS, WANKE B, OLIVEIRA RV, BARBOSA GG, NISHIKAWA MM, MORALES BP, MEYER W. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 103: 455-462. 2008.

VAN DER HORST CM, SAAG MS, CLOUD GA, HAMILL RJ, GRAYBILL JR, SOBEL JD, JOHNSON PC, TUAZON CU, KERKERING T, MOSKOVITZ BL, POWDERLY WG, DISMUKES WE. Treatment of cryptococcal meningitis associated with the acquired immunodeficiency syndrome. National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group and AIDS Clinical Trials Group. *N. Engl. J. Med*. 337:15–21. 1997.

VIBHAGOOL A, SUNGKANUPARPH S, MOOTSIKAPUN P, CHETCHOTISAKD P, TANSUPHASWASWADIKUL S, BOWONWATANUWONG C, INGSATHIT A. Discontinuation of secondary prophylaxis for cryptococcal meningitis in human immunodeficiencyvirus-infected patients treated with highly active antiretroviral therapy: a prospective, multicenter, randomized study. *Clinical of Infectious Diseases* 36:1329-1331, 2003.

VICHKOVA-LASHKOSKA M, KAMBEROVA S, STAROVA A, GOLEVA-MISHEVSKA L, TSATSA-BILJANOVSKA N, JANEVSKA V, PETROVSKA M. Cutaneous *Cryptococcus laurentii* infection in human immunodeficiency virus-negative subject. *European Academy of Dermatology and Venereology JEADV* 2004; 18:99-100.

WANKE B, LAZERA MS, SALMITO MA AND COLS. Consenso em criptococose – 2008. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 41(5):524-544, set-out, 2008

WARKENTIEN T, CRUM-CIANFLONE NF. An update on *Cryptococcus* among HIV-infected patients. *Int. J. STD AIDS* 21:679–684. 2010.

WEATHERHEAD, S.C.; CHARLTON, F.G. & REYNOLDS, N.J. Plaques, papules and nodules in a 40-year-old man. *Arch. Dermatol*, 142, 921-6.

YAUCH L.E., LAM J.S., LEVITZ S.M. Direct inhibition of T-cell responses by the *Cryptococcus* capsular polysaccharide glucuronoxylomannan. *PLoS Pathog.* 2006; 2: e120.

ZIMMER BL, HEMPEL HO, GOODMAN NL. Pathogenicity of the basidiospores of *Filobasidiella neoformans*. *Mycopathologia*. 1984;85(3):149-53.

APENDICE 1



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
Instituto Oswaldo Cruz


Coordenação Curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical
Av. Brasil, 4365 – Pavilhão Arthur Neiva – Térreo
Cep: 21.040-360 – Rio de Janeiro
Tel. / Fax: (021) 2562-1490 / 2562-1467 / 2562-1275


SOLICITAÇÃO DE AUTORIZAÇÃO PARA PESQUISA EM PRONTUÁRIO CLÍNICO

Eu, Carlos Alberto Mendonça Filho, responsável principal pelo projeto de pesquisa para o nível de Mestrado em Medicina Tropical, o qual pertence ao curso do Programa de Pós-graduação Stricto Sensu em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz (PGMT/IOC/Fiocruz) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), venho pelo presente, solicitar autorização do Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela (IDTNP) de Teresina-PI no setor de Ambulatório e Enfermaria para realização da coleta de dados através de prontuário clínico de pacientes submetidos a consulta médica ambulatorial ou internação em enfermaria no período de novembro de 2014 a fevereiro de 2015 para o trabalho de pesquisa sob o título "PREVALÊNCIA E EFETIVIDADE DE DETECÇÃO DE ANTIGENEMIA CRIPTOCOCCICA ATRAVÉS DO TESTE IMUNOCROMATOGRÁFICO – CRAG EM PACIENTES COM SUSPEITA DE MENINGITE ATENDIDOS NA UNIDADE DE REFERENCIA DO ESTADO DO PIAUÍ", com o objetivo de avaliar a prevalência de criptococose no estado do Piauí e analisar a efetividade de detecção da doença após a implantação do teste rápido de detecção após o período de implantação do teste.

Esta pesquisa está sendo orientada pela Prof. Dra. Maria do Amparo Salmito Cavalcanti.

Contando com a autorização desta instituição, coloco-me à disposição para qualquer esclarecimento.


 Assinatura do Pesquisador Principal
 RG: 1626513


 Dr^a. Elna Joelane L. de S. Amaral
 Médica
 CRM 3042 CPF: 761.947.873-68
 Diretora Geral do IDTNP

APENDICE 2**DECLARAÇÃO DE ANUÊNCIA INSTITUCIONAL**

Declaro para fins de comprovação junto ao Comitê de ética em Pesquisa da Fiocruz que a pesquisadora Prof. Dr. Maria do Amparo Salmito Cavalcanti, tem a concordância desta instituição para a execução, em suas instalações, de seu projeto de pesquisa "PREVALÊNCIA E EFETIVIDADE DE DETECÇÃO DE ANTIGENEMIA CRIPTOCOCCICA ATRAVÉS DO TESTE IMUNOCROMATOGRÁFICO – CRAG EM PACIENTES COM SUSPEITA DE MENINGITE ATENDIDOS NA UNIDADE DE REFERENCIA DO ESTADO DO PIAUÍ". Afirmo disponibilizar ao referido pesquisador toda infraestrutura necessária e as facilidades pertinentes à consecução do seu projeto, até o seu término.

Para que sejam produzidos todos os efeitos legais, técnicos e administrativos deste compromisso, firmo o presente instrumento.

Teresina, 20 de novembro de 2014.

Dr.ª Elma Joelane L. da S. Amaral
Médica
CRM 3042 CPF: 761.947.873-68
Diretora Geral do IDTNP

Diretor do Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela (IDTNP)

CPF _____