

MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ/PI
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

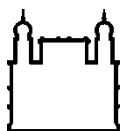
Mestrado em Medicina Tropical

Prevalência do antígeno criptocócico utilizando Lateral Flow Assay (LFA) no *screening* de
pacientes com HIV/AIDS

HERION ALVES DA SILVA MACHADO

TERESINA/PI

NOVEMBRO/2015



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ/PI

Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

HERION ALVES DA SILVA MACHADO

Prevalência do antígeno criptocócico utilizando Lateral Flow Assay (LFA) no *screening* de
pacientes com HIV/AIDS

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

Orientadores: Profa. Dra. Liline Maria Soares Martins

Profa. Dra. Márcia dos Santos Lazera

Prof. Dr. Bodo Wanke

TERESINA/PI

NOVEMBRO/2015

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

M149 Machado, Herion Alves da Silva

Prevalência do antígeno criptocócico utilizando Lateral Flow Assay (LFA) no *screening* de pacientes com HIV/AIDS / Herion Alves da Silva Machado. – Rio de Janeiro, 2015.

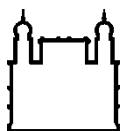
xv, 61 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2015.

Bibliografia: f. 51-61

1. Criptococose. 2. Antigenemia. 3. HIV/AIDS. I. Título.

CDD 616.9792



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ/PI

Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

HERION ALVES DA SILVA MACHADO

Prevalência do antígeno criptocócico utilizando Lateral Flow Assay (LFA) no *screening* de pacientes com HIV/AIDS

Orientadores: Profa. Dra. Liliane Maria Soares Martins

Profa. Dra. Márcia dos Santos Lazera

Prof. Dr. Bodo Wanke

Aprovada em: 18/11/2015

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Filipe Aníbal Carvalho Costa

Prof. Dr. Martha Cecília Suarez-Mutis

Prof. Dr. Fabricio Pires de Moura do Amaral

Prof. Dr. Régis Bernardo Brandim Gomes

Prof. Dr. Kelsen Dantas Eulálio

Teresina, 18 de Novembro de 2015.

DEDICATÓRIA

A meu pai Neto e minhas mães Isaura e Josélia, pelo amor, carinho e bons princípios em nossa família, refletindo em uma boa educação.

A meus irmãos Eveline, Eline, Aline, Verbena, Liline e Hamilton pelo companheirismo, atenção e apoio incondicional, sempre dispostos a ajudar nos momentos mais difíceis. Agradeço ainda aos cunhados e sobrinhos que de alguma forma torceram por mim durante essa longa jornada.

Aos colegas de trabalho que de forma direta ou indireta contribuíram para que esse sonho pudesse realizar. Agradeço ainda pela compreensão e apoio, uma vez que tive em alguns momentos me ausentar do trabalho.

A todos os amigos da Turma do Mestrado em Medicina Tropical pela convivência harmoniosa, parceria nos momentos mais difíceis e amizade sólida construída ao longo do curso.

AGRADECIMENTOS

Em especial a minha orientadora Profa. Dra. Liliane Maria Soares Martins, que é minha irmã/mãe/amiga, pela paciência e persistência em incentivar a realizar esse sonho que é meu e dela. Agradeço também pelos conhecimentos transmitidos desde a graduação e pelas palavras positivas de apoio e incentivo que se tornaram “a pedra fundamental” nessa minha caminhada e que vou sempre lembrar de forma a engrandecer-me profissionalmente e como ser humano.

À meus co-orientadores Profa. Márcia dos Santos Lazéra e Prof. Bodo Wanke, pela confiança dada a mim desde o princípio, pelo estímulo quando pensamos que tudo não irá dar certo, pelo valioso conhecimento que transmitem a todos.

Ao Prof. Filipe Aníbal Carvalho Costa, nosso coordenador Fiocruz/PI, pela compreensão, pela amizade e conhecimento técnico repassado a nós durante a realização de todo o mestrado.

Ao Prof. Kelsen Dantas Eulálio, esse que foi o maior responsável por tudo que construí até o momento, sem ele não teria acontecido esse momento tão especial em minha vida, por quem tenho grande admiração e respeito.

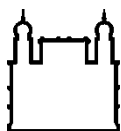
À Profa. Maria do Amparo Salmito, pela preocupação em estar acompanhando o andamento da pesquisa em todos os momentos, pelos conselhos e orientações dadas.

À meus amigos Ângela Valéria Guimarães de Miranda e José Noronha Vieira Júnior, pela parceria estabelecida desde 2013, momento que iniciava a residência médica em Infectologia, por todos os ensinamentos, orientações e pelo mais importante nossa amizade.

EPÍGRAFE

“O verdadeiro homem mede a sua força, quando se defronta com o obstáculo”.

Antoine de Saint-Exupéry



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ/PI

Prevalência do antígeno criptocócico utilizando Lateral Flow Assay (LFA) no *screening* de pacientes com HIV/AIDS

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL

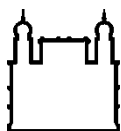
HERION ALVES DA SILVA MACHADO

INTRODUÇÃO: Meningite criptocócica causa aproximadamente 15% da mortalidade relacionada com a AIDS anualmente. A Criptococose é uma enfermidade negligenciada. Contudo, pode ser prevenida pela realização do *screening* através da pesquisa do Antígeno Criptocócico (CrAg) e de tratamento precoce durante um longo período de detecção ou infecção subclínica. Nosso estudo determinou a prevalência da antigenemia criptocócica levando em consideração níveis de linfócitos CD4 e sintomas clínicos.

MÉTODOS: Ao todo, 109 pacientes com HIV/AIDS, consentiram em participar deste estudo. Inicialmente, fez-se um levantamento de dados sócio- demográficos dos mesmos, além dos dados clínicos contidos no prontuário. A pesquisa de antígeno criptocócico utilizando Lateral Flow Assay (CrAg/LFA) no sangue e urina foi realizado em todos os pacientes inclusos no estudo, independente dos níveis de linfócitos CD4. Para os que apresentaram CrAg positivo em sangue e urina, foram submetidos a punção lombar para avaliação de CrAg no líquido.

RESULTADOS: Dos 109 pacientes, 67% eram do sexo masculino, 92% eram provenientes da área urbana e 76% eram procedentes do estado do Piauí. A média de idade foi de 35 anos, sendo 57% com idade entre 31-45 anos de idade. Cerca de 49,5% faziam uso irregular da terapia antirretroviral (TARV), 18% usavam corretamente a TARV e 32,5% eram virgens de tratamento. A prevalência de antigenemia criptocócica, foi de 8,2%. Daqueles pacientes com CrAg no sangue e urina positivos, em 3,6 % apresentava-se com $CD4 < 100 \text{ cé}/\text{mm}^3$, 58,7% com $CD4 100-199 \text{ cel}/\text{mm}^3$ e 37,7% com $CD4 \geq 200 \text{ cel}/\text{mm}^3$. Os sintomas mais comuns nos pacientes com CrAg positivo foram cefaleia, febre e vômitos.

CONCLUSÃO: O CrAg/LFA permite um exame simples, rápido e de baixo custo para o diagnóstico da criptococose e é recomendado para uso com soro, plasma, urina ou líquido em pacientes sintomáticos. O uso adequado da terapia antirretroviral contribui para uma redução da morbimortalidade dos pacientes com HIV/AIDS. Além disso, CrAg/LFA tem o potencial para identificar pacientes com infecção assintomática quem devem receber fluconazol profilático.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ/PI

Prevalence of cryptococcal antigen using Lateral Flow Assay (LFA) in the screening of patients with HIV / AIDS

ABSTRACT

MASTERS DISSERTATION ON TROPICAL MEDICINE

HERION ALVES DA SILVA MACHADO

INTRODUCTION: Annually, cryptococcal meningitis causes approximately 15% of deaths related to AIDS. The cryptococcosis is a neglected disease. Nevertheless, it can be prevented by performing the screening by means of investigating the cryptococcal antigen (CrAg) and early treatment for a long period of detection or subclinical infection. Our study determined the prevalence of cryptococcal antigenemia taking into account the levels of CD4 lymphocytes and clinical symptoms.

METHODS: All together, 109 patients with HIV / AIDS, agreed to participate in this study. Initially, there was a survey of patients' socio-demographic data, in addition to clinical data from the medical record. The cryptococcal antigen test using Lateral Flow Assay (CrAg / LFA) in blood and urine was carried out in all patients included in the study, regardless of CD4 lymphocyte levels. Those who were CrAg positive for blood and urine underwent a lumbar puncture for CrAg assessment in the fluid.

RESULTS: From the 109 patients, 67% were male, 92% were from urban areas and 76% were from the state of Piauí. The average age was 35 years, 57% aged between 31-45 years old. About 49.5% made irregular use of antiretroviral therapy (ART), 18% correctly used the ART and 32.5% were treatment-naïve patients. The prevalence of cryptococcal antigenemia was 8.2%. From the patients tested positive for CrAg for blood and urine, 3.6% had CD4 < 100 cells/mm³, 58.7% had CD4 100-199 cells/mm³ and 37.7% had CD4 ≥ 200 cells/mm³. The most common symptoms in patients with CrAg positive were headaches, fever and vomiting.

CONCLUSION: CrAg / LFA allows a simple, fast and low cost test for the diagnosis of cryptococcosis and is recommended for use with serum, plasma, urine or fluid in symptomatic patients. The correct use of the antiretroviral therapy contributes to a reduction in morbidity and mortality of HIV / AIDS patients. Furthermore, CrAg / LFA have the potential to identify patients with asymptomatic infection who must receive prophylactic fluconazole.

ÍNDICE

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Revisão de Literatura	19
1.1.1 Histórico	19
1.1.2 Agente Etiológico	20
1.1.3 Fatores Relacionados à Virulência	21
1.1.4 Ecologia	22
1.1.5 Epidemiologia	24
1.1.6 Patogenia	26
1.1.7 Aspectos Clínicos	27
1.1.8 Diagnóstico Laboratorial	28
1.1.9 Tratamento	32
1.2 Justificativa	35
2 OBJETIVOS	36
2.1 Objetivo Geral	36
2.2 Objetivos Específicos	36
3 MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 Desenho e Área de estudo	37
3.2 Casuística	37
3.3 Critério de Inclusão	37
3.4 Critério de Exclusão	37
3.5 Considerações éticas	37
3.6 Instrumento de coleta de dados clínico-epidemiológicos	38
3.7 Métodos de Confirmação Diagnóstica	38

3.8	Análise Estatística-----	40
4	RESULTADOS-----	41
5	DISCUSSÃO-----	46
6	CONCLUSÃO-----	50
7	REFERÊNCIAS -----	51
8	ANEXOS -----	62
9	APÊNDICES-----	65
	Apêndice A-----	65
	Apêndice B-----	67

LISTA DE ABREVIATURAS

- AIDS- Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
- AMPc- Monofosfato Cíclico de Adenosina
- CD4- Grupamento de Diferenciação 4
- CE- Comunidade Européia
- CGB- L - canavanina, glicina e azul de bromotimol
- CNS- Conselho Nacional de Saúde
- CONEP- Conselho Nacional de Ética em Pesquisa
- CrAg- Antígeno Criptocócico
- DNA- Ácido Desoxirribonucleico
- EIA- Antígeno Criptocócico Látex
- FDA- Administração de Comidas e Medicamentos
- HIV- Vírus da Imunodeficiência Humana
- IDTNP- Instituto de Doenças Tropicais Nattan Portela
- LCR- Líquido cefalorraquidiano
- LES- Lúpus Eritematoso Sistêmico
- LFA- Ensaio de Fluxo Lateral
- MS- Ministério da Saúde
- N- Norte
- NE- Nordeste
- NSA- Agar com Sementes de Níger
- OMS- Organização Mundial de Saúde
- RNA- Ácido Ribonucleico
- SNC- Sistema Nervoso Central
- TARV- Terapia Antirretroviral
- VG- Variedade *gattii*
- VN- Variedade *neoformans*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.Fatores de Virulência-----	22
Figura 2: Criptococose-----	27
Figura 3: A: Operação esquemática ilustrando o fluxo de análise imuno-cromatografica de lateral para a detecção de antígeno criptocócico-----	39
B: Imagens de ensaio de escoamento lateral, positivo e negativo-----	39
Figura 4: Cinco passos simples para executar a detecção do antígeno criptocócico utilizando LFA-----	39
Figura 5: Distribuição geográfica dos casos positivos dos pacientes do Piauí e Maranhão---	43

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Distribuição de pacientes quanto ao sexo-----	41
Gráfico 2: Distribuição de pacientes quanto a origem e zona de moradia-----	41
Gráfico 3: Distribuição geral de pacientes CrAg positivo e negativo em sangue e urina-----	42
Gráfico 4: Frequência das condições clínicas dos pacientes à admissão-----	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características demográficas de pacientes atendidos no IDTNP-----	42
Tabela 2: Frequência de Antigenemia Criptocócica e <i>status</i> de Terapia Antirretroviral-----	43
Tabela 3: Associação de CrAg positivo e contagem de CD4-----	44
Tabela 4: Manifestações clínicas associadas com Antigenemia Criptocócica-----	45

1. INTRODUÇÃO

Criptococose é uma micose sistêmica, causada pela inalação de basidiósporos ou leveduras desidratadas de duas espécies de *Cryptococcus* (*Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*), basidiomicetos que se apresentam em sua forma parasitária como levedura anamorfa capsulada, produtora de melanina, que após permanecer algum tempo nos pulmões, pode disseminar por via hematogênica, alojando-se principalmente no cérebro e nas meninges (BUCHANAN & MURPHY, 1998).

A criptococose encontra-se entre as infecções fúngicas emergentes de significativa morbiletalidade, principalmente sob forma de meningoencefalite, que é secundária a processo pulmonar, nem sempre diagnosticado clinicamente, seja em indivíduos imunodeprimidos ou imunocompetentes (EGHWRUDJAKPOR & ALLISON, 2009; LACAZ *et al.*, 2002).

Anteriormente à descoberta da infecção pelo HIV, a criptococose estava correlacionada a pacientes com diversas causas de imunodepressão, como tumores, Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES), diabetes mellitus ou uso de medicamentos, porém, com o aumento de casos de infecção por HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana) observou-se que emergência mundial da criptococose associadas a AIDS (Síndrome da Imnodeficiência Adquirida), quando há comprometimento grave da imunidade celular, possibilitando a ocorrência de infecções oportunistas diversas, como parasitas intracelulares (*Toxoplasma*), outros fungos, bactérias e vírus (MOREIRA *et al.*, 2006).

A criptococose apresenta-se sob a forma de diferentes quadros clínico-epidemiológicos, sendo os mais descritos: 1) Criptococose por *C. neoformans* - infecção oportunista, cosmopolita, associada a condições de imunodepressão celular, principalmente, a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA); 2) Criptococose por *C. gattii* - micose endêmica em áreas tropicais e subtropicais que atinge indivíduos imunocompetentes, similar a outras micoses sistêmicas; 3) Criptococose por *C. gattii*, sob a forma de surtos em animais e humanos (LAZERA *et al.*, 2005).

No Brasil, os dados sobre essa micose são conhecidos a partir de análises de série de casos, diagnosticados em alguns centros regionais ou por meio de dados indiretos obtidos no programa de AIDS. A criptococose apresenta-se como a segunda causa de mortalidade entre as micoses sistêmicas e possui, aproximadamente, letalidade na faixa de 45% a 65% (COUTINHO *et al.*, 2002).

O diagnóstico laboratorial é constituído principalmente de: pesquisa direta do agente em fluídos biológicos, pesquisa de antígeno capsular criptocócico, cultura e exame anatomopatológico. A coleta do líquido cefalorraquiano (LCR), é a principal ferramenta no diagnóstico precoce da infecção criptocócica de sistema nervoso central (SNC), recomendada em todos os pacientes imunossuprimidos com suspeita de infecção do sistema nervoso central ou com criptococose comprovada em algum órgão ou sítio corporal ou por hemocultura.. O exame direto do LCR em tinta da China é um exame útil e rápido para o diagnóstico da meningite criptocócica e é positiva em mais que 80% dos pacientes com AIDS, geralmente em fase avançada de doença e com elevada carga fúngica. Além do mais, é um exame dependente da experiência do microbiologista, e existem relatos na literatura de falso negativo em 20-30% dos resultados em infecções por *C.neoformans* ou *C.gattii* com cápsula deficiente ou devido à baixa carga fúngica do agente no líquido, principalmente nos casos iniciais, quando o diagnóstico é fundamental (BEYENE *et al*, 2013).

Recentemente, a Food and Drug Administration (FDA) aprovou uma inovadora técnica para detecção de antígenos criptocócicos, baseada na técnica de imunocromatografia, denominada Lateral Flow Assay (LFA) (Immuno-Mycologics Inc, Norman, Oklahoma). Este método apresenta um custo menor que qualquer outra técnica para detecção de antígenos e tem sido recomendada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para o diagnóstico precoce da meningite criptocócica em pacientes infectados pelo HIV (WHO, 2011).

A OMS tem recomendado o uso de detecção de antígenos em pacientes infectados pelo HIV, que apresentem CD4 baixo e sejam assintomáticos do ponto de vista neurológico (RAJASINGHAM *et al*, 2012). Esta estratégia permite identificar precocemente pacientes com doença criptocócica em estágio subclínico (WHO, 2011). Recentemente, a técnica de LFA tem sido validada no escopo dessa estratégia de *screening*, facilitando sua aplicação na prática clínica (RUGEMALILA *et al*, 2013).

Os agentes antifúngicos disponíveis para tratamento da criptococose podem ser classificados em três grupos, com base em seus mecanismos moleculares de ação: alteração da função de barreira da membrana mediante interação com o ergosterol, observado em polienos como a Anfotericina B; inibição da síntese de DNA ou RNA pelos análogos de nucleosídeos, como a flucitosina; inibição da biossíntese do ergosterol, pelos inibidores da enzima 14 α -demetilase, observado nos azóis, como Fluconazol, Voriconazol, Itraconazol e Pozaconazo (VANDEN BOSSCHE, 1997, VANDEN BOSSCHE *et al.*, 1998).

O tratamento da criptococose baseia-se na administração de anfotericina B associada a flucitosina na fase de indução, seguida de fluconazol ou itraconazol na fase de manutenção e supressão (PERFECT *et al.*, 2010 ; CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE, 2008).

Na fase meníngea, a terapêutica primária baseia-se na administração de anfotericina B associado a 5-Flucitosina, por duas semanas. A terapêutica alternativa baseia na administração da Anfotericina B durante 14 dias depois Fluconazol durante 8 a 10 semanas (SILVESTRE *et al.*, 2008).

1.1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1.1. HISTÓRICO

Em 1894, foi descrito o primeiro caso de criptococose humana, por Otto Busse e Abraham Buschke, em uma mulher de 31 anos apresentando lesão na tíbia (KNOKE & SCHWESINGER, 1994). O microrganismo isolado foi cultivado para estudos comparativos com isolados subsequentes e denominado *Saccharomyces hominis*. No mesmo ano, Sanfelice isolou leveduras capsuladas em suco de pêsego fermentado e, no ano seguinte, demonstrou sua patogenicidade em animais de laboratório e denominou a espécie *S. neoformans* (CASADEVALL & PERFECT, 1998).

Curtis em 1895, denominou de *S. subcutaneus tumefasciens* uma levedura isolada de pacientes com tumor subcutâneo na base do triângulo de Scarpa e de abscesso da região lombar. Todos esses fungos foram depois identificados como semelhantes à levedura previamente descrita por Sanfelice (LACAZ *et al.*, 2002; LAZÉRA *et al.*, 2004).

Em 1901, Vuillemin demonstrou que o termo *Saccharomyces* era inadequado, pois não havia formação de ascósporos, nem fermentação nesses isolados, sugerindo tratar-se de um novo gênero, sendo denominando *Cryptococcus*. Em 1935, Benham estudou os isolados classificados como *Saccharomyces*, *Torula* e *Cryptococcus*, por meio de sua morfologia, patogenicidade e reatividade e fatores séricos, concluindo que todos pertenciam a um só gênero e espécie. Em seguida, Benham propôs a designação *Cryptococcus neoformans*, a qual se tornou definitiva (LAZÉRA *et al.*, 2004).

Sanfelice em 1895, isolou pela primeira vez *Cryptococcus* em animais, a partir de linfonodos de um bovino. Em 1901, Vuillemin e Klein isolaram o fungo de uma lesão pulmonar em suíno. No ano seguinte, descreveu-se o primeiro caso em equinos, com observação da levedura em tecido pulmonar. Os casos de criptococose em animais foram relatados esporadicamente até os anos 1950 e, somente em 1952, foi descrito o primeiro caso em gatos e, no ano seguinte, o primeiro em cães (JUNGERMAN & SCHWARTZMAN, 1972).

No final do século XIX, foram obtidos os primeiros isolados de *C. neoformans* em solo, madeira em decomposição, habitat de aves e, particularmente, excrementos de pombos, fundamentando o conceito de origem ambiental da infecção. O estudo de Emmons em 1955

marcou, porém, a relação saprobiótica de *C. neoformans* com matéria orgânica rica em excreta de aves, principalmente fezes secas de pombos. Outros habitats também foram descritos, como ninhos e solos contaminados, tornando-se evidente a distribuição cosmopolita e urbana do fungo e da micose (LAZÉRA *et al.*, 2000).

Na década de 1970, foram descritos dois tipos sexuais de *C. neoformans*, MAT α e MATa, que, sob determinadas condições laboratoriais, produzem hifas verdadeiras e basidiósporos férteis. Essa forma morfológica, no entanto, é considerada atípica e raramente é descrita em hospedeiros humanos e animais, sendo os blastoconídeos (forma assexuada) as células predominantemente isoladas no ambiente e na clínica (GAZZONI *et al.*, 2008; LIN, 2009).

Antes do surgimento da AIDS, a criptococose era considerada uma doença rara, estando relacionada a deficiências na imunidade celular, ocorrendo apenas em um pequeno percentual da população (KWON-CHUNG & BENNETT, 1992). A partir de então, com a pandemia da AIDS, bem como a utilização de fármacos imunossupressores, houve um aumento na incidência da criptococose, sendo a doença, atualmente, a quarta causa mais frequente de infecção oportunista em pacientes HIV positivos (CALVO *et al.*, 2001; PAPPALARDO & MELHEM, 2003; JARVIS & HARRISON, 2007; SHIRLEY & BADDLEY, 2009).

No Brasil, os primeiros relatos foram descritos por Carlos da Silva Lacaz e Floriano de Almeida (PAPPALARDO & MELHEM, 2003). Desde então, vários estudos epidemiológicos são realizados no País (LAZÉRA *et al.*, 2000; CALVO *et al.*, 2001; HORTA *et al.*, 2002; OHKUSU *et al.*, 2002; FERNANDES *et al.*, 2003; NISHIKAWA *et al.*, 2003; IGREJA *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2004; DELGADO *et al.*, 2005; TRILLES *et al.*, 2008).

1.1.2. AGENTE ETIOLÓGICO

a. *Cryptococcus neoformans*

C. neoformans é um fungo basidiomiceto dimórfico que apresenta uma fase em leveduriforme e uma filamentosa, isolado pela primeira vez em 1894 de amostras de suco de pêssago (LIU *et al.*, 2012). O estágio sexuado, filamentoso, com dois tipos sexuais α e a, foi descrito por Kwon-Chung(1976) recebendo o nome de *Filobasidiella neoformans* (NIELSEN *et al.*, 2003).

Diferenças bioquímicas, clínicas e epidemiológicas levaram à identificação de duas variedades: *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* e *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. Contudo, estudos filogenéticos demonstraram distinção e divergência entre as variedades *gattii* e *neoformans*, que constituem grupos monofiléticos distintos. Portanto, atualmente, são reconhecidas duas espécies dentro do “complexo *Cryptococcus*”: *Cryptococcus gattii* (antes *C. neoformans* var. *gattii*) e *Cryptococcus neoformans* (antes *C. neoformans* var. *neoformans*) (KWON-CHUNG *et al.*, 2002).

Os principais fatores de virulência relacionados a esse agente são: termotolerância a 37°C, produção de fenol-oxidase com produção de melanina e cápsula polissacarídica, e entre eles destaca-se o componente capsular de glucuroxilomanana que apresenta variação em sua estrutura, determinando quatro sorotipos: A, B, C e D, além do sorotipo híbrido AD (KWON-CHUNG & BENNETT, 1992).

A variabilidade genética também é identificada através de marcadores moleculares que discriminam 8 (oito) tipos moleculares (ou genótipos) predominantes. Assim, *Cryptococcus neoformans* corresponde a quatro genótipos: VNI, VNII, VNIII e VNIV com sorotipos A, AD ou D; e *Cryptococcus gattii* corresponde a outros quatro genótipos: VGI, VGII, VGIII e VGIV com sorotipos B ou C (BOECKHOUT *et al.*, 2001; LAZERA *et al.*, 2005; KIDD *et al.*, 2004; TRILLES *et al.*, 2008; MARTINS *et al.*, 2007).

Percebe-se a predominância dos casos de *C. neoformans* em indivíduos acometidos por criptococose e AIDS, quando comparado com aqueles que não apresentam AIDS. (LINDENBERG *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2009). Vale ressaltar ainda que, *C. gattii* também pode ser encontrado em pacientes com AIDS e *C. neoformans* pode ser visto em ambientes naturais onde geralmente se encontra *C. gattii* (FERNANDES *et al.*, 2000).

1.1.3. FATORES RELACIONADOS A VIRULÊNCIA

Os principais fatores de virulência dos agentes da criptococose são a presença de uma cápsula de polissacarídeos, a produção de melanina e a capacidade de se reproduzir na temperatura corporal de 37°C (GUEVARA-CAMPOS *et al.*, 2008).

A cápsula é o principal fator, pois seus polissacarídeos são responsáveis por inibir a fagocitose, consumir o sistema complemento, adsorver e neutralizar opsoninas e anticorpos protetores, podendo ainda inibir a migração leucocitária, induzir o espalhamento de L-

selectina, promover edema cerebral e desregulação na produção de citocinas (BIVANCO *et al.*, 2006; MENDES, 2009).

A melanina funciona como um antioxidante, protegendo o fungo da defesa oxidativa do hospedeiro, sendo também responsável por protegê-lo dos raios ultravioletas provenientes da luz solar e dificultar a farmacoterapia antifúngica (AMARO, 2006; MENDES, 2009). Para Melo e colaboradores (1993), a melanina é um polímero inerte, resistente à ação enzimática, não reconhecida por anticorpos.

Em condições fisiológicas, *C. neoformans* mantém sua curva de crescimento a 38-39°C e perde a viabilidade a 40°C, após 24h e *C. gattii*, possui um limite de 35°C e perde a viabilidade a 37°C(MENDES, 2009).

Outros fatores de virulência são relatados como a produção de manitol e prostaglandinas, fosfolipases, proteases, urease, Mating type, calcineurina, AMPc (monofosfato cíclico de adenosina), superóxido e dismutase (AMARO, 2006; PASA, 2011).

Fatores de Virulência

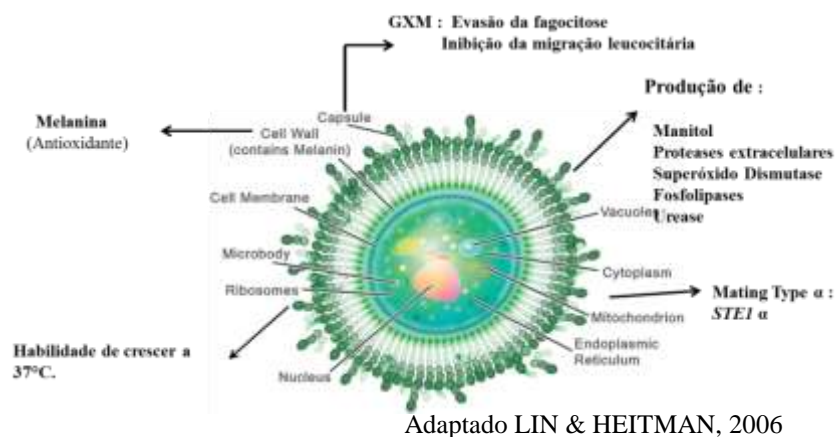


Figura 1: Fatores de Virulência

1.1.4. ECOLOGIA

C. neoformans apresenta distribuição cosmopolita e está presente em diversos habitats, como frutos, leite e fezes de seres humanos, madeira em decomposição, ambiente de morcego, detritos de vegetais, oco de árvores, insetos e diversas aves, principalmente em excretas de pombos, pois suas fezes são ricas em compostos nitrogenados (ureia e creatinina), responsáveis por favorecer sua sobrevivência e multiplicação (CONSENSO EM

CRIPTOCOCOSE, 2008; MENDES, 2009; PASA, 2011, KERN & BLEVINS, 1999). Além de permitir sua sobrevivência, estes substratos favorecem a formação de microfocos em centros urbanos, tornando cotidiana a exposição humana a esse patógeno, como por exemplo, sua presença na poeira doméstica (BRASIL, 2012).

C. neoformans resiste à dessecação, e a umidade excessiva restringe sua multiplicação. Sobrevive bem quando não está exposto diretamente a luz solar e quando está protegido de altas temperaturas, por isso que não causa infecção em aves, pois estas apresentam uma temperatura orgânica de 42°C (MENDES, 2009; PASA, 2011).

C. gattii têm uma maior prevalência em áreas tropicais e subtropicais, no entanto, estes estudos se restringiam a regiões com esse clima. Sendo assim, recentes pesquisas têm demonstrado que este fungo também apresenta distribuição cosmopolita, pois o mesmo vem sendo isolado de áreas de clima temperado, como foi o caso do surto em Vancouver (Canadá) (MENDES, 2009; PASA, 2011).

O habitat natural de *Cryptococcus gattii* foi inicialmente associado a restos vegetais de *Eucalyptus camaldulensis* na Austrália (ELLIS & PFEIFFER, 1990). Mas, essa associação específica entre *Cryptococcus gattii* e eucaliptos já não cabe, frente aos achados que se seguiram. No Brasil, *Cryptococcus gattii* foi encontrado em árvores tropicais como cássia, oiti, ficus, mulungu, “guetarda” (FORTES, 2001; LAZÉRA *et al.*, 1998; LAZÉRA *et al.*, 2000). Na Colômbia, em algodoeiro de praia (CALLEJAS *et al.*, 1998), no Canadá em árvores como elmo, cedro, pinheiro e carvalho, mas não encontrado em eucalipto (KIDD *et al.*, 2004).

Portanto, não há habitat ou associação específica de *Cryptococcus gattii* com árvores-hospedeiras, mas sim, padrões geográficos de ocorrência do fungo em madeira em decomposição, substrato cujas espécies, *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans* podem estar presentes em diferentes concentrações, pois segundo o Ministério da Saúde (2012), apesar das divergências entre essas duas espécies, ambas podem ocorrer isoladamente ou simultaneamente em um só habitat natural, relacionado com processos de decomposição da madeira.

No Brasil, estudos clínico-epidemiológicos mostram a importância da criptococose por *C. gattii* do SNC em adultos jovens de ambos os sexos e crianças nas regiões N e NE, com letalidade que varia entre 35% a 50% (CAVALCANTI, 1995; CORRÊA *et al.*, 1999;

NISHIKAWA *et al.*, 2003; OLIVEIRA, 2004). Surtos em animais foram descritos como pneumonia em cabras na Espanha (BARÓ *et al.*, 1998) e forma disseminada em psitacídeos de diferentes espécies em aviário no interior de São Paulo (RASO *et al.*, 2004). O maior surto foi registrado na ilha de Vancouver, Canadá, atingindo 38 casos humanos, entre 1999 e 2001, a maioria imunocompetente, sendo 58% do sexo masculino, 72% com lesão pulmonar, 26% com lesão de SNC e letalidade em torno de 10% (KIDD, *et al.*, 2004).

1.1.5. EPIDEMIOLOGIA

A criptococose é uma micose de alcance mundial e está relacionada principalmente com habitats de pombos em ambientes urbanos, o que torna a exposição humana um evento cotidiano (SIDRIM & ROCHA, 2004). Segundo Kern & Blevins (1999), aproximadamente 20% dos criadores de pombo sem antecedentes infecciosos são portadores de anticorpos anti-Cryptococcus.

Meningite criptocócica causa aproximadamente 15% da mortalidade relacionada com a AIDS anualmente (PARK *et al.*, 2009). A África Subsariana tem a mais alta carga, onde Cryptococcus é o agente mais comum de meningite no adulto (JARVIS *et al.*, 2010; RAJASINGHAM *et al.*, 2015), mas a América Latina é a terceira região do mundo com a maioria dos casos de meningite criptocócica com cerca de 54.400 casos anuais em 2008 (PARK *et al.*, 2009). Mais recentes 2015 estimativas de incidência de meningite criptocócica na América Latina são cerca de 10.000 casos por ano (VIDAL & BOULWARE, 2015)

Ainda não se têm conhecimento quanto a sua totalidade mundial, porém, sabe-se que sua incidência e prevalência têm aumentado significativamente com o surgimento dos transplantes e da AIDS, sendo esta última causada principalmente pelo *Cryptococcus neoformans* (MENDES, 2009; FERNANDES *et al.*, 2000).

A criptococose meníngea é a infecção fúngica mais comum no SNC, sendo também considerada a terceira principal complicação neurológica em pacientes HIV positivo (PINTO, 2010).

A associação dessa enfermidade com a AIDS apresenta uma taxa de letalidade bastante elevada, variando de 33% a 62,5%. Mas, com a introdução da terapia antirretroviral e esquemas profiláticos com antifúngicos, ocorreu uma redução dessa infecção em portadores de HIV. Esta infecção também acomete pacientes HIV negativos, como por exemplo,

transplantados, portadores de doenças autoimunes e portadores de malignidades, sendo que nesses casos a taxa de letalidade varia de 24,2% a 42% (PASA, 2011).

Segundo Pasa (2011) esta infecção ocorre com maior frequência em indivíduos do gênero masculino, algo em torno de 78%, sendo principalmente adultos. Contudo, crianças também são infectadas, como é o caso em áreas endêmicas (Norte e Nordeste do Brasil) (CAVALCANTI, 1995; CORRÊA *et al.*, 1999; NISHIKAWA *et al.*, 2003; OLIVEIRA, 2004). Segundo o consenso em criptococose (2008) a maior casuística desta infecção em crianças imunocompetentes foi relatada na região norte, no Estado do Pará. Guevara-Campos e colaboradores (2008) relataram a presença de meningoencefalite em duas crianças na Venezuela, sendo uma menina de sete anos e um menino de 11 anos de idade.

A doença já foi relatada em diversos estados do Brasil como Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Roraima, Amazonas, Piauí, Maranhão, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo e Rio Grande do Sul, sendo *Cryptococcus neoformans* prevalente nos estados do Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul e *Cryptococcus gattii* endêmico no Pará, Maranhão, Piauí e outros estados nordestinos, provocando doença em indivíduos imunocompetentes (AMARO, 2006; MENDES, 2009).

C. neoformans apresenta características epidemiológicas distintas de *C. gattii*, pois o primeiro tem caráter oportunista e é mais frequentemente isolado da habitats de pombos. *C. gattii* se comporta como patógeno primário em imunocompetentes, sendo considerado menos virulento por alguns autores (GUEVARA-CAMPOS *et al.*, 2008; PASA, 2011). Entretanto, o Consenso em criptococose (2008) adverte que em áreas endêmicas por *C. gattii* observa-se também associação deste patógeno com a AIDS, e por outro lado, *C. neoformans*, podendo causar infecção fatal em pessoas aparentemente normais.

C. neoformans var. grubii (sorotipo A) é o que apresenta maior distribuição mundial, já a variedade *neoformans* (sorotipo D) predomina em locais de clima temperado. *Cryptococcus gattii* é relatado principalmente em países de clima tropical e subtropical, especialmente Austrália, Índia, Sudeste da Ásia, partes da África, México, Brasil, Paraguai e Sul da Califórnia, sendo o sorotipo B mais prevalente que o C (AMARO, 2006).

1.1.6. PATOGENIA

A infecção pelos agentes da criptococose, *C.neoformans* e *C.gattii*, ocorre inicialmente pela inalação dos propágulos dispersos no ar, vindo de focos ou habitats presentes no ambiente, relacionados a excretas secas de aves e madeira em decomposição, poeira, solo, alojando-se nos pulmões do hospedeiro, podendo causar sintomas quase imperceptíveis em indivíduos imunocompetentes (BOTTIS & HULL, 2010; LIU *et al.*, 2012, Lazera *et al* 2005). Infecções no sistema circulatório tendem a ocorrer com a imunodeficiência de pacientes que já possuíam a infecção nos pulmões, dessa forma, quando ocorre essa deficiência, há uma reativação desses propágulos ou esporos nos pulmões que passam para o sistema circulatório, onde devido ao tropismo pelo sistema nervoso central, o patógeno então tende a atravessar a barreira hematoencefálica, instalando-se ali e causando meningite fúngica (HULL & HEITMAN, 2002; LIU *et al*, 2012).

Em indivíduos imunocompetentes estes agentes pode causar nos pulmões um infiltrado que tende à cura espontânea, mas em alguns, cerca de 18%, se não for tratado, evolui para uma disseminação. Os pacientes que apresentam doença de base (AIDS, linfoma de Hodgkin, diabetes mellitus, etc.), ou seja, pacientes com sistema imune debilitado, devem ser tratados o mais rápido possível, pois do contrário ocorre disseminação (KERN & BLEVINS, 1999). Alguns autores acreditam que nos pacientes imunocompetentes, a manifestação pulmonar é exuberante, com tratamento satisfatório e de bom prognóstico. Já em imunocomprometidos, o quadro clínico é generalizado, sem resposta satisfatória ao tratamento clássico, e geralmente apresenta uma evolução fatal (BIVANCO *et al.*, 2006).

Diversos estudos de casos clínicos mostraram que 50% dos pacientes já apresentam no início da manifestação clínica o acometimento do SNC, causando meningoencefalite (GUEVARA-CAMPOS *et al.*, 2008). Não se sabe ao certo a que se deve esse neurotropismo, mas se fala em três possíveis hipóteses.

A primeira hipótese, diz que se deve ao fato do SNC possuir substratos específicos para o crescimento e proliferação do fungo. Esses substratos são catecolaminas (dopamina, noradrenalina e adrenalina), substâncias difenólicas utilizadas por este fungo para produção de melanina, através de enzima característica dos agentes da criptococose, mas não presente em outros *Cryptococcus* e leveduras, denominada difenoloxidase, do grupo das lacases

(CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE, 2008; GUEVARA-CAMPOS *et al.*, 2008; PINTO, 2010).

A segunda hipótese sugere que o SNC funciona como local de fuga à vigilância imunológica do hospedeiro, pois o cérebro e a barreira hematoencefálica não apresentam uma resposta imune vigorosa (PINTO, 2010). Portanto, existem estudos experimentais que relatam a diminuição da eficácia do linfócito T no tecido cerebral quando comparados com outros órgãos, como o pulmão. Existindo em paralelo um atraso no desenvolvimento da resposta inflamatória no tecido cerebral (CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE, 2008).

E uma terceira hipótese sugere que os neurônios tenham receptores específicos que podem atrair *Cryptococcus* de forma mais eficiente do que células de outros órgãos (PINTO, 2010).

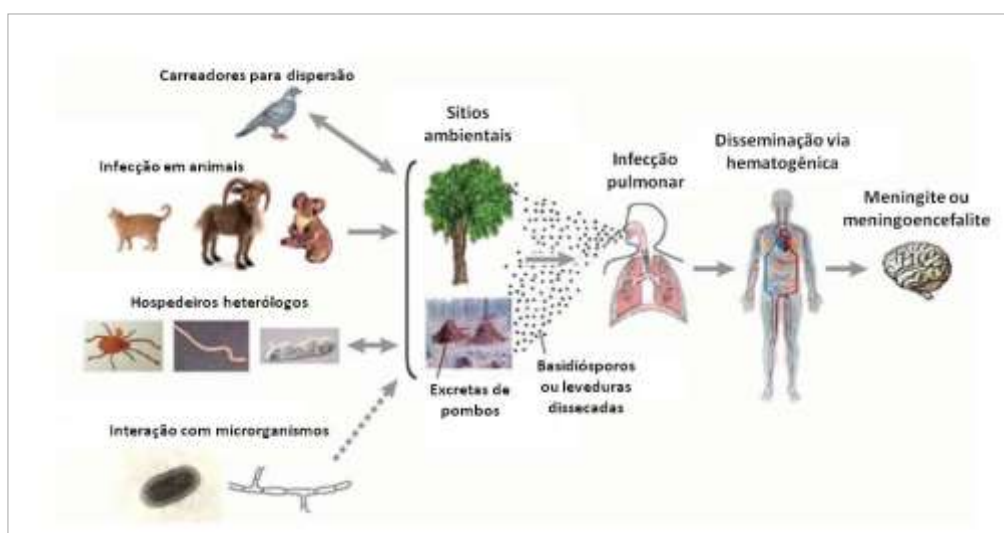


Figura 2. Criptococose. Propágulos infectivos do fungo presentes em sítios ambientais podem se dispersar por carreadores naturais, ou infectar diversos animais, permanecer internalizados em hospedeiros heterólogos ou ainda interagir com outros microrganismos presentes no ambiente. Na infecção humana esses propágulos são inalados e alojam-se inicialmente nos pulmões. Após a disseminação via hematogênica, ocasionam meningite ou meningoencefalites. LIN & HEITMAN, 2006

1.1.7. ASPECTOS CLÍNICOS

Clinicamente a criptococose varia desde formas assintomáticas e oligossintomáticas até quadros graves com a presença de meningoencefalite e ou criptococemia com doença disseminada (JUFFERMANS *et al.*, 2003). São fundamentais para a determinação do quadro

clínico e gravidade da doença: o *status* imunitário do hospedeiro; a variedade e virulência do agente e o tamanho do inóculo (POWERDELY *et al.*, 1994; MITCHELL & PERFECT, 1995)

Considerando o grau de imunodeficiência do hospedeiro, sabe-se que as manifestações clínicas associadas à criptococose variam entre pacientes com e sem infecção pelo HIV. Em pacientes soropositivos para o HIV, os sítios de infecção contém, em geral elevada quantidade de microrganismos, com discreta resposta inflamatória. A doença neste grupo de pacientes é, portanto, caracterizada pela alta frequência de culturas positivas de sangue e urina e maior envolvimento de sítios extraneurais; presença de grande número de células fúngicas com poucas células inflamatórias no líquido cefalorraquiano e uma alta incidência de doença sintomática e recidivas pós-tratamento. (DISMUKES, 1998).

Os sítios mais acometidos pela doença são SNC, pulmões, pele, próstata e olho. Por outro lado, pacientes infectados pelo HIV com doença avançada e naqueles com imunodepressão grave induzida por glicocorticóides podem também ser afetados adrenais, coração, fígado, linfonodos, articulações e rins (MITCHELL & PERFECT, 1995; RAZAVI *et al.*, 2000; JUFFERMANS *et al.*, 2003).

A meningoencefalite criptocócica é a manifestação mais frequente da doença criptocócica (DISMUKES *et al.*, 1988; ANTINORI *et al.*, 2000). Utiliza-se o termo meningoencefalite haja vista que na maioria dos casos há envolvimento do parênquima cerebral subjacente às meninges comprovado por estudos histopatológicos (ANTINORI *et al.*, 2000; KING *et al.*, 2002; BRETON *et al.*, 2002; ANGSTWURM *et al.*, 2004).

Em pacientes com HIV, a meningoencefalite criptocócica aparece na maioria dos casos em pacientes com contagem de células CD4 < 100 cel/mm³ e tem sido descrita como doença definidora de AIDS em aproximadamente 60% dos pacientes (DARRAS-JOLY *et al.*, 1996; ANTINORI *et al.*, 2000; ADEYEMI *et al.*, 2004; DROMER *et al.*, 2004).

A apresentação clínica da doença é bastante variável, podendo-se apresentar de forma insidiosa ou aguda em pacientes com AIDS (KOVACS *et al.*, 1985; ZUGER *et al.*, 1986; ANGSTWURM *et al.*, 2004).

A maioria dos pacientes apresentam sinais e sintomas de meningite subaguda ou meningoencefalite como cefaleia, febre, letargia, coma, tonteira, sonolência, irritabilidade, alteração de comportamento e do nível de consciência num intervalo de aproximadamente

duas a quatro semanas da data do diagnóstico (DISMUKES *et al.*, 1988; ANTINORI *et al.*, 2000). A maioria dos pacientes tem mínima ou nenhuma rigidez de nuca. Papiledema é notado em mais de um terço dos casos e paralisia dos nervos cranianos em aproximadamente um quinto. No entanto, muitos pacientes infectados pelo HIV podem não apresentar esses achados clássicos (DIAMOND ,2000).

1.1.8. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

A criptococose, nas fases avançadas da doença, é uma micose de fácil diagnóstico, pois apresenta grande quantidade de elementos fúngicos no líquido e nas lesões, presença de cápsula característica, diagnóstico imunológico e coloração tecidual específica (CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE, 2008).

Várias metodologias têm sido utilizadas, dentre elas o exame direto com tinta da china para observação de leveduras capsuladas no espécime clínico: o cultivo do espécime em meio agar Sabouraud 2% e meio agar com sementes de níger (meio NSA) (AMARO, 2006).

O exame micológico direto do material suspeito (fluido cérebro-espinhal, tecidos, escarro, urina, raspados e aspirados de lesões cutâneas) é submetido à coloração com tinta nanquim (Tinta da China) e levado ao microscópio óptico, onde se identificam as leveduras com um nítido halo claro em torno da célula, o qual representa a cápsula não corada (AMARO, 2006; MENDES, 2009). No líquido, o exame direto apresenta uma sensibilidade em torno de 80%, especialmente nos pacientes com AIDS, e em torno de 50% nos pacientes não infectados pelo HIV (CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE, 2008).

No cultivo, pode ser utilizada a maioria dos meios empregados na rotina micológica com exceção daqueles contendo cicloheximida, pois esta substância inibe o crescimento de *Cryptococcus*. O meio NSA contém várias substâncias, entre elas compostos fenólicos provenientes do extrato de *Guizotia abyssinica*, que por sua vez funcionam como substrato para difenoloxidase, enzima esta utilizada por *C. neoformans* e *C. gattii* na produção de melanina, substância responsável pela coloração marrom das colônias nos meios de cultura (AMARO, 2006).

Uma vez obtida levedura capsulada sem hifa ou pseudo hifa e produtora de melanina , o meio CGB é utilizado para diferenciação das espécies : *C. neoformans* e *C. gattii* . No caso de *C. gattii*, ele consegue crescer neste meio, pois é resistente a L-canavanina. Seu

crescimento é evidenciado pela mudança de coloração do meio, pois este microrganismo utiliza a glicina como única fonte de carboidrato e nitrogênio, e assim gerando amônia, substância responsável por alcalinizar o meio e mudar sua cor de amarelo para azul cobalto (CGB positivo). *C. neoformans* é inibido pela L-canavanina, não sendo capaz de crescer ou utilizar a glicina do meio, mantendo assim sua cor original (CGB negativo) (MELO *et al.*, 1993; MENDES, 2009; SIDRIM & ROCHA, 2004).

A cultura é considerada padrão ouro, pois a mesma se apresenta positiva em 89% nos pacientes HIV negativos e 95% a 100% nos pacientes com AIDS (CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE, 2008).

Na prova da uréia, a mesma é hidrolisada pela urease, enzima produzida pela levedura do gênero *Cryptococcus*, resultando em mudança de coloração do meio de amarelo para rosa intenso. Essa prova também pode dar positiva para *Trichosporon spp.*, *Rhodotorula spp.* e *Candida lipolytica*, no entanto, suas características bioquímicas e morfológicas são distintas do *Cryptococcus spp.* (AMARO, 2006).

A pesquisa de antígenos circulantes utilizando métodos sorológicos pode ser feita no início da infecção, quando os sintomas são escassos ou inespecíficos. As principais metodologias são os testes de aglutinação em látex e os imunoenzimáticos (PASA, 2011). Apesar da alta sensibilidade e especificidade desses métodos, podem ocorrer falsos positivos em reações cruzadas com fator reumatóide, *Trichosporon* e contaminação, podendo também ocorrer testes falsos negativos associados a baixos títulos de antígenos, presença de imunocomplexos, efeito prozona e em casos onde a infecção é constituída por leveduras acapsuladas ou com pouca cápsula (CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE, 2008).

A OMS tem recomendado recentemente o uso de detecção de antígenos em pacientes infectados pelo HIV através da pesquisa de Antígeno Criptocócico (CrAg) utilizando o Lateral Flow Assay (LFA), que apresentem CD4 baixo e sejam assintomáticos do ponto de vista neurológico (RAJASINGHAM *et al.*, 2012). Esta estratégia permite identificar precocemente pacientes com doença criptocócica em estágio subclínico (WHO, 2011). Tem sido utilizada em vários estudos, como forma de *screening* e diagnóstico, facilitando sua aplicação na prática clínica. Contudo têm-se obtidos resultados consideráveis uma vez que realizado em vários tipos de espécimes biológicos, dentre eles, sangue, líquido (CSF) e urina (RUGEMALILA *et al.*, 2013).

O CrAg/LFA (Imuno-Mycologics, Norman, OK, EUA) é um ensaio imunocromatográfico de fluxo lateral e foi projetado para atender a dois critérios essenciais para o diagnóstico: 1) o teste é capaz de detectar CrAg de todos os sorotipos de *Cryptococcus*, e 2) o teste pode ser usado em configurações com a mínima ou nenhuma infra-estrutura (KOZEL & BAUMAN, 2012).

O CrAg/LFA utiliza anticorpos monoclonais que permite a qualidade do reagente e desempenho consistentes. A LFA utiliza uma combinação de dois anticorpos monoclonais. Um anticorpo monoclonal é altamente reativo com CrAg dos sorotipos A, B, e C; o segundo monoclonal é altamente reativo com CrAg dos sorotipos A e D. Usados em conjunto, os anticorpos são altamente reativos com CrAg em toda a gama de sorotipos criptocócicas, uma vantagem quando comparado com CrAg látex ou EIA(VIDAL & BOULWARE, 2015).

Detecção de CrAg, é a ferramenta diagnóstica mais sensível para criptococose (MAKADZANGE & MCHUGH, 2014; PERFECT & BICANIC, 2014). Detecção de CrAg no soro e CSF por teste de aglutinação em látex (CrAg-látex) ou imunoenaios enzimáticos (EIA) já está disponível há mais de 35 anos (PERFECT & BICANIC, 2014). A maioria dos estudos comparativos utilizam culturas como padrão-ouro. Entre as pessoas com AIDS com meningite, CrAg deve ser avaliado sempre, inclusive quando a tinta da China não consegue identificar leveduras. Por exemplo, em Uganda, a causa mais comum de meningite entre as pessoas infectadas pelo HIV com uma tinta da China negativo ainda é *Cryptococcus* (BOULWARE *et al.*, 2014).

Embora o CrAg látex tenha um bom desempenho quando comparado com EIA e da cultura, a sua principal limitação é que o látex é um teste manual pesado com a subjetividade na interpretação do resultado. CrAg-látex e EIA também requer equipamentos de laboratório e refrigeração de reagentes, tornando-o inadequado para uso em ambientes sem infra-estrutura mínima (MAKADZANGE & MCHUGH, 2014). A necessidade de refrigeração aumenta drasticamente o custo do teste em ambientes de recursos limitados. CrAg látex tem sensibilidade reduzida para CrAg do sorotipo C (ou seja, *C. gattii*), e EIA mostra sensibilidade reduzida para CrAg do sorotipo C e D. taxa de falsos positivos é inferior a 1% e, em geral é explicada por questões técnicas ou outras infecções ou a contaminação (por exemplo, *Trichosporon beigeli*, *Capnocytophaga canimorsus*, e *Stomatococcus mucilaginosus*). Resultados falso-negativos podem ocasionalmente ser observado com

infecções precoces quando há baixa carga fúngica, com fenômeno pró-zona, e com organismos mal encapsulados (ANTINORI, 2013; PERFECT & BICANIC, 2014).

Também é importante que atrelado aos achados clínico-laboratoriais seja realizados exames de imagem, como radiografia, tomografia computadorizada e ressonância magnética, pois os mesmos possibilitam que o clínico constate o tipo e a extensão da lesão (PASA, 2011).

Para o Ministério da Saúde (2010) o diagnóstico dessa enfermidade é feito de forma clínica e laboratorial, sendo sua confirmação feita pelo emprego do exame direto com tinta da china, que permite a visualização de da cápsula a presença de gemulação nos materiais clínicos. Esta técnica é consagrada para o diagnóstico das meningites criptocócicas através do exame do LCR (Líquido Cefalorraquidiano), podendo também isolar este agente da urina ou de supurações, em ágar Sabouraud 2%. A sorologia, a histopatologia e a radiografia de tórax podem ajudar no diagnóstico, e esta última pode ser ou não utilizada para confirmação do diagnóstico (BRASIL, 2010).

1.1.9. TRATAMENTO

Atualmente, a farmacoterapia antifúngica teve grandes avanços, mas mesmo assim, o tratamento da criptococose é considerado muito difícil e vários esquemas terapêuticos têm sido empregados na tentativa de resolver o problema (MENDES, 2009).

O tratamento pode ser dividido em três fases, indução, consolidação e manutenção. A fase de indução tem como finalidade reduzir ou negatizar a carga fúngica com período mínimo de duas semanas. Na fase de consolidação busca-se manter a negatização e alcançar a normalização dos parâmetros clínico-laboratoriais por pelo menos oito semanas. E a fase de manutenção, também denominada de fase supressão, depende do estado imunológico do paciente e compreende um período mínimo de um ano (CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE, 2008; PASA, 2011).

A farmacoterapia atual da criptococose compreende a anfotericina B e suas formulações lipídicas, flucitosina, fluconazol, itraconazol e voriconazol (PASA, 2011).

A anfotericina B é um antibiótico do grupo dos poliênicos e sua atividade farmacológica depende principalmente de sua ligação com ergosterol na membrana da célula fúngica. Essa interação parece formar poros ou canais que aumentam a permeabilidade e

permite o extravasamento intracelular, causando a destruição celular (GOODMAN & GILMAN, 2012).

Esta droga é considerada como terapia de escolha para o tratamento da meningite criptocócica, podendo também ser utilizada nas outras formas da criptococose, porém, essa droga apresenta diversos efeitos colaterais, entre eles, a nefrotoxicidade, fato este que limita seu uso. Mas, novas formulações lipídicas (lipossomal, dispersão coloidal e complexo lipídico) já estão disponíveis na clínica, pois as mesmas apresentam menor toxicidade (MENDES, 2009).

A flucitosina é uma pirimidina fluorada que prejudica a síntese de DNA na célula fúngica. Sua ação é seletiva para estas células, pois as células de mamíferos não tem a citosina desaminase, enzima responsável por desencadear o metabolismo da flucitosina (GOODMAN & GILMAN, 2012). O uso desse fármaco deve ser monitorado, pois o mesmo é tóxico para medula óssea. Além disso, deve ser sempre utilizado em associação com outro fármaco, pois isoladamente pode causar resistência (MENDES, 2009).

O fluconazol e o itraconazol pertencem a classe dos triazólicos, fármacos envolvidos na inibição da 14α -esterol desmetilase, enzima responsável pela biossíntese do ergosterol da célula fúngica, comprometendo assim sua fluidez, estabilidade, crescimento e divisão (BRODY *et al.*, 2006; GOODMAN & GILMAN, 2012).

Na meningoencefalite, fungemia, doença disseminada e casos graves, inicia-se a fase de indução com anfotericina B desoxicolato, na dose de 0,7-1,0 mg/Kg/dia, associada a flucitosina, na dose de 100mg/Kg/dia por um período mínimo de duas semanas (para HIV soropositivos), por quatro semanas (para imunocompetentes) e por seis semanas (para pacientes com criptococomas). Em seguida, a fase de consolidação com fluconazol, na dose de 400 mg/dia por no mínimo oito semanas, podendo estender de seis a dezoito meses em casos de criptococomas (PASA, 2011).

As associações medicamentosas tem mostrado sua importância, como é o caso da anfotericina B com flucitosina, associação esta que permite a diminuição da dose da anfotericina sem causar prejuízo terapêutico e conseqüentemente redução de seus efeitos colaterais (MENDES, 2009). Entretanto, a flucitosina foi retirada do mercado brasileiro há mais de 12 anos, sendo assim, a mesma pode ser substituída por fluconazol, na dose de 800 mg/dia, seguido pelo aumento da dose de fluconazol para 800 mg/dia na fase de consolidação ou anfotericina B por seis a dez semanas (BRASIL, 2006; PASA, 2011).

Nos transplantados, utiliza-se a anfotericina B lipossomal na dose de 3,0-4,0 mg/Kg/dia e na fase de consolidação utiliza o fluconazol na dose de até 800mg/dia. Nos casos de criptococose pulmonar utiliza-se o fluconazol, na dose de 400 mg/dia, por seis a doze meses (PASA, 2011).

Segundo o Consenso em criptococose (2008) o tratamento da criptococose pulmonar em pacientes sintomáticos deve ser sempre recomendado e nos casos assintomáticos ou oligoassintomáticos ou com nódulo ressecado, pode-se adotar uma prática não farmacológica, instituindo apenas o acompanhamento clínico e laboratorial. No entanto, sempre avaliando a possibilidade de haver disseminação para outros sítios.

Para o Ministério da Saúde (2010), a escolha da farmacoterapia depende da forma clínica. Na criptococose disseminada o esquema terapêutico de primeira escolha é a anfotericina B, na dose de 1mg/Kg/dose, IV, não ultrapassando 50mg/dia, durante seis semanas. Em caso de toxicidade utiliza-se a formulação lipídica da anfotericina, na dose de 3 a 5 mg/Kg/dia e na fase de consolidação, utiliza-se o fluconazol, na dose de 200 a 400mg/dia, VO ou EV, por aproximadamente seis semanas, ou associado à anfotericina B, até a negatificação da cultura.

Nas formas pulmonares ou com sintomas leves, utiliza-se o fluconazol, na dose de 200 mg/dia, por seis a doze meses, ou o itraconazol, na dose de 200 mg/dia, por seis a doze meses (BRASIL, 2010).

Mesmo em tratamentos eficazes é comum o advento de recidivas, e quando se trata de pacientes com AIDS, a média de sobrevida desses pacientes após o diagnóstico de criptococose é de apenas seis meses (KERN & BLEVINS, 1999).

A maioria dos isolados clínicos de *C. neoformans* é susceptível ao fluconazol e ao itraconazol e cerca de 50% dos isolados é resistente a flucitosina. Alguns estudos brasileiros já demonstraram a existência de isolados menos susceptíveis ao itraconazol e ao fluconazol (PAPPALARDO & MELHEM, 2003). De forma geral, *C. gattii* apresenta menor suscetibilidade in vitro do que *C. neoformans*, fato que pode estar relacionado à maior dificuldade de tratamento da criptococose causada por esta espécie (TRILLES *et al.*, 2004).

Em virtude da dificuldade de tratamento dessa enfermidade bem como o surgimento de cepas de *C. neoformans* resistentes ao fluconazol, se faz necessário protocolos terapêuticos (MENDES, 2009).

O uso na rotina de soro ou plasma na triagem antigenemia em adultos virgens de tratamento com CD4 <100 células/ mm³, seguido por tratamento com fluconazol, pode reduzir o desenvolvimento de meningite criptocócica e melhorar a sobrevivência. A OMS recomenda o tratamento de preferência para CrAg/LFA positivo subclínico com fluconazol 400 mg duas vezes por dia durante duas semanas, seguido de 400 mg por dia durante oito semanas (OMS, 2011).

Esta recomendação da OMS funciona melhor para pessoas com baixa carga de infecção (CrAg título <1: 160). A necessidade de profilaxia secundária não é clara, mas para cargas mais elevadas de infecção (ou seja, Crag títulos > 1: 160), fluconazol 200 mg / dia até CD4 > 200 células / mm³ é aconselhável. Esta estratégia de rastreio e tratamento é altamente eficaz em termos de custos, e a OMS recomendou entre adultos infectados pelo HIV que não recebem terapia antirretroviral eficaz onde a prevalência de antigenemia criptocócica é ≥ 3%. Isso geralmente é qualquer um com CD4 <100 células / mm³ em todo o mundo (WHO, 2011; VIDAL & BOULWARE, 2015).

1.2. JUSTIFICATIVA

Apesar da introdução das terapias antirretrovirais altamente eficazes, a meningite criptocócica continua causando elevada mortalidade e morbidade em pacientes infectados pelo HIV no nosso meio. Esta doença oportunista apresenta-se principalmente em pacientes com diagnóstico tardio da infecção pelo HIV, má adesão e/ou falha ao tratamento antirretroviral. No Brasil, a letalidade de pacientes infectados pelo HIV com meningite criptocócica, na era HAART, é de aproximadamente 30-60% (VIDAL *et al*, 2012).

Portanto, é necessária a avaliação de metodologias diagnósticas de fácil realização e interpretação e baixo custo, como o Lateral Flow Assay (LFA). Neste cenário, o presente estudo pretende conhecer a prevalência da detecção do antígeno criptocócico, utilizando o CrAg/LFA, em pacientes infectados pelo HIV/AIDS.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

- Avaliar a antigenemia criptocócica através do CrAg/LFA em pacientes com HIV/AIDS

2.2. Específicos

- Determinar a prevalência de antigenemia criptocócica utilizando CrAg/LFA em soro e urina de pacientes com HIV/AIDS sem uso prévio de terapia antirretroviral

- Determinar a prevalência de antigenemia criptocócica utilizando CrAg/LFA em soro e urina de pacientes com HIV/AIDS com uso prévio de terapia antirretroviral

- Determinar a sensibilidade/especificidade do CrAg/LFA em diferentes espécimes biológicos(Urina, Sangue)

- Descrever perfil epidemiológico dos pacientes incluídos no estudo

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. DESENHO E ÁREA DO ESTUDO

Foi realizado um estudo descritivo transversal. Foram coletadas amostras de sangue e urina de pacientes com diagnóstico de HIV/AIDS. As informações adicionais foram obtidas de prontuários médicos. Os Kits de CrAg/LFA, foram fornecidos através de parceria com a Fundação Oswaldo Cruz- Fiocruz/RJ.

O presente estudo, foi realizado nas condições de rotina do laboratório do setor de microbiologia do Instituto de Doenças Tropicais Natan Portella.

3.2. CASUÍSTICA

A casuística do estudo foi composta por 100 pacientes com diagnóstico de HIV/AIDS, que aceitaram participar do estudo, no período de janeiro de 2015 a agosto de 2015.

3.3. CRITÉRIO DE INCLUSÃO:

- Pacientes com diagnóstico confirmado de infecção pelo HIV, segundo o algoritmo do Ministério da Saúde do Brasil.
- Paciente HIV positivo segundo os critérios do Ministério da Saúde internados no IDTNP, no período de Janeiro a Agosto de 2015.

3.4. CRITÉRIO DE EXCLUSÃO

- História prévia de doença criptocócica.

3.5. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

A pesquisa foi iniciada após a aprovação no Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos-CEP/FACIME Protocolo, tendo por referência as diretrizes da Norma 466/12 do Conselho Nacional de Saúde. O projeto de pesquisa, intitulado “Prevalência do antígeno criptocócico utilizando Lateral Flow Assay (LFA) no *screening* de pacientes com HIV/AIDS”, foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual do Piauí, credenciado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) – Conselho

Nacional de Saúde (CNS) / Ministério da Saúde (MS) para análise quanto aos princípios éticos. Seguiram-se as normas da ética para estudos clínicos com seres humanos, de acordo com a norma nº 466/16 do CNS. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual do Piauí em 09 de dezembro de 2015, sob CAAE nº 39218214.6.0000.5209, parecer 922.355(ANEXO).

3.6. INSTRUMENTO DA COLETA DE DADOS CLÍNICOS-EPIDEMIOLÓGICOS

Os dados foram coletados a partir da análise de prontuários, os resultados laboratoriais através dos anexos aos prontuários, utilizando como instrumento a ficha de coleta de dados. (APÊNDICE). Foi mantida a confidencialidade sobre os dados e identidade dos pacientes.

Foram avaliadas as seguintes variáveis: i) idade, sexo, município de residência; hipótese diagnóstica de entrada no hospital, sintomas iniciais, uso de Terapia Antirretroviral ii) resultados laboratoriais de CrAg/LFA no sangue e urina, sorologia para HIV, contagem de CD4; iii) Conduta do caso.

3.7. MÉTODOS DE CONFIRMAÇÃO DIAGNÓSTICA

Todos os pacientes que atendiam os critérios de inclusão, e concordaram em participar, foram submetidos a punção venosa, em antebraço, de 10 ml de sangue, para realização de CrAg/LFA em soro. Para o exame da urina, foram entregues potes plásticos para que os participantes pudessem coletar a amostra de urina. O líquido também foi coletado nos pacientes que foram CrAg/LFA positivos no sangue e urina. Para realização da punção lombar, o médico fez anestesia local e com agulha própria retira o líquido.

A Figura 3 mostra o mecanismo de CrAg/LFA. O LFA usa dois anticorpos monoclonais conjugados de ouro impregnados em uma tira de teste imunocromatográfico. Se o antígeno criptocócico está presente num espécime, anticorpos, conjugados com ouro em suspensão ligam-se ao antígeno. Os complexo ouro-anticorpo-Crag migra por ação capilar, interage com os anticorpos monoclonais imobilizados contra CrAg, e forma uma linha vermelha (VIDAL & BOULWARE, 2015)

O kit Immy CrAg/LFA contém 50 tiras de teste CrAg /LFA, de diluente de amostra, titulação diluente, e de controle positivo. O kit pode ser armazenado à temperatura ambiente por aproximadamente 2 anos.

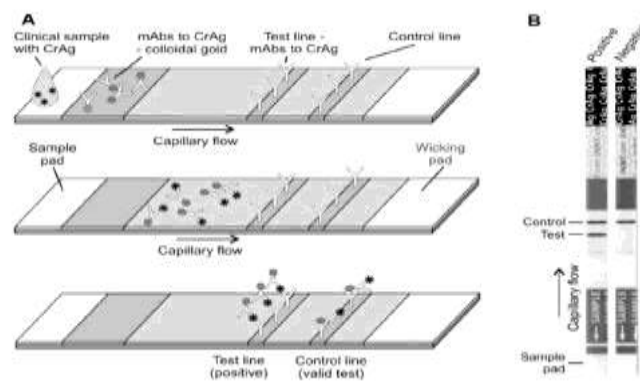


Figura 3.A. Operação esquemática ilustrando o fluxo de análise imuno-cromatografica de lateral para a detecção de antígeno criptocócico. B. Imagens de ensaio de escoamento lateral, positivo e negativo. (KOZEL & BAUMAN, 2012).

O teste requer cinco passos simples mostrada na Figura 3. A presença de duas linhas (linhas de teste e de controle), independentemente da intensidade da linha de teste indica um resultado positivo. Uma linha de controle único indica um resultado negativo. Se a linha controle não aparecer, os resultados são inválidos e o teste deve ser repetido. Para obter resultados semi-quantitativos, os títulos do paciente são relatados como a maior diluição que produz um resultado de teste positivo (KOZEL & BAUMAN, 2012).

O CrAg LFA foi aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) para uso com amostras de soro e CSF. Além disso, o teste recebeu a Conformidade Europeia (CE) para marcação de soro, plasma e CSF. A marca CE indica que o ensaio está em conformidade com os requisitos essenciais das Diretivas Europeias. No Brasil, o teste pode ser utilizado com soro, plasma e CSF (VIDAL & BOULWARE, 2015).

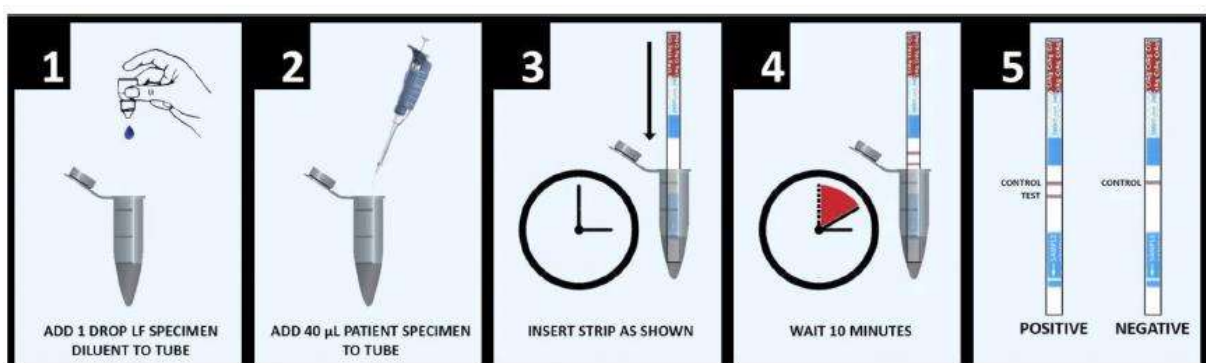


Figura 4. Cinco passos simples para executar a detecção do antígeno criptocócico utilizando LFA. Passo 1: adicionar uma gota de diluente a um tubo. Etapa 2: adicionar de 40 mL (1 gota) de amostras de pacientes para o tubo. Passo 3: inserir a tira de LFA para dentro do tubo. Passo 4: incubar durante 10 minutos. Passo 5: interpretar os resultados. (PELFREY & BAUMAN, 2012).

Os resultados positivos foram comunicados às equipes que assistem aos pacientes, no entanto.

3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

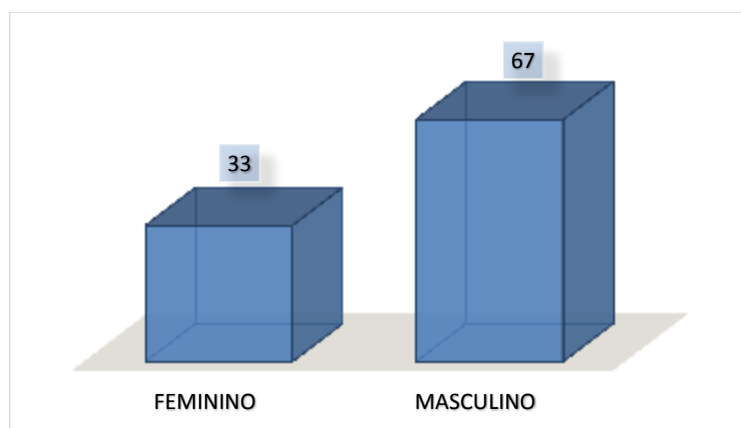
Os dados foram armazenados e organizados em planilha Excel 2007 e utilizado o programa Epi Info 7.1 para análise estatística.

Foram descritas as frequências das variáveis categóricas e as médias ou medianas das variáveis contínuas, com suas respectivas medidas de dispersão. Considerando a positividade ao CrAg/LFA como variável resposta, foram consideradas variáveis explanatórias a contagem de linfócitos TCD4, idade, gênero, procedência. Foram comparadas as médias ou medianas de CD4 nos grupos CrAg/LFA positivos e negativos, através dos testes Anova ou não paramétricos conforme o caso.

4. RESULTADOS

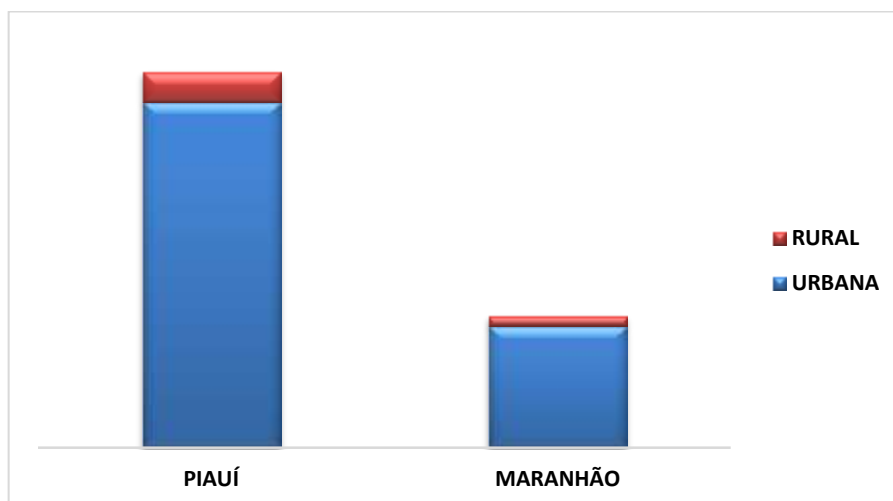
Do total de 109 pacientes avaliados, 67% eram do sexo masculino (GRÁFICO 1) e 92% eram provenientes de área urbana (GRÁFICO 2). Cerca de 76% eram provenientes do estado do Piauí, enquanto 24% eram provenientes do estado do Maranhão (GRÁFICO 2). A média de idade foi de 35 anos, sendo 57% com idade entre 31-45 anos de idade (TABELA 1).

Gráfico 1. Distribuição (Percentil) de pacientes quanto ao sexo.



FONTE: IDTNP.

Gráfico 2: Distribuição de paciente quanto a origem e zona de moradia



FONTE: IDTNP.

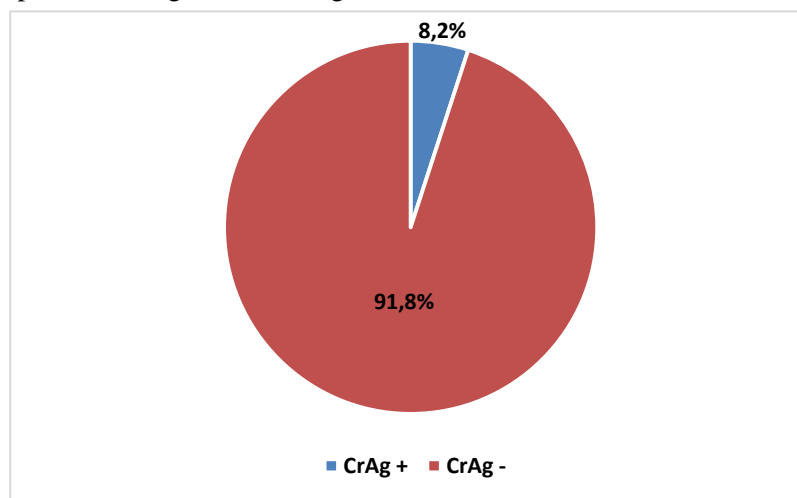
Tabela 1: Características demográficas de pacientes atendidos no IDTNP

VARIÁVEIS	FREQUÊNCIA	%
IDADE EM ANOS		
18-30	19	17
31-45	63	57
>45	27	26
RESIDÊNCIA		
URBANA	101	92
RURAL	8	8

FONTE:IDTNP.

A prevalência de antigenemia criptocócica positiva em sangue e urina, foi de 8,2% (GRÁFICO 3).

Gráfico 3. Distribuição geral de pacientes com CrAg/LFA positivo e negativo em sangue e urina



FONTE: Laboratório de Microbiologia do IDTNP.

Os pacientes com antigenemia criptocócica positiva, 4 eram do Maranhão e 5 do Piauí (FIGURA 5).

Figura 5. Distribuição geográfica dos casos positivos dos pacientes do Piauí e Maranhão



FONTE: IBGE.

Dos pacientes avaliados, 18% estavam em uso regular de TARV, 49,5% estavam em uso irregular e 32,5% eram virgem de tratamento. Antigenemia positiva em sangue e urina foi observada em sua maioria no grupo de pacientes que estavam em uso irregular de terapia antirretroviral (TABELA 2).

Tabela 2: Frequência de Antigenemia Criptocócica e *status* de Terapia Antirretroviral

STATUS TARV	TESTE CrAg/LFA SANGUE E URINA		(%)
	POSITIVO	NEGATIVO	
REGULAR	1	19	18
IRREGULAR	7	47	49,5
VIRGEM DE TRATAMENTO	1	34	32,5

FONTE: Laboratório de Microbiologia do IDTNP.

Usando o CrAg/ LFA na urina, os resultados foram semelhantes àqueles realizados no sangue, considerando que esse é o padrão ouro. Cerca de 3,6% dos pacientes apresentavam CD4 <100 cel/mm³, enquanto 58,7% tiveram CD4 entre 101-199 cel/mm³ e 37,7% com CD4 ≥ 200 cel/mm³ (TABELA 3).

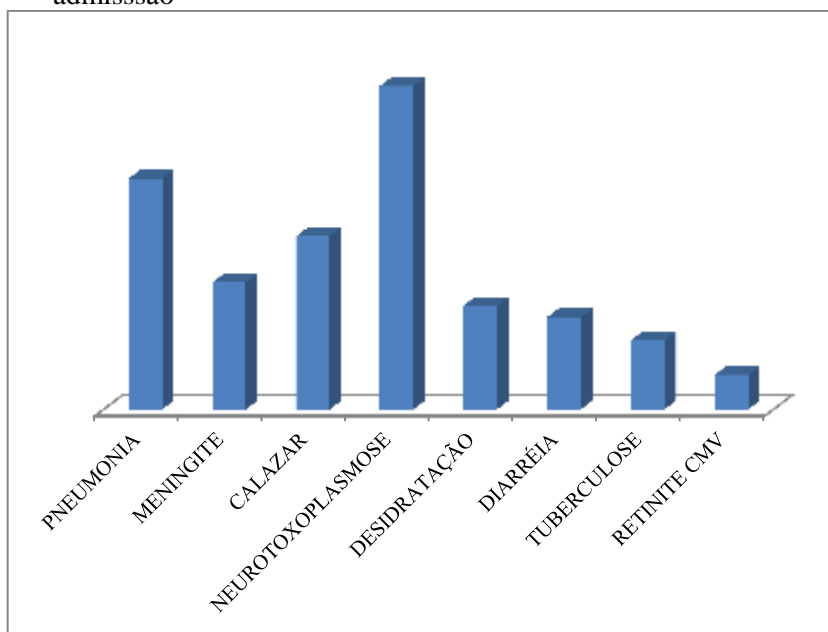
Tabela 3. Associação de CrAg/LFA positivo com contagem de CD4

VARIÁVEIS	n	CrAg/LFA + SANGUE E URINA (%)
CONTAGEM CD4(cel/mm³)		
< 100	33	3,6
100-199	64	58,7
≥200	12	37,7
TOTAL	109	

FONTE: Laboratório de Microbiologia do IDTNP.

Dentre as condições clínicas de admissão aventadas como hipóteses diagnósticas dos pacientes deste estudo tivemos: Neurotoxoplasmose, Calazar, Pneumonia, Meningite, Tuberculose, Diarréia, Desidratação e Retinopatia por Citomegalovírus. Daqueles pacientes com CrAg positivo, tivemos como principais: Neurotoxoplasmose, Pneumonia, Meningite e Calazar (GRÁFICO 4).

Gráfico 4: Frequência das condições clínicas dos pacientes à admissão



FONTE: IDTNP.

Dos pacientes avaliados, foram relatados vários sintomas à admissão, das quais podemos citar cefaleia, febre, perda ponderal, confusão mental, convulsão, tosse e vômitos. As manifestações clínicas dos pacientes avaliados, forma independentes da contagem de CD4. As mais frequentes naqueles pacientes com antigenemia criptocócica positiva foram: cefaleia (88%), febre (77%), convulsão (44%) e confusão mental (55%). Sendo cefaleia o sintoma mais frequente neste estudo (TABELA 4).

Tabela 4. Manifestações clínicas associadas com Antigenemia Criptocócica

MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	CrAg/LFA + SANGUE E URINA %	CrAg/LFA – SANGUE E URINA %
CEFALÉIA	88	65
FEBRE	77	56
PERDA PONDERAL	33	45
CONFUSÃO MENTAL	55	38
CONVULSÃO	44	24
VÔMITO	22	18
TOSSE	22	18

FONTTE:IDTNP.

Depois da realização do *screening* com CrAg/LFA no sangue e urina, todos os 9 pacientes, foram submetidos a punção lombar a fim de verificar a positividade ou não no líquido. Contudo, todas as amostras dos pacientes com CrAg/LFA positivo no sangue e urina, foram realizados teste de tinta da China para visualização direta e cultura. Verificou-se que apenas a mostra de um paciente foi positiva para CrAg/LFA no líquido, pesquisa com tinta da China e cultura.

A amostra de LCR do paciente com CrAg/LFA positivo, demonstrava uma celularidade de 356 cel/mm³, Proteínas de 145 mg/mL, Glicemia de 86 mg/mL. Apresentava ainda durante a realização da punção lombar, uma raquimanometria inicial de 30 cmH₂O e final de 10 cmH₂O.

Todos os pacientes com CrAg/LFA positivo, tiveram boa evolução clínica, sendo constatado nenhum óbito.

Todos os pacientes que tiveram apenas CrAg/LFA positivo em sangue e urina, foram submetidos a profilaxia com Fluconazol, por um período recomendado de pelo menos 6 meses. No entanto, o único paciente com CrAg/LFA positivo em líquido, recebeu tratamento específico com Anfotericina.

5. DISCUSSÃO

Nosso estudo demonstrou que a maioria dos casos com CrAg/LFA positivo em sangue e urina são do sexo masculino (67%) e com média de idade de 35 anos, dados estes condizentes com a literatura.

De acordo com estudo realizado por Beyene *et al* (2013), demonstraram que 45% dos casos de CrAg/LFA positivo seriam do sexo masculino e média de 33 anos. Em outro estudo realizado por Magambo *et al* (2014), demonstraram 59% de positividade para antigenemia criptocócica para o sexo masculino e uma média de idade de 36 anos .

A prevalência de antigenemia criptocócica positiva em sangue e urina, foi de 8,2%. Demonstrou uma frequência de pacientes CrAg/LFA positivo, com CD4 variando com níveis menores que 100 cél/mm^3 até 200 cél/mm^3 . Sendo estes distribuídos em faixas de $\text{CD4} < 100 \text{ cel/mm}^3$ com 3,6%, $\text{CD4: } 100\text{-}199 \text{ cel/mm}^3$ com 58,7% e $\text{CD4: } \geq 200 \text{ cel/mm}^3$ com 37,7%.

A Organização Mundial de Saúde, preconiza a realização de CrAg/LFA no soro ou plasma na rotina em pacientes adultos, virgens de tratamento para HIV, não estando inclusos crianças e adolescentes, seguido de profilaxia uma vez CrAg/LFA positivo. Considerando neste contexto o início da terapia antifúngica antes da terapia antirretroviral naqueles pacientes com $\text{CD4} \leq 100 \text{ cel/mm}^3$.

Um estudo realizado por Patel *et al.*(2013), no Sudeste de Londres e outro realizado por Ganiem *et al.* (2014), na Indonésia, demonstraram uma positividade semelhante a nosso estudo de 5% e 7,1% respectivamente, apresentando estes pacientes $\text{CD4} < 100 \text{ cél/mm}^3$. Enquanto em estudo realizado na Tanzânia por Magambo *et al.*(2014), demonstraram uma positividade de 7, 1% entre os pacientes com $\text{CD4} \leq 200 \text{ cél/mm}^3$.

Estudos foram realizados em Ghana com 2% de positividade do CrAg/LFA com $\text{CD4} < 100 \text{ cel/mm}^3$, em Uganda com 3,5% e $\text{CD4} < 200 \text{ cel/mm}^3$, outro estudo em Uganda com 5,5% e $\text{CD4} < 100 \text{ cel/mm}^3$, e um na Etiópia com 9% de positividade com $\text{CD4} < 200 \text{ cel/mm}^3$ (BEYENE, *et al*, 2013).

Katchanov *et al* (2015) realizaram um estudo onde evidenciaram 1,6% e 1,1% dos pacientes com $\text{CD4} \leq 100 \text{ cel/mm}^3$ e $101\text{-}200 \text{ cel/mm}^3$ respectivamente. Enquanto em outro estudo realizado por Alemu *et al* (2013), evidenciaram uma prevalência de antigenemia criptocócica em 8,4% dos pacientes, sendo distribuídos em faixas de CD4 de < 100

cel/mm³; 100-150 cel/mm³ e 150-200 cel/mm³, tendo como frequência, 11%; 8,9% e 5,7% respectivamente.

Na África, são reportados a prevalência de antigenemia criptocócica em uma coorte de pacientes com CD4 menor que 200 cél/mm³ com uma positividade que varia de 2-13% dos casos e pacientes sem sinais de meningite (GANIEM *et al.*,2014).

Nosso estudo demonstrou que do total de pacientes com antigenemia criptocócica positiva em sangue periférico e urina, verifica-se 18% estavam em uso regular de TARV, 49,5% estavam em uso irregular e 32,5% eram virgem de tratamento, sendo possível observar que a maioria os casos estão incluídos no grupo que relata uso irregular da terapia antirretroviral.

Em estudo realizado por Beyene *et al.* 2013, observaram-se que que cerca de 50% dos casos estão relacionados ao uso irregular de TARV, enquanto que 14,2% são virgens de tratamento e apenas 4,1 % relatam uso regular, considerando uma coorte de 254 pacientes. Em outros estudos realizado por Letang *et al* (2015) e Osazuka *et al* (2012), evidenciaram uma positividade para antigenemia criptocócica de 3,7% e 12,7%, porém tratavam-se apenas de pacientes virgens de tratamento antirretroviral.

Quando comparamos a positividade de CrAg/LFA no sangue e urina verificou que todos os pacientes apresentavam os mesmos resultados, sendo positivos.

A presença da positividade do CrAg/LFA em sangue periférico, demonstrou a importância para se identificar pacientes assintomáticos, que em um período de semanas pode vir a desenvolver sintomas de meningite criptocócica. Em pacientes com HIV, a positividade do CrAg pode auxiliar quanto a indicação de terapia empírica, antes do desenvolvimento de meningite. Em países como a Etiópia têm instituído na rotina clínica dos pacientes com HIV (BEYENE *et al.*, 2013; MAGAMBO *et al.*, 2014).

De acordo com um estudo de McMullan *et al* (2012) onde se realizaram a pesquisa de antigenemia criptocócica no sangue e urina, pôde se verificar uma sensibilidade de 100% para o sangue e 94,4% para urina, considerando que todos os pacientes apresentavam algum sintoma.

Em estudo realizado por Magambo *et al.* (2014), onde os pacientes avaliados que eram assintomáticos, com CD4 \leq 200 cel/mm³, obtiveram um excelente resultado quando

realizado CrAg/LFA no sangue. Aqueles que eram sintomáticos, e que foram realizados CrAg/LFA na urina, obteve uma sensibilidade de 98%.

Magambo *et al.* (2014), recomendam que em pesquisas futuras possa ser utilizado a pesquisa de antigenemia criptocócica na urina. Acredita ainda que possa haver uma associação entre esses títulos urinários de antígeno com a morbimortalidade em pacientes assintomáticos. Afirmam ainda, em seu estudo, que o uso isolado de CrAg/LFA na urina não seria suficiente quando comparado a realização de CrAg/LFA no sangue e urina paralelamente.

Múltiplos estudos têm sido realizado para avaliar a sensibilidade e especificidade do CrAg/LFA usando soro, plasma, líquido e urina, comparando com a cultura. No geral, o CrAg/LFA tem uma sensibilidade de 99,5% e 98,8% de especificidade quando comparado com a cultura (PELFREY & BAUMAN, 2015).

De acordo com Pelfrey e Bauman (2015), de um total de 13 casos de CrAg/LFA positivo no soro, tiveram 3 casos que foram negativos na urina, o que considera estar relacionado a baixos níveis de antígeno criptocócico. Considerando, portanto, que estudos adicionais são necessários para avaliar a detecção de CrAg/LFA na urina. Isso é importante para notarmos os altos valores preditivos positivos e negativos, mostrando a utilidade do CrAg /LFA no diagnóstico e *screening*.

Em nosso estudo, os sintomas referidos pelos pacientes no momento da admissão foram: cefaleia, febre, perda ponderal, confusão mental, convulsão, tosse e vômitos, sendo cefaleia o sintoma mais evidente.

A maioria dos pacientes com CrAg positivo tem algum sintoma ou uma pequena parcela são totalmente assintomáticos. Dentre os sintomas relatados por Ganiem *et al.* (2014), Rugemalila *et al.*,(2013) observam-se em ordem decrescente: cefaleia, febre, alterações do estado mental, vômitos e tosse. Em trabalho realizado por Beyene *et al* (2013), demonstraram que do total de pacientes estudados, a maioria apresentava algum tipo de sintoma ou nenhum. Daqueles que apresentavam CrAg positivo, a maioria (72%), apresentava com sintoma inicial mais frequente, cefaleia e alteração do estado mental.

No presente estudo, aqueles pacientes com CrAg positivo, tivemos como principais hipóteses diagnóstica: Neurotoxoplasmose, Pneumonia, Meningite e Calazar.

Segundo Ganiem *et al* (2014), dos 810 pacientes avaliados, 58 tiveram CrAg positivo no sangue. Como hipóteses diagnóstica de admissão, tinham Neurotoxoplasmose(12,1%), Pneumonia (17,2%). Em estudo realizado por Alemu *et al* (2013), numa população de 369 pacientes, obtiveram 31 casos com CrAg positivo, sendo destes com hipótese diagnóstica de Pneumonia (11%), Meningite (4%).

Todos os pacientes com antigenemia criptocócica positiva, foram submetidos ao tratamento empírico com Fluconazol, sendo apenas um com CrAg/LFA positivo no líquido submetido a terapêutica com Anfotericina.

Para Oyella *et al.*(2012), a profilaxia primária dentre os pacientes infectados pelo HIV, parece ser benéfico na prevenção da Criptococose, contudo é mais lógico e tem melhor custo efetivo quando realizada com Fluconazol nos pacientes com imunodepressão grave e assintomáticos com CrAg positivo.

Na África, a profilaxia primária fluconazol é eficaz e segura em melhorar a sobrevivência em pessoas com CD4 <200 cel/ mm³ (PARKER *et al*, 2009).

Recentemente em estudo publicado por pesquisadores em Uganda, mostraram que a profilaxia primária da doença criptocócica com fluconazol efetivamente impediu o desenvolvimento de meningite criptocócica e morte relacionada com Criptococose em indivíduos HIV- positivos sem antigenemia criptocócica. No entanto, uma abordagem orientada a começar com o CrAg/LFA para pacientes com contagem de CD4 abaixo de 100 cel/mm³ antes do início da TARV, pode ser mais custo benefício do que a profilaxia universal para todos os pacientes com contagens de CD4 baixas (GANIEM *et al* 2014).

6. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou a prevalência de antigenemia criptocócica em sangue e urina de 8,2% em pacientes HIV/AIDS, sendo mais frequente no sexo masculino e com uma média de idade de 35 anos. Apresentou ainda uma maior frequência entre os pacientes em uso irregular de Terapia Antirretroviral e com níveis baixos de CD4.

Apesar das melhorias relevantes durante a era da Terapia Antirretroviral, a meningite criptocócica relacionada com a AIDS continua a ser frequente e provoca uma elevada mortalidade, particularmente em países de baixa e média renda. Esse fator seria o principal quando consideramos que no estudo tínhamos a maioria dos pacientes com *status* de Terapia antirretroviral irregular. Vale a pena ressaltar que o uso adequado da Terapia Antirretroviral contribui para uma redução da morbimortalidade dos pacientes com HIV/AIDS.

O CrAg/LFA permite um exame simples, rápido e de baixo custo para o diagnóstico da criptococose e é recomendado para uso com soro, plasma ou líquido cefalorraquidiano em pacientes sintomáticos. A realização do CrAg/LFA na urina será uma opção diagnóstica, uma vez que possui elevadas sensibilidade e especificidade. Além disso, CrAg/LFA será importante para realização de novos estudos a fim de otimizar o *screening* e o tratamento pre-emptivo da Criptococose.

REFERÊNCIAS

- Adeyemi O, Pulvirenti J, Perumal S, Mupiddi U, Kohl B, Jezisek T 2004. Cryptococcosis in HIV- infected individuals. *AIDS* 18: 2218-19.
- Alemu AS, Kempker RR, Tenna A, Smitson C, Berhe N, Fekade D, Blumberg HM, Aseffa A 2013. High prevalence of Cryptococcal antigenemia among HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy in Ethiopia. *PLoS One* ;8(3):e58377. doi: 10.1371
- Amaro MCO. Caracterização de isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gatti* quanto à susceptibilidade a fluconazol. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular). Universidade Federal do Rio Grande do Sul Porto Alegre, 2006.
- Angstwurn K, Sokolowska-Koehler W, Stadelmann C, Schielke E, Weber JR 2004. Fulminant cryptococcal meningitis as presenting feature in patient with AIDS. *European Journal of Neurology* 11: 353-55.
- Antinori S, Ridolfo AL, Gianelli E, Piazza M, Gervasoni C, Monforte AA 2000. The role of lumbar puncture in the management os elevated intracranial pressure in patients with AIDS associated cryptococcal meningitis. *Clinical Infectious Diseases* v.31: p.1309-10.
- Antinori S 2013 . New insights into HIV/AIDS-associated cryptococcosis. *ISRN AIDS*:471363.
- Baró T, Torres-Rodríguez JM, De Mendoza MH, Morera Y, Alía CV 1998. First identification of autochthonous *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* isloated from goats with predominantly severe pulmonary disease in Spain. *J Clin Microbiol*; v.36, p.458-461.
- Beyene T, Woldeamanuel Y, Asrat D, Ayana G, Boulware DR 2013. Comparison of Cryptococcal Antigenemia between Antiretroviral Naïve and Antiretroviral Experienced HIV Positive Patients at Two Hospitals in Ethiopia. *Plos One* 4:8(10):e75585.
- Bivanco FC, Machado CA, Martins EL 2006. Criptococose cutânea. *Arq Med ABC* v.31: p.102-109.
- Boekhout T, Theelen B, Diaz M, Fell JW, Hop WC, Abeln EC, Dromer F, Meyer W 2001. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology* 147: 891-907.

Botts MR, Hull CM 2010. Dueling in the lung: how *Cryptococcus* spores race the host for survival. *Curr. Opin. Microbiol* v.13: p. 437-442.

Boulware DR, Rolfes MA, Rajasingham R, Von Hohenberg M, Qin Z, Taseera K, *et al* 2014. Multisite validation of cryptococcal antigen lateral flow assay and quantification by laser thermal contrast. *Emerg Infect Dis* 20: 45-53.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia de Bolso: Doenças Infecciosas e Parasitárias. Brasília-DF, 2010.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais. Brasília-DF, 2012.

Breton G, Seihean D, Chérin P, Herson S, Benveniste O 2002. Paradoxical Intracranial cryptococoma in a human immunodeficiency virus infected man being treated with combination antiretroviral therapy. *The American Journal of Medicine* 5: 113-155.

Brody TM, Lerner J, Minneman KP, Wecker L. *Farmacologia Humana*. 4a ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2006.

Buchanan KL & Murphy JW 1998. What makes *Cryptococcus neoformans* a pathogen? *Emerg Infect Dis* 4: 71-83.

Callejas A, Ordoñez N, Rodriguez MC, Castañeda E 1998. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, serotype C, from the environment in Colombia. *Med Mycol* v.36: p.341-344.

Calvo BM, Colombo AL, Fischman O, Santiago A, Thompson L, Lazera MS, Telles F, *et al* 2001. Antifungal susceptibilities, varieties, and electrophoretic karyotypes of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* from Brazil, Chile, and Venezuela. *Journal of Clinical Microbiology* v.39: p.2348-50.

Casadevall A, Perfect JR 1998. *Cryptococcus neoformans*. Washington, DC: American Society for Microbiology Press

Cavalcanti MAS. Criptococose e seu agente no Meio Norte, estados do Piauí e Maranhão, Brasil. Tese de Doutorado, Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro) e Universidade Federal do Piauí (Teresina), 1995.

Cichon *et al* 2011. Isolamento de *Cryptococcus neoformans* de amostras ambientais de Curitiba e região metropolitana (Paraná, Brasil) e testes de suscetibilidade frente a drogas antifúngicas. RBAC 43(3):176-9.

Consenso em Criptococose. Rev Soc Bras Med Trop. 2008. v.41, p.524-544.

Corrêa MPSC, Oliveira EC, Duarte RRBS, Pardal PPO, Oliveira FM, Severo LC 1999. Cryptococcosis in children in the State of Pará, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop v.32: p.505-508.

Coutinho ZF, Silva D da, Lazera MS, Petri V, Oliveira RM de, Sabroza PC, Wanke B 2002. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980- 1995). Cad Saude Pub [online]vol. 18: p. 1441-1454.

Darras-Joly C, Chevret S, Wolff M, Matheron S, Louguet P, Casalino E, Joly V, Chochillon C, Bédos JP 1996. *Cryptococcus neoformans* infection in France: Epidemiologic feature of early prognostic parameters for 76 patients who were infected with human immunodeficiency vírus. Clinical Infectious Diseases 23: 369-376.

Delgado ACN, Taguchi H, Mikami Y, Myiajy M, Villares MCB, Moretti ML 2005. Human cryptococcosis: relationship of environmental and clinical strains of *Cryptococcus neoformans var. neoformans* from urban and rural areas. Mycopathologia v. 159: p. 7-11.

Diamond RD 2000. *Cryptococcus neoformans* in Principle and Practice of Infectious Diseases, Mandell, Douglas, Bennets vol. 2: 2707-2717.

Dismukes WE 1988. Cryptococcal Meningitis in Patients with AIDS. The Journal of Infectious Diseases 157: 624-8.

Dromer F, Mathoulin-Pélissier S, Fontanet A, Ronin O, Dupont B, Lortholary O 2004. Epidemiology of HIV-associated cryptococcosis in France (1985-2001): comparasion of the pré and post-HAART eras. AIDS 18: 2218-19.

Eghwurdjakpor OP, Allison AB 2009. Neurocryptococcosis in a 10-year-old immunocompetent girl. Acta Neurochir v.151: p.711-712.

Ellis DH, Pfeiffer TJ 1990. Ecology, life cycle and infectious propagule of *Cryptococcus neoformans*. Lancet v.336: p.923-925.

Feitosa AC, Trovão JR 2006. Elementos naturais da paisagem. In: Atlas Escolar do Maranhão: espaço geo-histórico e cultural. João Pessoa: Ed.Grafset: p. 61-88.

Fernandes OFL, Costa TR, Costa MR, Soares AJ, Pereira AJSC, Silva MRR 2000. *Cryptococcus neoformans* isolados de pacientes com AIDS. Rev Soc Bras Med Trop v.33: p.75-78.

Fernandes OFL, Passos XS, Souza LKH, Miranda ATB, Cerqueira CHPV, Silva MRR 2003. In vitro susceptibility characteristics of *Cryptococcus neoformans* varieties from AIDS patients in Goiânia, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz v. 98: p. 839-841.

Fortes ST. Fontes sapróbias e sexualidade de isolados clínicos e ambiental de *Cryptococcus (Filobasidiella) neoformans* do estado de Roraima – Brasil. Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz. Tese de Doutorado, 2001.

Ganiem, AR, Indrati, AR, Wisaksana R, Meijerink H, van der Ven A, Alisjahbana B, and van Crevel R 2014 . Asymptomatic cryptococcal antigenemia is associated with mortality among HIV-positive patients in Indonesia. J Int AIDS Soc 17(1): 18821.

Gazzoni AF, Severo CB, Barra MB, Severo LC 2008. Atypical micromorphology and uncommon location of cryptococcosis: a histopathologic study using special histochemical techniques (one case report). Mycopathologia v. 167: p. 197-202.

Goodman & Gilman. The pharmacological basis of therapeutics. 12^a ed. Artmed, 2012.

Guevara-Campos J, González-Guevara L, Urbáez-Cano J, Fermín S 2008. Meningoencefalitis por *Criptococcus neoformans* em escolares imunocompetentes.

Horta JA, Staats CC, Casali AK, Ribeiro AM, Schrank IS, Schrank A, Vainstein MH 2002. Epidemiological aspects of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. Medical Mycology v. 40: p. 565-571.

Hull CM, Heitman H 2001. Genetics of *Cryptococcus neoformans*. Annu. Ver. Genet v. 36: p. 557-615.

Igreja RP, Lazéra MS, Wanke B, Galhardo MCG, Kidd SE, Meyer W 2004. Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients of the Brazilian city, Rio de Janeiro. Medical Mycology v. 42: p. 229-234.

- Jarvis JN, Harrison TS 2007. HIV-associated cryptococcal meningitis. *AIDS* v. 21: p. 2119.
- Jarvis JN, Lawn SD, Wood R, Harrison TS 2010. Cryptococcal antigen screening for patients initiating antiretroviral therapy: time for action. *Clinical Infectious Diseases* 51: 1463–1465.
- Pelfrey J, Bauman S 2012 . CrAg LFA: The New Gold Standard for Diagnosis and Prevention of Cryptococcal Disease.
- Juffermans NP, Verbon A, van der Poll T 2003. Diabetes Insipidus as a complication of cryptococcal meningitis in na HIV infected patients. *Scandinavian Journal Infectious Diseases* 34: 307-08.
- Jungerman PF, Schwartzman RM. *Veterinary Medical Mycology*. Philadelphia: Lea & Febiger, p. 200, 1972.
- Katchanov J, Jefferys L, Tominski D, Wöstmann K, Slevogt H, Arastéh K, Stocker H 2015. Cryptococcosis in HIV-infected hospitalized patients in Germany: Evidence for routine antigen testing. *J Infect*. Jul;71(1):110-6. doi: 10.1016/j.jinf.2015.01.011
- Kern ME, Blevins KS. *Micologia Médica: texto e atlas*. 2.ed. São Paulo: Editorial Premier, 1999.
- Kidd SE, Hagen F, Tscharke RL, Huynh M, Bartlett KH, Fyfe M, Macdougall L, Boekhout T *et al* 2004. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *PNAS* v.101: p.17258-17263.
- King MD, Perlino CA, Cinnamon J, Jernigan JA 2002. Paradoxal recurrent meningitis following therapy of cryptococcal meningitis: na immune reconstitution syndrome after initiation of higly active antirretroviral therapy. *International Journal os STD and AIDS* 13: 724-6.
- Knoke M, Schwesinger G 1994. One hundred years ago: the history of cryptococcosis in Greifswald. *Medical mycology in the nineteenth century*. *Mycoses* v. 37: p. 229-233.
- Kovacs AA, *et al* 1985. Cryptococcosis in the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Intern Med* 103: 533-8.
- Kozel TR, Bauman SK 2012. CrAg Lateral Flow Assay for Cryptococcosis. *Expert Opin Med Diagnostic* 6: 245-51.

- Kwon-CHung KJ, Bennett JE. Cryptococcosis. *In: Medical Mycology*, 1992. Philadelphia: Lea & Febiger, p.397-446.
- Kwon-Chung KJ, Boekhout T, Fell JW, Diaz M 2000. Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae). *Taxon* 51: 804–806.
- Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Melo NT 2002. *Tratado de Micologia Médica*, São Paulo: Editora Sarvier, 9ª ed., p. 1120.
- Lazéra MS, Cavalcanti MAS, Londero AT, Trilles L, Nishikawa MM, Wanke B 2000. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. *Med Micol* v.38: p.379-383.
- Lazéra MS, Cavalcanti MAS, Trilles L, Nishikawa MM, Wanke B 1998. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in a pottery tree hollow - evidence for a natural habitat related to decaying wood. *J Med Vet Mycol* v.36: p.119-122.
- Lazera MS, Gutierrez Galhardo MC, Cavalcanti MAS, Wanke B. Criptococose. Pp. 1223-1235. *In: COURA, J. R. (Org.). Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias, V. II, 1 ed., Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan S. A, 2005.*
- Lazéra MS, Igreja RP, Wanke B. Criptococose. *In: Sidrim JJC, Rocha MFG. Micologia Médica: Á luz de autores contemporâneos. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., p. 89-101, 2004.*
- Lazéra MS, Salmito Cavalcanti MA, Londero AT, Trilles L, Nishikawa MM, Wanke B 2000. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. *Medical Mycology* v. 38.
- Letang E, Müller MC, Ntamatungiro AJ, Kimera N, Faini D, Furrer H *et al.* 2015. Cryptococcal Antigenemia in Immunocompromised Human Immunodeficiency Virus Patients in Rural Tanzania: A Preventable Cause of Early Mortality. *Open Forum Infect Dis.* Apr 2;2(2)
- Lin X., Heitman J 2006. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annu. Rev. Microbiol*; 60: pp. 69–105, p. 379-83.

Lindenberg ASC, Chang MR, *et al* 2008. Clinical and epidemiological features of 123 cases of cryptococcosis in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* v. 50: n.2, p.75-78.

Liu TB, Perlin DS, Xue C 2012. Molecular mechanisms of Cryptococcal meningitis. *Virulence* vol. 3; p. 173- 181.

Magambo KA, Kalluvya SE, Kapoor SW, Seni J, Chofle AA, Fitzgerald DW, Downs JA 2014. Utility of urine and serum lateral flow assays to determine the prevalence and predictors of cryptococcal antigenemia in HIV-positive outpatients beginning antiretroviral therapy in Mwanza, Tanzania. *J Int AIDS Soc* .8: 17:19040.

Makadzange AT, McHugh G 2014. New approaches to the diagnosis and treatment of cryptococcal meningitis. *Semin Neurol* 34:47-60.

Martins MA, Pappalardo MCSM, Melhem MSC, Pereira-Chiocola VL 2007. Molecular diversity of serial *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients in the city of São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 777-784.

Melo NT, Lacaz CS, Cilarbel CE, Pereira AD, Heins-Vaccari EM, França-Netto AS, Machado LR, Livramento JA 1993. Quimiotipagem do *Cryptococcus neoformans*. Revisão da Literatura. Novos dados epidemiológicos sobre a criptococose. Nossa experiência com o emprego do meio de C.G.B. no estudo daquela levedura. *Rev Inst Med Trop* v.35: p.469-478.

Mendes FES. Correlação entre a susceptibilidade in vitro e a atividade in vivo do fluconazol em modelo murinho de infecção cerebral causada por *Cryptococcus gattii*. Dissertação (Programa de Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Vale Do Rio Doce, Governador Valadares, 2009.

Mitchell TG, Perfect JR 1995. Cryptococcosis in the Era of AIDS-100 years after the Discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clinical Microbiology Review* 8: 515-548.

Moreira AT *et al.*, 2006. Criptococose: estudo clínico-epidemiológico, laboratorial e das variedades do fungo em 96 pacientes. *Revista Brasileira de Medicina Tropical*. 39: 255-258, Minas Gerais.

Nielsen K, Cox GM, Wang P, Toffaletti DL, Perfect JR, Heitman J 2003. Sexual cycle of *Cryptococcus neoformans* var *grubii* and virulence of congenic α and α isolates. *Infect. Immun* v71: p. 4831-4841.

Nishikawa MM, Lazéra MS, Barbosa GG, Trilles L, Balassiano BR, Macêdo RCL *et al* 2003. Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Brazil: analysis of host and regional patterns. *J Clin Microbiol* v.41, p.73 - 77.

Ohkusu M, Tangonan N, Takeo K, Kishida E, Ohkubo M, Aoki S *et al* 2002. Serotype, mating type and ploidy of *Cryptococcus neoformans* strains isolated from patients in Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* v. 44, p. 299-302.

Oliveira MTB, Boekhout T, Theelen B, Hagen F, Baroni FA, Lazéra MS, Lengeler KB *et al* 2004. *Cryptococcus neoformans* shows a remarkable genotypic diversity in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology* v. 42: p. 1356-1359.

Oliveira, B 2004. *Cryptococcus neoformans* shows a remarkable genotypic diversity in Brazil. *J Clin Microbiol* v.42, n.3, p.1356-9.

Osazuwa F, Dirisu JO, Okuonghae PE, Ugbebor O 2012. Screening for cryptococcal antigenemia in anti-retroviral naïve AIDS patients in benin city, Nigeria. *Oman Med J: May;27(3):228-31.*

Oyella J, Meya D, Bajunirwe F, Kanya MR 2012. Prevalence and factors associated with cryptococcal antigenemia among severely immunosuppressed HIV-infected adults in Uganda: a cross-sectional study. *J Int AIDS Soc* 15(1):15.

Pappalardo MC, Melhem MS 2003. Cryptococcosis: a review of the Brazilian experience for the disease. *Rev Inst Med Trop* v.45, p.299-305.

Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM 2009. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS* 23: 525-530.

Parkes-Ratansh R, Kamali A, Wakeham K, *et al* 2009. Successful primary prevention of cryptococcal disease using fluconazole prophylaxis in HIV-infected Ugandan adults, Abstract 32. CROI, 16th Annual Conference; Montreal, Canada.

Pasa CR. Tipagem molecular e suscetibilidade antifúngica de *Cryptococcus* isolados de pacientes em Hospital Universitário com investigação domiciliar. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento). Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2011.

Patel S, Shin GY, Wijewardana I, Vitharana SR, Cormack I, Pakianathan M, Harrison TS, Bicanic T 2013. The prevalence of cryptococcal antigenemia in newly diagnosed HIV patients in a Southwest London cohort. *J Infect.* 66(1):75-9.

Pelfrey J, Bauman S 2015. CrAg LFA: the new gold standard for diagnosis and prevention of cryptococcal disease. (cited 2015 Apr 13). Available from: www.immy.com/wpcontent/uploads/2011/12/CrAgLFA_InternationalWhitePaper_final.pdf

Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, *et al* 2010. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 50(3):291–322

Perfect JR, Bicanic T 2014. Cryptococcosis diagnosis and treatment: what do we know now. *Fungal Genet Biol.* pi:S1087-1845(14)00186-8.

Pinto LIS 2010. A criptococose meníngea em doentes com infecção HIV. Faculdade de Medicina do Porto. Revista Arquivos de Medicina.

Powerdely WG, Claud GA, Dismukes WE, Saag MS 1994. Mensument of cryptococcal antigen in sérum and cerebrospinal fluis: Value in the management of AIDS- associated cryptococcal meningitis. *Clinical Infectious Diseases* 18: 789-92.

Rajasingham R, Meya DB, Boulware DR 2012. Integrating cryptococcal antigen screening and pre-emptive treatment into routine HIV care. *J Acquir Immune Defic Syndr* 59:85-91.

Rajasingham R, Rhein J, Klammer K, Musubire A, Nabeta H, Akampurira A *et al* 2015. Epidemiology of meningitis in an HIV-infected Ugandan cohort. *Am J Trop Med Hyg* 92:274-9.

Raso TF, Werther K, Miranda ET, Mendes-Giannini MJ 2004. Cryptococcosis outbreak in psittacine birds in Brazil. *Med Mycol* v.42, p.355-362.

- Razavi B, O'Toole J, Schilling M, Razavi M 2000. Cryptococcal meningitis an endocrine emergency? *The Lancet* 355: 1426.
- Rodrigues, JLP. Geografia do Piauí. In: Geografia e história do Piauí: estudos regionais. Teresina: Edição do Autor, p.23-131, 2007.
- Rugemalila J, Maro VP, Kapanda G, Ndaro AJ, Jarvis JN 2013. Cryptococcal antigen prevalence in HIV-infected Tanzanians: a cross-sectional study and evaluation of a point-of-care lateral flow assay. *Trop Med Int Health* 18:1075-9.
- Shirley RM, Baddley JW 2009. Cryptococcal lung disease. *Current Opinion in Pulmonary Medicine* v. 15: p. 254-260, 2009.
- Sidrim JJC, Rocha MFG. Micologia Médica à luz de autores contemporâneos. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2004.
- Silvestre A, *et al.* Doenças Infecciosas. O desafio da clínica. Clínica Universitária de Doenças Infecciosas. Faculdade de Medicina da Faculdade de Coimbra, Coimbra 2008.
- Souza LKH, Souza Junior AH, Costa CR, Faganello J, Vainstein MH, Chagas ALB, Souza ACM, Silva MRR 2009. Molecular typing and antifungal susceptibility of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* species complex isolates in Goiânia, Brazil. *Mycoses* 53: 62-67.
- Souza MB, Melo CSN, Silva CS, Santo RM, Matayoshi S 2006. Criptococose palpebral: relato de caso. *Arq Bras Oftalmol* v.69, p.265-267.
- Trilles L, Lazéra MS, Wanke B, Oliveira RV, Barbosa GC, Nishikawa MM, Morales BP, Meyer W 2008. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* v. 103, p. 455-462.
- Van Den Bossche, H 1997. Mechanisms of antifungi resistance. *Rev Iberoam Mico* v.14, n.2: p.44-49.
- Vanden Bossche H, Dromer F, Improvisi I, Lozano-Chiu M, Rex JH, *et al.* , 1998. Antifungal drug resistance in pathogenic fungi. *Med. Mycol.* 36(Suppl 1): 119–128


Vidal JE, Boulware DR 2015. Lateral flow assay for cryptococcal antigen: an important advance to improve the continuum of HIV care and reduce cryptococcal meningitis-related mortality. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 57(Suppl 19): 38-45.

Vidal JE, Gerhardt J, Peixoto de Miranda EJ, Dauar RF, Oliveira Filho GS, Penalva de Oliveira AC, Boulware DR 2012. Role of quantitative CSF microscopy to predict culture status and outcome in HIV-associated cryptococcal meningitis in a Brazilian cohort. *Diagn Microbiol Infect Dis* 73:68–73.

World Health Organization. Rapid advice: diagnosis, prevention, and management of cryptococcal disease in HIV-infected adults, adolescents and children. WHO Document Production Services, Geneva, Switzerland. 2011. pp. 1-37.

Zuger A, Loue E, Holzmann RS, Simberkoff MS, Rahal JJ 1986. Cryptococcal disease in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. Diagnostic features and outcome of treatment. *Annals Internal Medicine* 104: 234-40.

ANEXOS

	UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUI - UESPI		
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP			
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA			
Título da Pesquisa: Prevalência do antígeno criptocócico utilizando Lateral Flow Assay (LFA) no screening de pacientes com HIV/AIDS.			
Pesquisador: Lilline Maria Soares Martins			
Área Temática:			
Versão: 4			
CAAE: 20216214.6.0000.5209			
Instituição Proponente: Universidade Estadual do Piauí - UESPI			
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio			
DADOS DO PARECER			
Número do Parecer: 922.355			
Data da Relatoria: 09/12/2014			
Apresentação do Projeto:			
<p>Trata-se de um estudo descritivo e transversal a ser realizado com todos os pacientes com AIDS e que concordem em participar do estudo no período de Janeiro/2015 a Julho/2015. Todos os pacientes que atendam aos critérios de elegibilidade e inclusão, e concordem em participar, serão submetidos a punção venosa, em antebraço, de 10 ml de sangue, para realização de CrAg/LFA em soro. Será utilizado o kit de CrAg/LFA da Immuno-Mycológica Inc, Norman, Oklahoma. Os kits CrAg/LFA serão fornecidos em parceria com a Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz/RJ. Para o exame da urina, serão entregues potes plásticos para que os participantes possam coletar a amostra de urina. Os resultados positivos serão comunicados às equipes que assistem aos pacientes. O presente estudo não contempla nenhuma intervenção diagnóstica adicional nem terapêutica, portanto, a instituição seguirá sua rotina de diagnóstico e manejo. Elegibilidade - Idade elegível: igual ou maior de 18 anos - Gênero elegível: ambos - Todos os pacientes ou seus responsáveis legais deverão assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do estudo. Critério de inclusão: pacientes com diagnóstico confirmado de infecção pelo HIV, segundo o algoritmo do Ministério da Saúde do Brasil. - Paciente internados ou em acompanhamento ambulatorial. Critério de exclusão: História prévia de doença criptocócica e ausência de consentimento para participar do estudo. Também será realizado pelo pesquisador o preenchimento de formulário através da coleta</p>			
Endereço: Rua Olavo Bilac, 2335			
Bairro: Centro/Sul		CEP: 64.001-290	
UF: PI	Município: TERESINA		
Telefone: (86)3221-0658	Fax: (86)3221-4749	E-mail: comitedeeticauespi@hotmail.com	



Contribuição do Paciente: 522.202

de informações laborais que constam em prontuários médicos, as quais só poderão ser utilizadas no contexto do estudo ou em artigos relacionados ao estudo.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

- Avaliar a antigenemia criptocócica em pacientes com HIV/AIDS.

Objetivo Secundário:

- Determinar a prevalência de antigenemia criptocócica utilizando CrAg/LFA em soro pacientes sem uso prévio de terapia antirretroviral - Determinar a prevalência de antigenemia criptocócica utilizando CrAg/LFA em soro pacientes com HIV/AIDS com uso prévio de terapia antirretroviral - Determinar a sensibilidade/especificidade do CrAg/LFA em diferentes espécimes biológicos(Urina, Sangue) - Descrever perfil epidemiológico dos pacientes incluídos neste estudo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

- Dentre os riscos aos quais os pacientes serão submetidos, pode citar a possibilidade de um leve desconforto decorrente da coleta de sangue e o constrangimento para a coleta de urina. - No entanto, durante a coleta de sangue será feito com o máximo de atenção e segurança para que traga o mínimo desconforto, e se necessário será dado o suporte com compressas frias para evitar hematomas. Durante a coleta de urina, o paciente poderá utilizar o banheiro para melhor privacidade.

Benefícios:

- O benefício para os participantes da pesquisa é a diagnosticar a infecção precocemente e melhorar o conhecimento desta micose (criptococose).

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Tema relevante para o desenvolvimento de políticas públicas de saúde.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os documentos obrigatórios foram apresentados, inclusive a pendência gerada anteriormente que foram:

1. Mencionar a Forma de Assistência no protocolo de pesquisa como FOI MENCIONADO NO TCLE: "No entanto, durante a coleta de sangue será feito com o máximo de atenção e segurança para que

Endereço: Rua Otávio Bilac, 2325

Bairro: Centro/Sul

CEP: 64.001-290

UF: PI

Município: TERESINA

Telefone: (86)3221-6658

Fax: (86)3221-4740

E-mail: comitedeticasuespi@hotmail.com



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO
PIAUI - UESPI



Continuação do Parecer: 922.308

fraga o mínimo desconforto, e se necessário será dado o suporte com compressas frias para evitar hematomas. Durante a coleta de urina, o paciente poderá utilizar o banheiro para melhor privacidade.”;

2. - O TCLE DIZ: “Também será realizado pelo pesquisador o preenchimento de questionários para a coleta de informações/dados para realização do estudo (...) utilizando ainda prontuário médico.” MAS ISTO NÃO CONSTA DO PROTOCOLO DE PESQUISA DA PLATAFORMA (NO ITEM INFORMAÇÕES BÁSICAS DO PROJETO). INSERIR ESTA INFORMAÇÃO.

Foram apresentados:

- inseriu a forma de assistência no protocolo de pesquisa da Plataforma;
- inseriu a parte na metodologia no protocolo da plataforma conforme constava no TCLE (Também será realizado pelo pesquisador o preenchimento de formulário através da coleta de informações laborais que constam em prontuários médicos, as quais só poderão ser utilizadas no contexto do estudo ou em artigos relacionados ao estudo”).

Recomendações:

APROPRIAR-SE da Resolução CNS/MS Nº466/12 (que revogou a Res. Nº196/96) e seus complementares que regulamenta as Diretrizes Éticas para Pesquisas que Envolvam Seres Humanos.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

De acordo com a análise, conforme a Resolução CNS/MS Nº466/12 e seus complementares, o presente projeto de pesquisa apresenta o parecer APROVADO por apresentar todas as solicitações indicadas na versão anterior.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Rua Ovídio Bilac, 2335
Bairro: Centro/Sul CEP: 64.001-280
UF: PI Município: TERESINA
Telefone: (86)3221-6658 Fax: (86)3221-4749 E-mail: comitedeeticasuespi@hotmail.com



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO
PIAUI - UESPI



Continuação do Parecer: 922.308

TERESINA, 18 de Dezembro de 2014

Luciana Saraiva e Silva

Assinado por:
LUCIANA SARAIVA E SILVA
(Coordenador)

Profª. Dra. Luciana Saraiva e Silva
Coordenadora do CEP / UESPI
Matrícula: 179554-8

APÊNDICE A

FICHA DE COLETA DE DADOS

PROJETO: Prevalência do antígeno criptocócico utilizando Lateral Flow Assay (LFA) no *screening* de pacientes com HIV/AIDS.

Etapa I

Nome: _____

Idade/Data de nascimento: _____ Sexo: (F) (M) RG: _____

naturalidade: _____ nacionalidade: _____

Data de entrada no estudo: ____/____/____

Local de entrada no estudo: () Enfermaria

Sintomas sistêmicos (não) (sim) Especificar: _____

Sintomas neurológicos: (não) (sim) Especificar: (cefaléia) (convulsões) (sonolência) (confusão mental) (hemiparesia) (paraparesia) (alteração esfinteriana) (disfunção erétil) (parestias) (disestesias) (alteração visual) (alteração auditiva) (alteração de memória) (disartria).

Outros: _____

Tempo de início dos sintomas neurológicos: _____

Antecedentes: Diagnóstico prévio de infecção pelo HIV: (Sim) (Não) Se sim, data: ____/____/____

Já teve doença definidora de AIDS?: (Sim) (Não). Qual?: _____ Data: ____/____/____

Último CD4+: ____ (____%) Data: ____/____/____ Última CV: ____ Log ____ Data: ____/____/____

Uso de TARV: () regular () irregular () VT

TARV – data de início e Tipo

Exames laboratoriais (na entrada para o estudo):

LFA para *Cryptococcus* em soro: (positiva) (negativa)

Hemocultura: _____

Outros (alterados): _____

Etapa II- Para pacientes da etapa I que tiveram LFA positivo no soro:

a-

Resultados de punção lombar	LCR
DATA	
PI / PF (cmH ₂ O)	
Celularidade	
PMN / MN	
Eos/Baso/Plasmo	
Glicose	
Glicose LCR / soro	
Proteínas	
Gram	
Látex bacterias	
Cultura bactérias	
LFA (teste CrAg)	
Cultura fungos	
Tinta da China	
VDRL / HÁ, ELISA ou FTA-Abs	
ADA	
BAAR	
Cultura micobact.	
PCR	
Outros	

b-Exames de imagem:

RX/ CT/ RM de tórax: _____
Data: __/__/__

CT / RM de crânio (admissão): _____
Data: __/__/__

CT / RM de crânio (última): _____
Data: __/__/__

Outros: _____
Data: __/__/__

c-Diagnósticos (durante a internação ou avaliação ambulatorial):

Neurológicos:

Meningite criptocócica () outro/s: _____

Não Neurológicos: Fungemia criptocócica() outros: _____

d- Tratamento recebido:

Se foi diagnosticada meningite criptocócica:

Houve hipertensão intracraniana?: (sim) (não) (não informado)

Recebeu punções diárias de alívio?: (sim) (não)

Fez neurocirurgia?: (sim) (não). Se sim, qual? _____ Data __/__/__

e- Evolução clínica (durante a internação ou acompanhamento ambulatorial):

(melhor) (igual) (pior) (seqüela).

Especificar

f-Desfecho: (alta) (óbito). Causa direta do óbito: _____ Data: __/__/__

g-Responsável pelo preenchimento da ficha: _____

Data: __/__/__

Instituição: _____ Tel: _____

APÊNDICE B



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

TÍTULO DO PROJETO: Prevalência do antígeno criptocócico utilizando Lateral Flow Assay (LFA) no screening de pacientes com HIV/AIDS.

Pesquisador Responsável: Liline Maria Soares Martins

Instituição: Universidade Estadual do Piauí- UESPI

Telefone para Contato: (86) 99215938

Pesquisador Participante: Herion Alves da Silva Machado

Instituição: Fundação Oswaldo Cruz- FIOCRUZ

Telefone para Contato: (86) 99748317

Local de Coleta dos Dados: Instituto de Doenças Tropicais Natan Portella- IDTNP

O (a) Sr. (a), está sendo convidado(a) a participar do estudo “**Prevalência do antígeno criptocócico utilizando Lateral Flow Assay (LFA) no screening de pacientes com HIV/AIDS**”, aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa sob o nº XX/20XX e de responsabilidade dos pesquisadores Márcia dos Santos Lazéra-IPEC/FIOCRUZ, Liline Maria Soares Martins- UFPI/UESPI, Herion Alves da Silva Machado - IDTNP.

Este estudo tem como objetivo saber se um fungo chamado Cryptococcus está causando uma micose chamada criptococose, que pode causar infecção no pulmão ou em outras partes do corpo. Este fungo vive na natureza em fezes secas de aves, dentro de ocos de árvores, em madeira apodrecida, em poeira e pode se espalhar pelo ar. A pessoa pode adquirir a infecção pela respiração e aparecer inflamação do pulmão com dor, tosse e às vezes pneumonia ou meningite. Será estudado se os participantes têm essa infecção e se o Cryptococcus existe na casa das pessoas. Esta micose não pega de pessoa para pessoa e pode causar doença em animais como cães, gatos, aves.

Durante a sua consulta, o (a) médico (a) fará uma pequena entrevista com você para saber sobre seus sintomas, sobre exames que você realizou, se você já havia tratado dessa doença antes e se apresenta outras condições clínicas (infecção pelo HIV, diabetes, transplante, câncer etc) bem como informações sobre a sua residência, trabalho e lazer. Deve ficar claro que as amostras de sangue, urina, líquido da espinha, poderão ser coletadas de você são somente para o seu tratamento e indicadas pelo seu médico, e não mudam se você participar ou não participar deste projeto. Todos os resultados dos exames serão informados a você pela equipe de sua unidade. Se você aceitar participar deste projeto, as informações obtidas pelo médico, as amostras e os resultados de seus exames serão usados neste projeto para estudar a criptococose.

Dentre os **riscos** aos quais você será submetido, é a possibilidade de um leve desconforto decorrente da coleta de sangue, e o constrangimento para a coleta de urina. Após a entrevista/ consulta médica ou em qualquer momento do seu tratamento, poderá ser feita a coleta de amostra de sangue (tubo de 10 ml) que é equivalente a 2 colheres de sobremesa. Para o exame da urina, serão entregues potes plásticos para que os participantes possam coletar a amostra de urina, e entregar aos pesquisadores. No entanto, durante a coleta de sangue será feito com o máximo de atenção e segurança para que traga o mínimo desconforto, e se necessário será dado o suporte com

compressas frias para evitar hematomas. Durante a coleta de urina, o paciente poderá utilizar o banheiro para melhor privacidade.

Também será realizado pelo pesquisador o preenchimento de questionários para a coleta de informações/dados para realização do estudo, as quais só poderão ser utilizadas no contexto do estudo ou em artigos relacionados ao estudo, utilizando ainda prontuário médico.

Todas as informações referentes aos participantes do estudo são confidenciais, isto é, não podem ser divulgadas com os nomes das pessoas. Portanto, os pesquisadores garantem direito à privacidade. Desta forma você não poderá ser identificado, pois garantimos o segredo sobre todas as informações que forem fornecidas nos questionários e sobre o diagnóstico do fungo.

O **benefício** para os participantes é a diagnosticar a infecção no início, melhorar o conhecimento desta micose (criptococose) nesta região e saber se ela pode atingir as pessoas que moram na área de estudo.

A participação das pessoas nesta pesquisa é voluntária, ou seja, a pessoa só participa caso queira. Todos os participantes têm o direito de sair da pesquisa a qualquer momento. Não há nenhum valor econômico a receber ou pagar para participar dessa pesquisa. Esta pesquisa não é um ensaio clínico, ou seja, não estão sendo testados novos medicamentos ou exames de diagnóstico.

Quaisquer dúvidas podem ser tiradas com os pesquisadores responsáveis pela pesquisa nos telefones fornecidos neste termo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento.

Assinatura do participante ou responsável

Liline Maria Soares Martins
Pesquisadora Responsável- UFPI/UESPI

Herion Alves da Silva Machado
Mestrando - IDTNP