

Marcelo Alberti Paiva da Silva

*Centro Universitário Lusíada
Acadêmico do Curso de Biomedicina*

Luiz Henrique Gagliani

*Centro Universitário Lusíada
Professor Doutor responsável pelo Núcleo
Acadêmico de Estudos e Pesquisas em Saúde
de Pública
biogagliani@globo.com*

DIAGNÓSTICO E PREVALÊNCIA DA MENINGITE CRIPTOCOCÓCICA EM PACIENTES PORTADORES DA SINDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA – SIDA

RESUMO

A criptococose é um fungo oportunista causada por *Cryptococcus neoformans*, uma doença infecciosa cosmopolita que acomete o homem, animais domésticos e silvestres. Este patógeno é frequentemente isolado de excrementos de pombos e psitacídeos, possuindo inúmeras fontes ambientais. A infecção ocorre por inalação de esporos e a doença se manifesta principalmente indivíduos imunocomprometidos. O objetivo do trabalho é estudar as melhores possibilidades de diagnóstico, além de verificar a prevalência das pessoas imunocomprometidas, possuindo principalmente o vírus HIV, que possui infecção do *Cryptococcus neoformans*. A microscopia direta, cultura, sorologia, e, atualmente, são descritas técnicas moleculares para identificação do patógeno. A identificação definitiva é feita mediante provas morfológicas, produção de urease e fenol-oxidase em meios diferenciais (L-dopa, sementes de girassol ou alpiste), assimilação de fontes de carbono e de nitrogênio. O diagnóstico sorológico se baseia na detecção de antígeno polissacarídico no soro ou líquido, mediante técnica de aglutinação com partículas de látex. O diagnóstico por meio de técnicas moleculares tem apresentado resultados satisfatórios. O atraso no diagnóstico e as dificuldades em controlar a infecção são importantes causas de mortalidade e morbidade.

Palavras-Chave: *Cryptococcus neoformans*, criptococose, diagnóstico laboratorial.

ABSTRACT

Cryptococcosis is an opportunistic mycosis caused by *Cryptococcus neoformans*, a cosmopolitan infectious disease that affects humans, domestic and wild animals. This pathogen is frequently isolated from droppings of pigeons and parrots, with many environmental sources. Infection occurs by inhalation of spores and the disease manifests itself mainly in immunocompromised individuals. The aim of the study is the best diagnostic options, and determines the prevalence of people immunocompromised especially having the HIV virus, which has infection of *Cryptococcus neoformans*. The direct microscopy, culture, serology, and currently are described molecular techniques to identify the pathogen. The final identification is made by morphological evidence, production of urease and phenol oxidase in differential media (L-dopa, sunflower seeds or birdseed), assimilation of carbon and nitrogen. The serological diagnosis is based on the detection of polysaccharide antigen in serum or CSF by technical agglutination of latex particles diagnosis through molecular techniques has shown satisfactory results. The delay in diagnosis and the difficulties in controlling the infection are important causes of mortality and morbidity.

Keywords: *Cryptococcus neoformans*, cryptococcosis, laboratory diagnosis.

INTRODUÇÃO

O *C. neoformans* foi isolado pela primeira vez em 1894 por Francesco Sanfelice que estudava blastomicetos do suco de algumas frutas, dando o nome em 1895 para o fungo de *Saccharomyces neoformans*. Este trabalho marcou o início do estudo do *Cryptococcus*, no qual teve sua publicação na Revista do Instituto de Higiene da Universidade do Cagliari, Itália (MAFRA et al, 2008).

A partir da década de 80, com a pandemia de uma nova doença causada pelo HIV (vírus da imunodeficiência humana), a SIDA (Síndrome da Imunodeficiência adquirida) e da utilização de fármacos imunossupressores, houve um aumento na incidência da criptococose, sendo essa, atualmente, uma das principais infecções fúngicas que acomete pacientes com SIDA.

A SIDA é uma doença universal, por apresentar uma fácil disseminação e os principais fatores que facilitam a propagação da doença é a transmissão sexual e a transmissão vertical de mãe para filho no nascimento e através do leite materno.

No Brasil, os primeiros relatos da doença ocorreram nos anos de 1941 e 1944, descritos por Floriano de Almeida e Carlos da Silva. (PAULO e cols. 2008). Estima-se que no Brasil existam 630 mil pessoas vivendo com o HIV. O Brasil apresentou 492.581 casos de SIDA notificados no SINAN no período de 1980 a junho de 2010.

Estudos atuais classificaram a levedura *Cryptococcus neoformans* em cinco sorotipos, A, B, C, D e AD que se encontram distribuídos em três variedades, a *C. neoformans* variedade *gattii* (sorotipos B, C) *C. neoformans* variedade *neoformans* (sorotipos A, AD, D), e *C. neoformans* variedade *grubii* (sorotipo A) essas variedades se diferenciam devido seus aspectos bioquímicos, ecológicos, antigênicos e genéticos (MAFRA et al, 2008).

A criptococose é uma doença global, encontrado em todos os continentes, com exceção das regiões polares. Atualmente é considerada a segunda infecção oportunista mais frequente que acometem pacientes portadores de HIV. Vive como saprófita no solo, frutas, tecidos, secreções (como leite de vaca), excreções de animais e homem (CASALI A.K., et al, 2001).

Em relação ao gênero, os homens apresentam cerca de 70% dos casos e as mulheres 30%, esse índice pode estar relacionado à influência de estrógenos ou a exposições ocupacionais (MAFRA et al, 2008).

A faixa etária de maior incidência de entre 30 e 50 anos de idade. No Brasil, os números de casos relacionados a crianças aumentaram nos últimos anos, esse aumento pode estar ligado à desnutrição ou ao aumento do número de crianças imunocomprometidas (CASALI et al, 2001).

O principal determinante de doenças causadas por HIV é o tropismo do vírus por células T e macrófagos que expressam CD4. A imunossupressão induzida pelo HIV resulta da redução no número de células T CD4, o diminuindo as funções auxiliares e de hipersensibilidade tardia da resposta imune. A doença apresenta dois estágios, o primeiro delimitado ao sistema respiratório principalmente em indivíduos imunocompetentes e um segundo onde há disseminação pela via hematogênica, com predomínio de paciente imunocomprometidos. (CASALI et al, 2001).

O contato inicial com o hospedeiro se dá através da inalação de propágulos viáveis aerossolizados provenientes de fontes saprófitas ambientais, uma vez inalados os esporos se alojam no trato respiratório superior, principalmente na cavidade nasal, ou se depositam nos alvéolos pulmonares, sendo a penetração pela pele e mucosa, embora possível, rara.

A realização da microscopia direta é considerada o principal diagnóstico a ser realizado para detecção de fungos, onde a mesma apresentará um modo qualitativo indicando presença ou ausência da levedura encapsuladas, *Cryptococcus neoformans* (CASALI et al, 2001).

O corante mais utilizado na microscopia é a tinta de nanquim conhecida como “tinta da china”, na qual é composta a base de carbono, deixando o fundo da lâmina com coloração negra e o fungo com coloração esbranquiçada. Pois a levedura apresenta uma cápsula muito espessa e devida esse fator a tinta não penetra no interior do fungo. O meio mais utilizado na cultura de fungos é o ágar Sabouraud podendo conter glicose ou cloranfenicol (inibe o crescimento de bactérias) sendo assim um meio seletivo, se adicionar no meio de ágar Sabouraud 1% de solução de peptona ocorre produção de material capsular.

A pleocitose é bastante comum entre pessoas com HIV positivo em todos os estágios da doença, têm uma elevação modesta na proteína do liquor cefalorraquidiano. A contagem de células sanguíneas brancas no liquor (LCR) frequentemente está alterada, geralmente exibindo uma linfocitose moderada (CASALI et al, 2001).

Um teste bioquímico muito empregado para diferenciar o *Cryptococcus* sp dos demais gêneros, onde o mesmo possui a capacidade de hidrolisar a uréia, essa hidrólise ocorre através da produção da enzima chamada uréase pela levedura e essa enzima é capaz de hidrolisar a uréia em amônia e gás carbono.

Os métodos de identificação moleculares são mais recentes e são úteis em estudos epidemiológicos, para a identificação da variedade, do sorotipo, e variações individuais de cepas (CASALI et al,2001).

O PCR apresenta diversos tipos de metodologia, porém as mais amplamente utilizadas para identificação de *C. neoformans* e *C. gattii* são: PCR multiplex, PCR em tempo real e nested PCR, sendo a PCR fingerprinting,

Devido o tropismo do *Cryptococcus* sp de atingir o sistema nervoso central, a tomografia se torna importante tanto para diagnosticar (indicar lesão encefálica), como o acompanhamento do quadro da doença.

A utilização de teste sorológico é um importante método para diagnóstico de criptococose, o teste sorológico pode ser realizado tanto para detectar antígenos, principalmente capsular, como a pesquisa de anticorpos formados pelo paciente contaminado.

SIDA (SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA)

HISTÓRICO

No início da década de 80, o surgimento de uma nova doença, que posteriormente, foi identificada como uma síndrome, conhecida mundialmente pela sigla SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) foi responsável por mudanças significativas em outros campos que não somente a saúde, principalmente por combinar comportamento sexual e doença. O desafio de combate à doença se instalou em diferentes áreas do conhecimento além das ciências biomédicas, tais como: economia, antropologia, política, direitos humanos, dentre outros (NOVELINO,1993).

Os primeiros casos conhecidos de SIDA (entre 77 e 78) ocorreram nos Estados Unidos, Haiti e África Central. Nesta ocasião, os segmentos da população atingidos, denominados "grupos de risco" e concentradas nos grandes centros urbanos, foram os homossexuais, os receptores de sangue e de hemoderivados e os usuários de drogas injetáveis (UDI) (NOVELINO,1993).

Com a visão de uma doença restrita ao então chamado Grupo dos 4 H, a adoção de medidas preventivas por parte dos organismos governamentais só ocorreu quando a aids foi caracterizada como uma epidemia.

Paralelamente, a população atingida foi sendo ampliada, como foi o caso de crianças, mulheres, usuários de drogas ou indivíduos expostos a sangue e a hemoderivados (FUNDAÇÃO SEADE,1997).

A SIDA foi identificada pela primeira vez no Brasil em 1980. Inicialmente restrita às nossas grandes metrópoles, como Rio de Janeiro e São Paulo, iniciou a sua expansão para outras capitais e o para interior do País a partir da segunda metade da década de 80. Em 2000, cerca de 60% dos municípios brasileiros registravam pelo menos um caso da doença. Na década seguinte, o crescimento da epidemia foi indiscutível. A taxa de incidência da aids sofreu uma considerável variação de mais de 50%, passando de 8,2 (1991) para 11,2 (1999) casos por 100 mil habitantes (BASTOS, e SZWARCOWALD,2005).

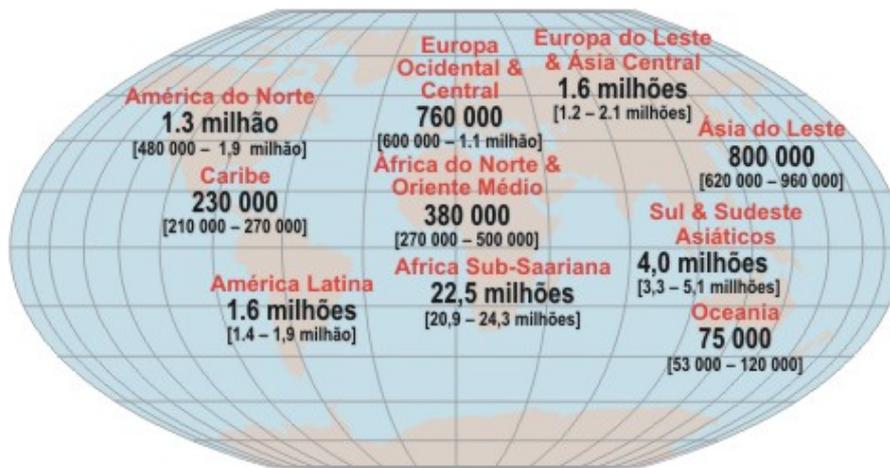
ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA SIDA

A SIDA é uma doença universal, por apresentar uma fácil disseminação e os principais fatores que facilitam a propagação da doença é a transmissão sexual e a transmissão vertical de mãe para filho no nascimento e através do leite materno (Boletim Epidemiológico, 2010).

Em 1985, apresentava-se uma relação de que para cada 25 homens contaminados para uma mulher na mesma situação. Atualmente estima-se que a relação é de dois homens para uma mulher. A única faixa etária em que o sexo feminino ultrapassou o masculino em número de soropositivos é dos 13 aos 19 anos. Para cada menino portador do HIV, duas meninas estão com o vírus. Nos pacientes com menos de 13 anos a transmissão pré-natal foi responsável por 73% dos casos, a sanguínea por 17% e a sexual por 0,5% (MINISTERIO DA SAÚDE, 2010).

Apesar dos cuidados de prevenção e da recente melhoria do acesso ao tratamento antirretroviral, a pandemia da AIDS teve uma mortalidade de cerca 2,1 milhões de pessoas em 2007, sendo que 330.000 pessoas eram menores de 15 anos. A prevalência ano de 2007, era cerca de 33,2 milhões de pessoas portadoras do HIV, sendo 2,5 milhões eram crianças. Estima-se que a incidência em 2007 foi de 2,5 milhões (MINISTERIO DA SAÚDE, 2010).

Figura 1 - Casos de HIV no mundo.



Fonte: <<http://www.aidsbrasil.com/epidemiologia/07>>. Acesso em 12/07/2011.

Em 2007, a África Subsaariana continha 68% de todas as pessoas do mundo infectadas com vírus da AIDS e 76% de todos os óbitos por AIDS, com incidência de 1,7 milhões levando o número de pessoas com HIV para 22,5 milhões, com 11,4 milhões óbitos (MINISTERIO DA SAÚDE, 2010).

Na África Subsaariana, a África do Sul possui o maior número de portadores do HIV do mundo, seguida pela Nigéria e pela Índia. O Sul e o Sudeste da Ásia são as segundas regiões mais afetadas. Estima-se que 18% da população são portadoras do vírus e cerca de 300.000 óbitos devido à doença. A Índia possui cerca de 2,5 milhões de infecções e uma prevalência estimada de adultos de 0,36% (MINISTERIO DA SAÚDE, 2010).

No Brasil os primeiros casos relatados ocorreram na Região Sudeste em 1982. Estima-se que no Brasil existam 630 mil pessoas vivendo com o HIV. Desde 1980 (o início da epidemia) até junho de 2009, foram registrados 217.091 óbitos em decorrência da doença. Cerca de 33 mil a 35 mil novos casos da doença são registrados todos os anos no país. A região Sudeste tem o maior percentual (59%) do total de notificações por ser a mais populosa do país, com 323.069 registros da doença. O Sul concentra 19% dos casos; o Nordeste, 12%; o Centro-Oeste, 6%; e a região Norte, 3,9%. Dos 5.564 municípios brasileiros, 87,5% (4.867) registraram pelo menos um caso da doença (MINISTERIO DA SAÚDE, 2010).

Dados apresentados pelo Departamento de DST, SIDA e Hepatites Virais do ano de 2010 mostram que as prevalências de infecção pelo HIV no Brasil em relação a gênero e idade são de 0,6% na população de 15 a 49 anos de idade (0,4% nas mulheres e 0,8% nos homens), 0,12% nos jovens do sexo masculino de 17 a 20 anos de idade e 0,28% em mulheres jovens de 15 a 24 anos. Nas populações vulneráveis, as prevalências são mais elevadas e destacam-se aquelas entre usuários de drogas ilícitas (5,9%), homossexuais do sexo masculino (10,5%)⁴ e mulheres profissionais do sexo (5,1%).(MINISTERIO DA SAÚDE, 2010)

No ano de 2009 foram identificados, no banco relacionado, 3.398 casos de SIDA em jovens de 13 a 24 anos de idade; a taxa de detecção foi de 8,3 casos por 100.000 habitantes, sendo 1.875 casos no sexo masculino (9,1/100.000 habitantes) e 1.523 no feminino (7,5/100.000 habitantes). A razão de sexos, que era de 3,7: 1 (37 homens para cada 10 mulheres) em 1990, caiu para 1,1:1 (11 homens para cada 10 mulheres) em 1998, culminando com a inversão dessa razão no ano 2000 (0,9:1 – 9 homens para cada 10 mulheres). Entretanto, entre 2007 e 2009, os jovens do sexo masculino voltam a ter maior participação nos casos de SIDA. (MINISTERIO DA SAÚDE, 2010)

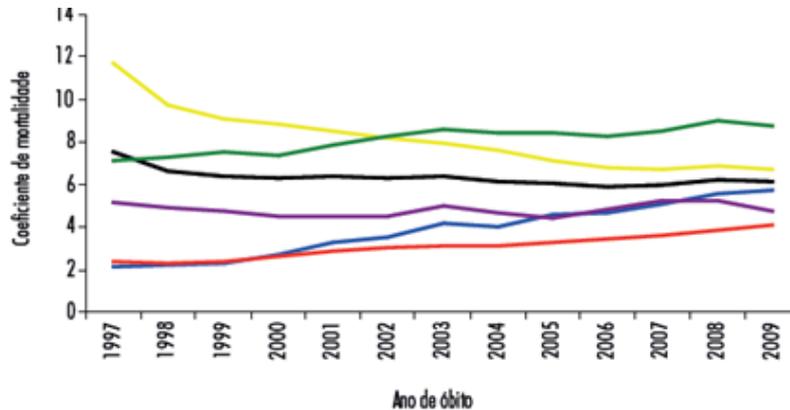
A distribuição dos casos segundo as regiões, em 2009, mostra que 38,2% dos casos encontram-se na Região Sudeste, seguida do Nordeste (21,9%), Sul (21,1%), Norte (11,1%) e Centro-Oeste (7,7%). Embora a Região Sudeste apresente maior número de casos em 2009, o Sul destaca-se com a maior taxa de detecção nesse ano, 12,6/100.000 habitantes. A maior proporção dos casos de SIDA nos jovens de 13 a 24 anos de idade, em ambos os sexos, está atribuída à categoria de exposição sexual, sendo 73,8% no sexo masculino e 94,0% no sexo feminino, no ano de 2009 (MINISTERIO DA SAÚDE, 2010).

O número de óbitos em jovens de 1998 a 2009 foi de 7.443, sendo 58% no sexo masculino e 42% no sexo feminino. Nos últimos dez anos, o país tem registrado uma média de 589 óbitos por ano entre os jovens, apresentando uma redução de 31,6% no coeficiente de mortalidade de 1999 (1,9 óbitos por 100.000 habitantes) para 2009 (1,3/100.000 habitantes) (MINISTERIO DA SAÚDE, 2010).

O Brasil apresentou 492.581 casos de SIDA notificados no SINAN no período de 1980 a junho de 2010. A metodologia de relacionamento dos bancos de dados proporcionou um incremento de 37% em relação aos casos de

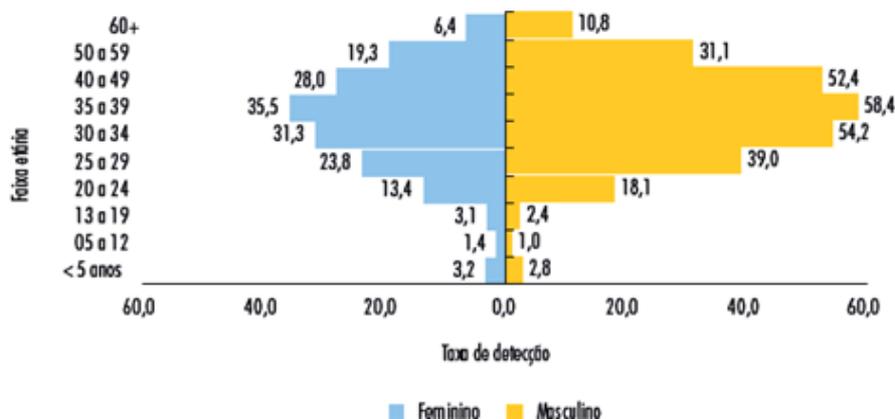
SIDA notificados no SINAN, o que resulta em 592.914 casos identificados no período de 1980 até junho de 2010. Esse incremento, quando estratificado por região, mostra um percentual de 54% de registros ausentes no banco de dados de SIDA do SINAN na Região Norte, 47% no Nordeste, 35% no Sudeste, 33% no Sul e 32% no Centro-Oeste, no período de 2000 a junho de 2010. A análise por regiões demonstra que entre 1980 e junho de 2010 foram identificados 344.150 casos de SIDA na Região Sudeste (58,0% dos casos acumulados no Brasil), 115.598 casos no Sul (19,5%), 74.364 casos no Nordeste (12,5%), 34.057 casos no Centro-Oeste (5,7%) e 24.745 casos na Região Norte (4,2%) (MINISTERIO DA SAÚDE, 2010).

Figura 2 - Coeficiente de mortalidade (por 100000) dos casos de SIDA, Brasil, 1997- 2009.



Fonte: MINISTERIO DA SAÚDE, 2010.

Figura 3 - Taxa de detecção (por 100000) de casos de SIDA segundo faixa etária e sexo. Brasil, 2009.



Fonte: MINISTERIO DA SAÚDE, 2010.

Em 2009, foram notificados 20.832 casos de SIDA no SINAN e identificados 38.538 casos no banco relacionado. Nesse ano, a taxa de detecção de SIDA no Brasil foi de 20,1 casos por 100.000 habitantes, sendo 32,4 casos na Região Sul, 20,4 no Sudeste, 20,1 no Norte, 18,0 no Centro-Oeste e 13,9 no Nordeste. A Região Sudeste contribuiu de forma mais expressiva para os valores elevados das taxas de detecção no país; porém, a partir de 2007, nota-se que a Região Sul passa a ter maior participação nesse valor elevado. A diminuição da detecção dos casos na Região Sudeste influencia de forma determinante a estabilização da taxa do país (MINISTERIO DA SAÚDE, 2010).

Sobre a distribuição da SIDA quanto à raça/cor, no ano de 2009 foram notificados 9.942 (47,7%) casos na raça branca, 7.454 (35,8%) na parda, 2.290 (11,0%) na preta, 103 (0,5%) na amarela e 53 (0,3%) na raça indígena. Nota-se uma importante melhoria da qualidade dessa informação, demonstrada por meio da redução do número de casos ignorados em relação à raça/cor. No ano 2000, havia 47,3% ignorados, proporção que diminuiu dez vezes no ano de 2009, passando para 4,7% casos ignorados. Uma estabilização dos casos ignorados pode ser visualizada a partir de 2007, com percentuais que não ultrapassam 4,7%. Quanto à escolaridade, em 2009, 25,1% do total de indivíduos notificados possuíam entre 4 e 7 anos de estudo, 30,0% entre 8 a 11 anos e 8,8% entre 1 a 3 anos. Observa-se uma tendência de aumento da escolaridade entre os indivíduos notificados com SIDA no país, mais especificamente a partir do ano de 1999. O total de óbitos declarados no SIM, no período de 1980 a 2009, tendo como causa básica a SIDA foi de

229.222, sendo a maioria deles (65,1%) concentrada na Região Sudeste. O coeficiente de mortalidade por SIDA, padronizado em 2009, foi de 6,2 óbitos por 100.000 habitantes, com tendência de diminuição desse coeficiente desde 1997 até 2004, ano em que o coeficiente se estabilizou. De acordo com o sexo, constata-se que, no ano de 2009, o coeficiente de mortalidade no sexo masculino foi duas vezes maior que no sexo feminino, com valores de 8,2 e 4,2 por 100.000 habitantes, respectivamente (MINISTERIO DA SAÚDE, 2010).

FISIOPATOLOGIA – SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA

O principal determinante e doenças causadas pelo vírus HIV – 1 é o tropismo do vírus por células T e macrófagos que expressam CD4. A imunossupressão induzida pelo HIV resulta da redução no número de células T CD4, o diminui as funções auxiliares e de hipersensibilidade tardia da resposta imune.

Durante a transmissão sexual, o vírus atinge a superfície da mucosa e rapidamente infecta as células do tecido linfóide associadas à mucosa (MALT). Os estágios iniciais de infecção são medidos pelos vírus M- trópicos, que se ligam ao CD4 e ao receptor de quimocinas CCR5 e infectos as células dendríticas e outras células da linhagem de monócitos- macrófagos, assim como células T do sangue periférico. Indivíduos deficientes de receptores CCR5 também são mais resistentes à infecção pelo vírus, e a ligação de CCR5 é um alvo para drogas antivirais. O vírus HIV – 1 se liga e pode permanecer na superfície de células dendríticas (DCs), incluindo DCs foliculares através de uma molécula de lectina, a DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin), promovendo assim a infecção de células T CD4. Macrófagos e células dendríticas são infectados persistentemente pelo HIV, e são provavelmente os principais reservatórios e meios de distribuição do HIV. A mutação do gene *env* para a *gp 120* muda o tropismo do vírus M-trópico (R5) para T- trópico (vírus X4). A *gp 120* do vírus T- trópico se liga ao CD4 e ao receptor de quimocinas CXCR4. Alguns vírus podem usar ambos os receptores (R5X4). Tardiamente, com a progressão da doença, ocorre preferência de ligação ao receptor CXCR4, que está correlacionado com a progressão da doença (TABORDA, 2009).

Reduções no número de células CD4 podem resultar da citólise direta induzida pelo HIV, citólise imune induzida por células T citotóxicas ou ativação crônica em resposta ao grande desafio dos antígenos do HIV, levando rápida diferenciação terminal e morte de células T. a eliminação de células T expressando CCR5 depleta de células T CD4 do tecido linfóide associado ao intestino. O desenvolvimento dos sintomas da SIDA se correlaciona com a liberação aumentada do vírus no sangue, um aumento do vírus T-trópico e uma diminuição das células T CD4. Assim se observa um decréscimo subsequente do número total de células T (células expressando CD3), devido à ausência da função do T CD4 (TABORDA, 2009).

O vírus HIV – 1 induz diversos efeitos citopatológicos que podem destruir as células T infectadas. Estes incluem um acúmulo de cópias do genoma de DNA circular não integrado, um aumento na permeabilidade da membrana plasmática, formação de sincícios e indução de apoptose. A capacidade relativa do HIV de destruir a célula alvo se correlaciona à quantidade de CD4 expressa pela célula. Os macrófagos podem ser poupados da ação citolítica do vírus porque expressam menos CD4 que as células T. das proteínas acessórias do HIV são importantes para replicação e virulência. A proteína *nef* parece ser essencial para promover a progressão da infecção HIV para a SIDA. Indivíduos infectados com mutantes naturais de *nef* apresentam um tempo maior de sobrevivência que o esperado (TABORDA, 2009).

A resposta imune contra o HIV restringe a infecção viral, mas contribui para a patogênese. Anticorpos neutralizantes são gerados contra *gp120* e participam de respostas de citotoxicidade celular dependente de anticorpos. O vírus recoberto por anticorpos, entretanto, é infeccioso e é capsulado por macrófagos. As células T CD8 são fundamentais para o controle da progressão da doença pelo HIV. Estas células podem destruir células infectadas por ação citotóxica direta e pela produção de fatores supressores que restringem a replicação viral, incluindo quimocinas que também bloqueiam a ligação do vírus ao seu coreceptor. Entretanto, as células T CD8 requerem ativação por células T CD4, seu número diminui juntamente com o de células T CD4 e essa redução se correlaciona com a progressão para SIDA, sendo um indicador dessa progressão. O HIV possui diversas maneiras de escapar ao controle imune. A mais significativa é a capacidade do vírus sofrer mutações e, portanto, alteram sua antigenicidade e escapa à eliminação (TABORDA, 2009).

Características do Fungo *Cryptococcus neoformans*

Agente etiológico causador da doença criptococose, atingindo principalmente pessoas imunocomprometidas.

Histórico

O *C. neoformans* foi isolado pela primeira vez em 1894 por Francesco Sanfelice que estudava blastomicetos do suco de algumas frutas, dando o nome em 1895 para o fungo de *Saccharomyces neoformans*. Este trabalho marcou o início do estudo do *Cryptococcus*, no qual teve sua publicação na Revista do Instituto de Higiene da Universidade do Cagliari, Itália. No mesmo ano, na Alemanha, outro pesquisador, Busse, relatava o primeiro caso de criptococose sob forma de lesão óssea, similar ao sarcoma. Busse isolou, de um paciente que apresentava periosteíte crônica da tíbia, uma levedura que a nomeou de *Saccharomyces sp.*, sendo estudada no ano seguinte por Buschke (CASALI et al, 2001).

Em 1901, Constantin identificou a espécie do gênero *Saccharomyces* como *S. hominis*, agente da chamada blastomicose européia. No mesmo ano Vuillemin, reclassificou o gênero *Saccharomyces* para *Cryptococcus*, mostrando que o termo *Saccharomyces* era inadequado, pois não havia formação de ascósporos nem fermentação nos isolados da levedura. Nos Estados Unidos, Stoddard & Cutler em 1916 observaram casos de blastomicose com lesões nervosas ou cutâneas, de onde isolaram uma levedura que denominaram de *Torula histolytica*. Em 1935, outro pesquisador, Benham, reavaliou os isolados classificados como *Saccharomyces*, *Torula* e *Cryptococcus*, através de sua patogenicidade, morfologia e reatividade frente a fatores séricos, obteve a conclusão que todas as leveduras descritas anteriormente pertenciam a um só gênero e espécie. Posteriormente, Benham, propôs a designação *Cryptococcus neoformans*, tornando-se o nome definitivo da levedura encapsulada (CONTIN et al, 2011).

Na década de 50 foi estabelecido o nome da doença de criptococose e foram identificados os focos de contaminação, no qual se descobriu a presença da levedura em solo, ninho e excretas de pombos. Emmons (2007), através dos seus estudos demonstrou a relação saprobiótica de *C. neoformans* com matéria orgânica rica em excreta de aves, ninhos e solos contaminados particularmente de fezes secas de pombos, tornou-se evidente a distribuição pelo mundo e nas regiões urbana do fungo (PAULO. 2008).

A criptococose em humanos era considerada uma doença rara, geralmente relacionada, com uma deficiência na imunidade celular, apresentando uma pequena incidência de casos atingindo a população (CONTIN et al, 2011).

A partir da década de 80, com a pandemia de uma nova doença causada pelo HIV(vírus da imunodeficiência humana) SIDA(Síndrome da Imunodeficiência adquirida) e da utilização de fármacos imunossupressores, houve um aumento na incidência da criptococose, sendo essa, atualmente, uma das principais infecções fúngicas que acomete pacientes com SIDA (RIBEIRO et al, 2007).

No Brasil, os primeiros relatos da doença ocorreram nos anos de 1941 e 1944, descritos por Floriano de Almeida e Carlos da Silva (CONTIN, 2011).

Epidemiologia da Criptococose

Estudos atuais classificaram a levedura *Cryptococcus neoformans* em cinco sorotipos, A, B, C, D e AD que se encontram distribuídos em três variedades, a *C. neoformans* variedade *gattii* (sorotipos B, C) *C. neoformans* variedade *neoformans* (sorotipos A, AD, D), e *C. neoformans* variedade *grubii* (sorotipo A) essas variedades se diferenciam devido seus aspectos bioquímicos, ecológicos, antigênicos e genéticos (GAZZONI, 2007).

Figura 4 – (esquerda) Acumulo de fezes de pombos em zonas urbanas; (direita) Cativeiro de pombos correios em favorecendo desenvolvimento de *C. neoformans*.



Fonte: COSTA, A. K. F., 2007.

A criptococose é uma doença global, encontrado em todos os continentes, com exceção das regiões polares. Atualmente é considerada a segunda infecção oportunista mais frequente que acometem pacientes portadores de HIV. Vive como saprófita no solo, frutas, tecidos, secreções (como leite de vaca), excreções de animais e homem (GAZZONI, 2007).

Existem diferenças em relação às variantes *Cryptococcus neoformans* variedade *neoformans* e do *Cryptococcus neoformans* variedade *gattii* (COSTA, 2007).

O *Cryptococcus neoformans* variedade *neoformans* possui distribuição universal, apresentando um domínio nas regiões de clima temperado e frio, em áreas urbanas. Estudos apontam que os pombos não apresentam manifestações clínicas, esse fato provavelmente possa estar relacionado à alta temperatura corporal (entre 40 e 42° C), mas são considerados propagadores da doença. Nas fezes de pombo pode haver concentração de até 107 fungos/grama (GAZZONI, 2007).

O *Cryptococcus neoformans* variedade *gattii* é encontrado principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, em áreas rurais. É localizado em habitat específico relacionado com a árvore do *Eucalyptus camaldulensis*. Ambos as variantes ocorre principalmente em pacientes imunodeprimidos. Em relação ao gênero, os homens apresentam cerca de 70% dos casos e as mulheres 30%, esse índice pode estar relacionado à influência de estrógenos ou a exposições ocupacionais (COSTA, 2007).

A faixa etária de maior incidência esta entre 30 e 50 anos de idade. No Brasil, os números de casos relacionados a crianças aumentaram nos últimos anos, esse aumento pode estar ligado à desnutrição ou ao aumento do número de crianças imunocomprometidas. As estatísticas não apontam diferença numérica em relação à raça ou ocupação. No passado a criptococose era considerada uma doença rara e fatal, na atualidade deve ser considerada frequente e curável. O crescente aumento da frequência da doença deve-se a diversos fatores importantes, por exemplo, maior conscientização a respeito da doença, as melhores condições diagnósticas, renovados fatores de risco (SIDA, uso de imunossuppressores, etc) (GAZZONI, 2007).

No mundo é estimado que 25% a 30% de indivíduos com SIDA têm como consequência a meningite por *Cryptococcus* sp. Dentre as infecções fúngicas, a criptococose é a principal responsável pela morbidade e mortalidade destes pacientes (QUEIROZ, et al, 2008).

No mundo todo, entre os cinco sorotipos, o sorotipo A é o mais comum a ser isolado, sendo identificado em até 90% dos casos, seguido pelos sorotipos B e AD. Os sorotipos D e C são menos relatados, exceto em algumas áreas dos Estados Unidos (Califórnia e Nova Iorque), alguns países europeus e Ásia, no qual os sorotipos D e C são considerados os menos patogênicos. Sua incidência varia em diferentes partes do planeta apresentando-se mais de 20% na África Central e leste da Ásia e entre 5 a 10% na Europa Ocidental e Estados Unidos (QUEIROZ, et al, 2008).

Estudos realizados entre os anos de 1999 e 2003 mostram a incidência da doença por *C. gattii* em Vancouver, Canadá, os índices relatados foram de 37 casos por milhão de residentes por ano. A taxa nesses anos apresentou significativamente maior do que tipicamente é observado na Austrália (0,94 por milhão de residentes por ano), onde *C. gattii* é endêmico (GAZZONI, 2007).

O número crescente de pacientes portadores de HIV no Brasil favorece ao aumento das infecções causadas por este fungo patogênico. De acordo com a Coordenação Nacional de DST/AIDS do Ministério da Saúde, no período entre 1980 e 2002, 6% das infecções oportunistas associadas à SIDA foram causadas por *C. neoformans* e *C. gattii*. No Brasil, estudos pioneiros de Lacaz & Rodrigues, em 1983, mostraram que a maioria (64%) de 25 amostras

biológicas analisadas pertencem à variedade neoformans com prevalência do sorotipo A, seguido pelo sorotipo B e D. Mais recentemente, de acordo com Nishikawa et al. (2003), o sorotipo A tem-se mostrado prevalente nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, tanto em isolados clínicos quanto ambientais, enquanto nas regiões Norte e Nordeste, o sorotipo B predomina em todos os isolados (QUEIROZ, et al, 2008).

No Ceará, estudos sobre a epidemiologia da criptococose são escassos e os casos descritos são apenas em nível de espécie, portanto, dados sobre os sorotipos são inexistentes ou não reportados. Dentre os únicos estudos realizados sobre o tema, destaca-se o de Menezes et al. (2002) no Hospital São José, centro de referência de doenças infecciosas no Estado do Ceará, 54 amostras de líquor oriundas de indivíduos síditicos com sinais e sintomas de meningite foram analisadas por meio de exame direto com tinta da China, cultura em Ágar Sabouraud 2%, prova da urease e assimilação de inositol. Entre as amostras estudadas, 5 (9,25%) foram consideradas positivas e classificadas como *C. neoformans*. Enquanto *C. neoformans* possui ampla distribuição, o *C. gattii* possui distribuição mais restrita, estando geralmente associado a áreas tropicais e subtropicais (CONTIN et al, 2011).

Dos casos relatados na América do Sul, a prevalência de *C. gattii* é considerada uma das mais altas no Brasil, parecendo esta espécie ser endêmico na região Nordeste, representando 62,7 a 91,2% dos casos (CONTIN et al, 2011).

Na cidade de Campo Grande foi comprovada a contaminação de excretas de aves de cativeiro por *C. neoformans* var. *neoformans* sorotipo A. Foram observadas elevadas concentrações de até 46.000 propágulos viáveis do fungo por grama de material seco, revelando a existência de fontes ambientais na forma de microfocos deste fungo (COSTA,2007).

Nestes locais pode haver dispersão desse fungo no ar e, conseqüentemente, inalação. O nível de contaminação observado pode estar relacionado à grande movimentação de aves nas gaiolas, a utilização de uma mesma para higienização das gaiolas ou viveiros, e a presença de substrato para o crescimento do fungo como sementes de Níger, painço, alpiste e girassol nos locais (COSTA,2007).

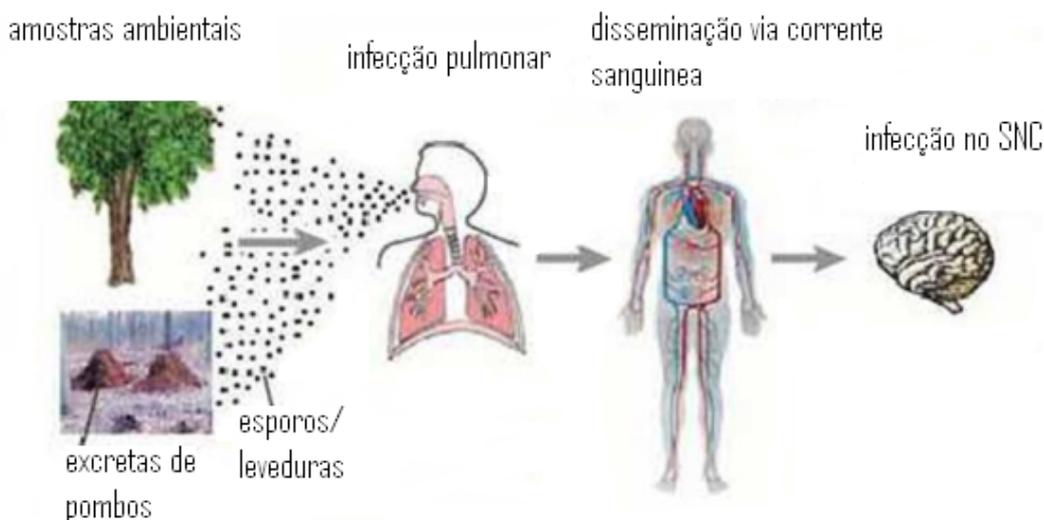
No Pará, há fortes indícios de que a criptococose continua a ser pouco diagnosticada, situação que se reverterá quando incluída com mais freqüência no diagnóstico diferencial de diversas enfermidades, como neoplasias pulmonares e neurológicas; infecções respiratórias crônicas; meningoencefalites, principalmente as de suposta etiologia viral, tuberculosa e sífilítica; abscesso cerebral; febre prolongada de etiologia obscura; e lesões ósseas supostamente metastáticas e que, além disto, haja adequados recursos laboratoriais (COSTA,2007).

Fisiopatologia da Criptococose

A doença não apresenta fonte de infecção característica, pois o fungo se mantém na natureza através da sua multiplicação no próprio ambiente, e não em um hospedeiro animal vertebrado. O contato inicial com o hospedeiro se dá através da inalação de propágulos viáveis aerossolizados provenientes de fontes saprofíticas ambientais, uma vez inalados os esporos se alojam no trato respiratório superior, principalmente na cavidade nasal, ou se depositam nos alvéolos pulmonares, sendo a penetração pela pele e mucosa, embora possível, rara (TABORDA, 2009).

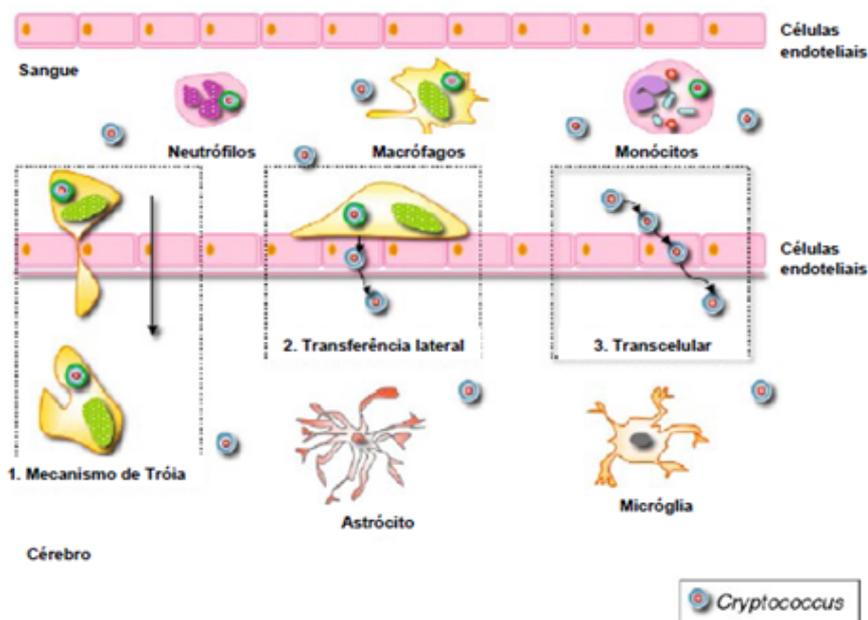
O fungo chega ao pulmão após a inalação de partículas fúngicas em suspensão aérea, nas formas de basidiosporos e/ou leveduriformes não capsuladas ou esparsamente capsuladas, atingem as vias respiratórias, o que pode acarretar em pneumonia fúngica. Com a infecção e a multiplicação do agente nas vias aéreas ocorre o desenvolvimento da cápsula, importante fator de virulência, que interfere na resposta imunológica do hospedeiro. A cápsula encobre os antígenos da levedura e impede a sua apresentação aos macrófagos o que evita a fagocitose e a sua destruição por polimorfonucleares e macrófagos, dificultando a ação do sistema imune (TABORDA, 2009).

Figura 5 - Esquemática sobre mecanismo de infecção do fungo.



Fonte: GARCIA, L. C., 2008.

Figura 6 - Possíveis rotas utilizadas por *C. neoformans* para ultrapassar a barreira hematoencefálica (1) mecanismo de "cavalo de troia"; (2) transferência lateral de macrófagos para células endoteliais; e (3) travessia de leveduras isoladas por uma via transcelular.



Fonte: GARCIA, L. C., 2008.

A partir da infecção pulmonar ocorre a disseminação do *Cryptococcus neoformans*, via hematogênica ou linfática, existindo um tropismo pelo sistema nervoso central (SNC), globo ocular, linfonodos e tecido cutâneo ainda podendo chegar aos rins e ossos, especialmente em pacientes com imunidade celular comprometida. Além da via hematogênica pode haver o acesso ao SNC a partir da cavidade nasal por contiguidade, através da lâmina crivosa (PEDROSO, CANDIDO, 2006).

As alterações anatomopatológicas caracterizam-se pela atividade histolítica do fungo e pela escassa, inespecífica e polimorfa reatividade dos tecidos frente à agressão, determinando que as lesões sejam geralmente do tipo necrótica. Algumas vezes, as lesões teciduais adquirem grandes proporções podendo simular uma massa tumoral (PEDROSO, CANDIDO, 2006).

A resposta inflamatória é mínima, histologicamente as lesões aparecem como grandes massas envolvidas por cápsulas com presença de leveduras e poucas células inflamatórias, podendo conter histiócitos, células epitelióides e algumas células gigantes, que caracterizam lesões do tipo granulomatosa (TABORDA, 2009).

Manifestações Clínicas da Criptococose

A criptococose atinge principalmente indivíduos adultos, sendo rara na infância. A doença apresenta dois estágios, o primeiro delimitado ao sistema respiratório principalmente em indivíduos imunocompetentes e um segundo onde há disseminação pela via hematogênica, com predomínio de paciente imunocomprometidos (TAKAHARA,2007).

A doença causada pelo *Cryptococcus* sp em pacientes com SIDA geralmente apresenta quadro clínico inespecífico e discreto. A doença não apresenta nenhum sinal ou sintoma localizado que facilite a orientação para o médico para diagnosticar a criptococose (TAKAHARA, 2007).

Zuger e equipe relataram 26 casos de paciente infectados que apresentaram sintomas durante uma variante de um dia a quatro meses, com mediana de 31 dias. Chuck e Sande, observaram a maior série de casos publicados, com 106 pacientes infectados pela doença, no qual dois terços apresentaram mal estar geral e febre cefaléia. Clark e colaboradores relataram mais recentemente em uma pesquisa com 68 pacientes, 57% dos pacientes apresentavam febre e 64% cefaléia (LEÃO,1997).

Aproximadamente 50% dos pacientes relataram náusea e vômito. Sintomas clássicos de irritação na meninge é a rigidez de nuca e fotofobia, estão presentes em menos de 20% a 30% dos pacientes. Déficits neurológicos focais ou convulsões em menos de 10% e alteração do estado mental é detectada em 14% a 28% dos casos (TABORDA, 2009).

Apesar de que a entrada do *C.neoformans* seja através da via respiratória, a criptococose pulmonar geralmente é clinicamente silenciosa, podendo assumir formas agudas, subagudas, crônicas. A maioria dos casos da infecção pulmonar é achada por acaso, pois não apresentam sinais e sintomas específicos do pulmão. As lesões podem ser bilaterais ou comprometer apenas um lobo. Infiltrado difuso e erupção de pequenos nódulos semelhante à tuberculose também são diagnosticados. A infecção pulmonar pode levar a insuficiência pulmonar e até a morte se não tratada adequadamente (TAKAHARA, 2007).

Chuck e Sande mencionaram que 31 % dos 106 pacientes, relataram queixas respiratórias. Clark et al. detectaram dispnéia e tosse em 27% de todos os pacientes portadores do HIV com a doença por *Cryptococcus*. Entre os pacientes que não apresentaram infecção no SNC, cerca de dois terços apresentam dispnéia e tosse, sendo que 18% daqueles pacientes que tiveram a doença no SNC apresentam sintomas respiratórios (TABORDA, 2009).

Esses dados reforçam que todos os pacientes com envolvimento do SNC têm ou tiveram infecção pulmonar antecedente. É comum que no desenvolvimento da doença haja hipertensão intracraniana e hidrocefalia; que são determinados geralmente pela diminuição da reabsorção do líquido cefalorraquidiano (LCR) aumento da sua produção e a oclusão das vias de circulação do mesmo (TAKAHARA,2007).

O *Cryptococcus* sp pode ser isolado não só no SNC e no pulmão, mas podem estar em uma menor frequência no trato gastrointestinal, medula óssea, sangue, no trato genit urinário, coração, fígado, próstata, seios nasais, linfonodos. As manifestações cutâneas ocorrem em 10 a 15% dos casos e, na maioria das vezes, precede o surgimento da doença sistêmica. A persistência de *C. neoformans* na próstata e no trato urinário, depois de um tratamento adequado para meningite, leva-se a hipótese de uma recidiva da doença. A criptococose do SNC desenvolve-se sob a forma de meningite, encefalite, granuloma, abscesso e meningoencefalite. A meningoencefalite se manifesta de forma subaguda ou crônica. As manifestações clínicas são apresentadas de diversas formas, como cefaléia de localização e intensidade variável; sinais de irritação meníngea (rigidez de nuca, sinal de Kernig, Brudzinski e Lasegue), febre geralmente moderada ou de pequena intensidade (LEÃO,1997).

Segundo os dados do CDC (Centers for Disease Control) os pacientes portadores de SIDA, cerca de 7% dos casos apresentaram criptococose (LEÃO,1997).

EXAMES DIAGNÓSTICOS DA CRIPTOCOCOSE

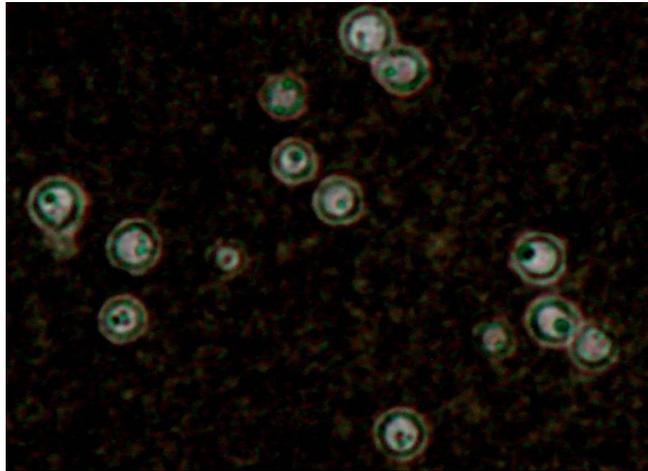
MICROSCOPIA E CULTURA DO LIQUOR

A realização da microscopia direta é considerada o principal diagnóstico a ser realizado para detecção de fungos, onde a mesma apresentará um modo qualitativo indicando presença ou ausência da levedura encapsuladas, *Cryptococcus neoformans* (SILVA, 2006).

O corante mais utilizado na microscopia é a tinta de nanquim conhecida como "tinta da china", na qual é composta a base de carbono, deixando o fundo da lâmina com coloração negra e o fungo com coloração esbranquiçada.

da. Pois a levedura apresenta uma cápsula muito espessa e devida esse fator a tinta não penetra no interior do fungo (SILVA, 2006).

Figura 7 - Cultura de *Cryptococcus neoformans* isolada e corada com tinta da China evidenciando a cápsula polissacarídica da levedura (aumento de 400x).

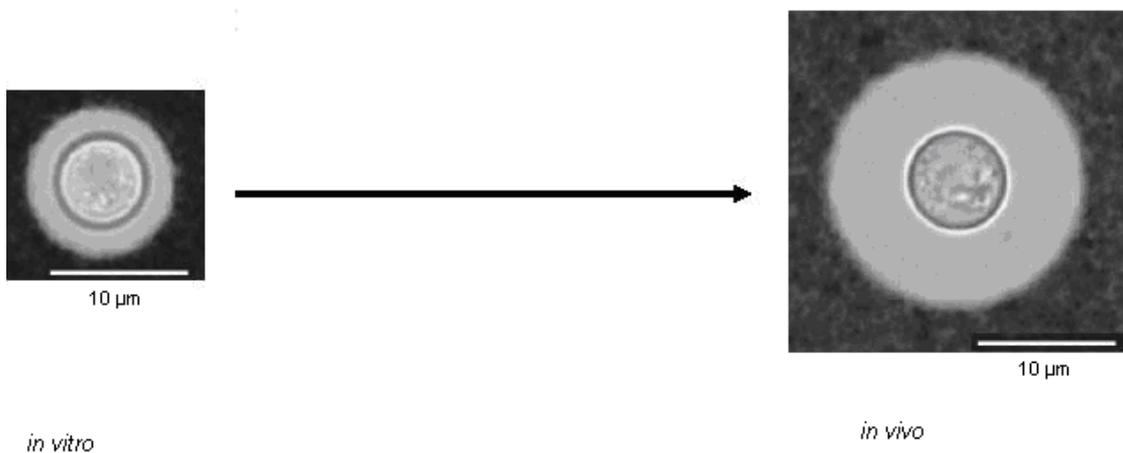


Fonte: GARCIA, L. C., 2008.

Pode ser usar outros corantes para a realização da microscopia, como o azul de alciano que possui a vantagem de detectar, quando presente o *Cryptococcus* sp, mas apresenta a desvantagem de não detectar todos os casos de positividade (MANDELL, BENNETT, DOLIN, 2000).

Devido à reprodução por gemulação, geralmente unipolar, são visualizadas ao microscópio células de diferentes tamanhos (MANDELL, BENNETT, DOLIN, 2000).

Figura 8 - Comparação do tamanho da cápsula de *Cryptococcus neoformans* nas condições *in vitro* e *in vivo*.



Fonte: GARCIA, L. C., 2008.

O meio mais utilizado na cultura de fungos é o ágar Sabouraud podendo conter glicose ou cloranfenicol (inibe o crescimento de bactérias) sendo assim um meio seletivo, se adicionar no meio de ágar Sabouraud 1% de solução de peptona ocorre produção de material capsular. O liquor é semeado no ágar e incubado a 37°C de cinco a oito dias, sendo que só deve ser descartada uma cultura negativa após 30 dias de incubação. O fungo apresenta um crescimento rápido sem ou com antibióticos. A sensibilidade do meio de cultura é de aproximadamente 75%. Em algumas ocasiões como, por exemplo, meningite criptocócica crônica, a cultura do liquor pode dar resultado negativo, isso ocorre devido à baixa carga de microrganismos viáveis que atinge o sacro lombar. A concentração baixa do fungo pode ser dada devido a tratamento prévio, tornando-se um problema no monitoramento da doença no paciente crônico. A hipó-

tese de que a doença possa levar a um relapso não deve ser descartada, mesmo que apresente concentração de células não viáveis (SILVA, 2006).

Ocorre crescimento de colônias brilhantes e úmidas, mucóides e de cor variante de amarelo-marrom ao branco-creme. As células de culturas que após sucessivas repicagens e/ou que perderam a viscosidade, mostram um pequeno envoltório capsular (MANDELL, BENNETT, DOLIN,2000).

Figura 9 - Crescimento de *C. neoformans* em ágar-sabouraud em placa de petri.



Fonte: GARCIA, L. C., 2008.

Figura 10 - Crescimento de *C. neoformans* em ágar-sabouraud em tubo.

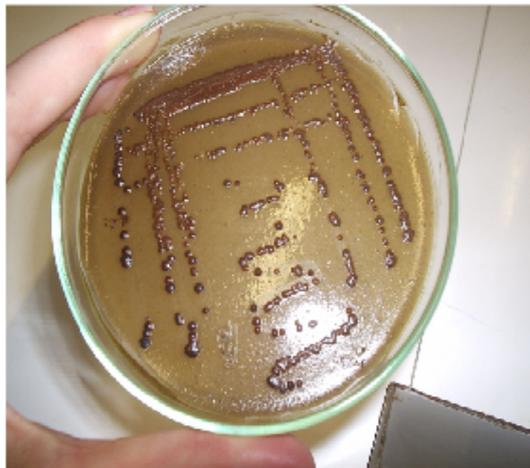


Fonte: COSTA, A. K. F., 2007apud CEMM, 2007.

O material biológico pode também ser semeado em outros meios (não são realizados na rotina) como o ágar somente de Níger sendo um meio enriquecedor, ágar uréia usado para detecção de espécies do *Cryptococcus neoformans*, ágar base carbono-levedura (YCB) usado para identificação de espécies de *Cryptococcus sp* pela redução de nitrato (COSTA,2007).

As utilizações de culturas quantitativas não são empregadas na rotina clínica médica, mas quando são realizadas, apresentaram uma concentração média de 1000 (10³) a 10⁷ UFC/mL (unidade formadora de colônias por mililitro) no liquor, no sangue apresenta menos que 10 UFC/MI (MANDELL, BENNETT, DOLIN,2000).

Figura 11 - Morfologia das colônias de *Cryptococcus neoformans* em Ágar Niger demonstrando a produção de melanina pelos isolados.



Fonte: GARCIA, L. C., 2008.

CELULARIDADE DO LÍQUOR

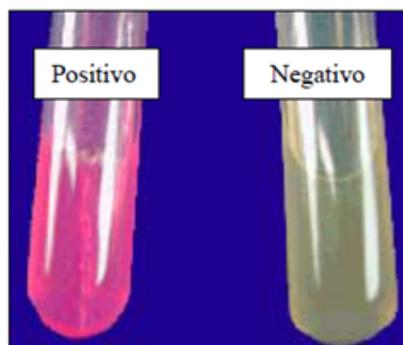
Os valores do líquido podem apresentar alterados em pacientes portadores de SIDA, essa alteração deve-se a infecção do HIV (Vírus da imunodeficiência humana). Appleman e colaboradores (2000) examinaram cerca de 110 militares com infecção pelo HIV. A maioria apresentava hipersensibilidade tardia intacta e contagem de TCD4+ entre 0, 400 x 10⁹/L (DORACILDE, 2011).

CULTURA – PROVAS BIOQUÍMICAS DE IDENTIFICAÇÃO DO GÊNERO

Quase todas as espécies do gênero *Cryptococcus* sp não são fermentadoras de carboidratos, mas assimila, por metabolismo de oxidação, a glicose, maltose, sacarose e galactose, no entanto não assimila lactose. A utilização de inositol é a única fonte de carbono no qual ira diferenciar espécies do *Cryptococcus* sp das espécies de *Rhodotorula*. Todas as espécies de *Cryptococcus* sp não assimilam o nitrato de potássio como única fonte de nitrogênio inorgânico e não sofre redução a nitrito com exceção do *Cryptococcus neoformans* (MATHISEN, JOHNSON, 2003).

Um teste bioquímico muito empregado para diferenciar o *Cryptococcus* dos demais gêneros, onde o mesmo possui a capacidade de hidrolisar a uréia, essa hidrólise ocorre através da produção da enzima chamada uréase pela levedura e essa enzima é capaz de hidrolisar a uréia em amônia e gás carbono. Para a identificação de positividade do teste de hidrólise da uréia é adicionado ao meio um indicador vermelho de fenol, pois em casos positivos ocorrerá alteração da cor do meio (coloração cereja a rosa escuro) devido à produção de compostos alcalino (amônia) (SILVA, 2006).

Figura 12 - Meios de cultura utilizados para identificação de *C. neoformans*. Teste de produção de uréase. A coloração rósea caracteriza a positividade do teste.



Fonte: SILVA P. R., 2006 apud Disciplina de Microbiologia – UFTM.

A assimilação de carboidratos também pode ser realizada através métodos manuais e automatizados (MILAN & ZAROR, 2004). Dentre os sistemas disponíveis, o API 20C (BioMérieux) e o ID 32C (BioMérieux) são os mais utilizados para identificação de *Cryptococcus* spp. Estes testes consistem em galerias plásticas contendo microcúpulas com açúcares desidratados. Dentro de cada microcúpula coloca-se uma suspensão da levedura e incuba-se sob temperatura e tempo determinados. Os resultados baseiam-se na turvação ou mudança de cor das microcúpulas, comparando-se com os dados presentes em um banco de dados fornecido pelo fabricante. Entretanto, a galeria ID 32C inclui provas que envolvem leitura automatizada (SILVA, 2006).

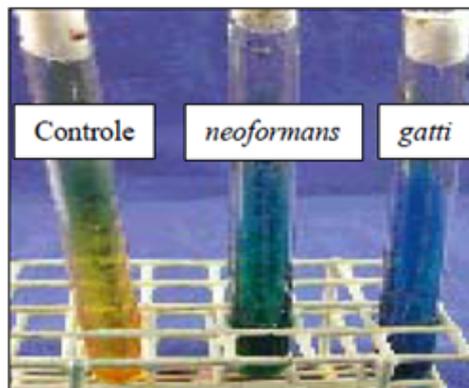
Figura 13 - API 20C (Galeria contendo microcúpulas com açúcares desidratados utilizados no teste e inoculo fúngico e a turvação do meio indicam crescimento do fungo através da assimilação do açúcar).



Fonte: SILVA P. R., 2006 apud Disciplina de Microbiologia – UFTM.

Outro meio para testes bioquímico é o L-CGB (L-canavanina, glicina e azul de bromotimol) que ira diferenciar as duas variedades de *Cryptococcus neoformans*. O sorogrupo A/D não cresce nesse meio de cultura permanecendo o mesmo inalterado em sua cor. O sorogrupo B/C utiliza aglicina e cresce em meio canavanina, tornando o meio azul cobalto. (MASYARA, 2008).

Figura 14 - Identificação por L-CGB Enquanto a coloração verde indica *C. neoformans* variante *neoformans*.



Fonte: SILVA P. R., 2006 apud Disciplina de Microbiologia – UFTM.

EXAMES BIOQUÍMICOS DO LIQUOR

Os componentes presentes no teste realizado rotineiramente do liquor são cloretos, proteínas e glicose (SILVA, 2006).

As alterações dos níveis dos componentes são de pouco valor para diagnóstico, pois não apresentam especificidade e nem sensibilidade para a meningite criptocócica. A verificação das concentrações dos componentes do liquor é importante para acompanhamento do quadro da doença (WALZ, et al., 2002).

Os níveis de glicose podem apresentar uma leve diminuição comparada ao seu valor de referência, atingido níveis menores que 2/3 da glicose sanguínea do paciente, os níveis de proteínas apresentam superior a valores

maiores que 1% do nível sanguíneo. Os cloretos no LCR são normalmente 1 a 2 vezes maiores do que os séricos. Nível diminuído é encontrado e na criptococose (WALZ, et al.,2002).

BIOLOGIA MOLECULAR - REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

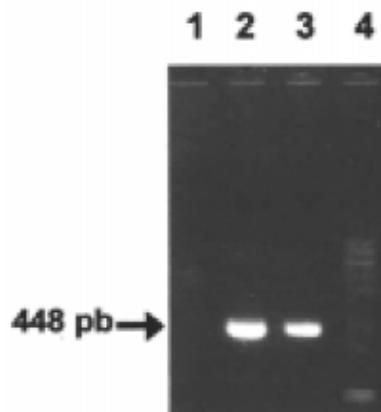
Os métodos de identificação moleculares são mais recentes e são úteis em estudos epidemiológicos, para a identificação da variedade, do sorotipo, e variações individuais de cepas (CASALI, et al, 2001).

A técnica de biologia molecular é importante para detecção de seqüências gênicas específicas para *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* em espécies clínicas e monitoramento das infecções fúngicas. A técnica aplicada é a hibridação, reação em cadeia da polimerase (PCR) ou metodologias combinadas. As técnicas de PCR surgiu no final dos anos 80, possibilitou a obtenção de uma grande quantidade de DNA (ácido desoxirribonucléico) de uma região específica a partir de pequenas quantidades de pares de bases de um DNA – molde, permitindo a detecção direta de um patógeno, através dos seus genes, mesmo na presença de pequena concentração no organismo do hospedeiro. Essa técnica não é só empregada para detecção desse fungo, mas utilizadas para detecção de outras leveduras (CASALI et al, 2001).

O PCR apresenta diversos tipos de metodologia, porém as mais amplamente utilizadas para identificação de *C. neoformans* e *C. gattii* são: PCR multiplex, PCR em tempo real e nested PCR, sendo a PCR fingerprinting, técnica baseada na avaliação de bandas de diferentes formas (polimorfismo), formadas a partir da amplificação de DNA, a partir de iniciadores aleatórios (oligonucleotídeos), uma das mais empregadas na conduta molecular (WALZ, et al.,2002).

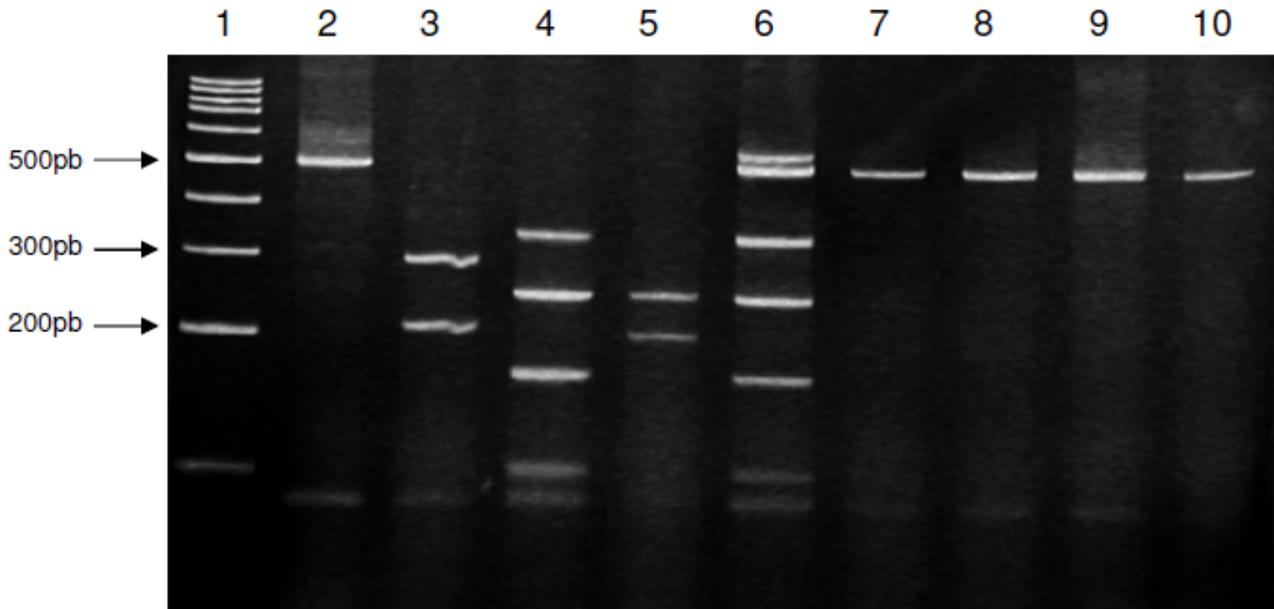
A PCR fingerprinting possui nível de sorotipos com sensibilidade suficiente para detectar diferenças inter e intravariadas permitiu que as duas espécies *C. neoformans* e *C. gattii* possa ser identificados, possibilitando a classificação de isolados clínicos e ambientais em oito tipos moleculares (definidos pela presença de bandas específicas e reproduzíveis): VNI (variedade grubii, sorotipo A1), VNII (variedade grubii, sorotipo A2), VNIII (sorotipo AD), VNIV (variedade neoformans, sorotipo D), VGI, VGII, VGIII e VGIV (*C. gattii*, sorotipo B e C) (WALZ, et al.,2002).

Figura 15 - Identificação por PCR de amostras de *C. neoformans*,. 1, sorotipo A; 2, sorotipo B; 3, sorotipo C; 4, sorotipo D.



Fonte: GARCIA, L. C., 2008.

Figura 16 - Gel em poliacrilamida 6% corado por nitrato de prata representativo da digestão dupla pelas enzimas de restrição Avall e HaeIII do fragmento de 597pb do gene CAP59 de *Cryptococcus neoformans*. 1- Padrão de peso molecular (100pb ladder); 2- amostra padrão sorotipo A; 3- amostra padrão sorotipo B; 4- amostra padrão sorotipo C; 5- amostra padrão sorotipo D; 6- amostra padrão sorotipo AD; 7- isolado CAT1; 8- isolado CAT2; 9- isolado CAT3; 10- isolado ISF.



Fonte: CASALI A.K. et al, 2001 apud Agnes K. C. et al, Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento - nº 20 - maio/junho 2001.

A técnica de PCR apresenta maiores níveis de sensibilidade e especificidade que a cultura e a coloração da tinta de nanquim (CASALI et al,2001).

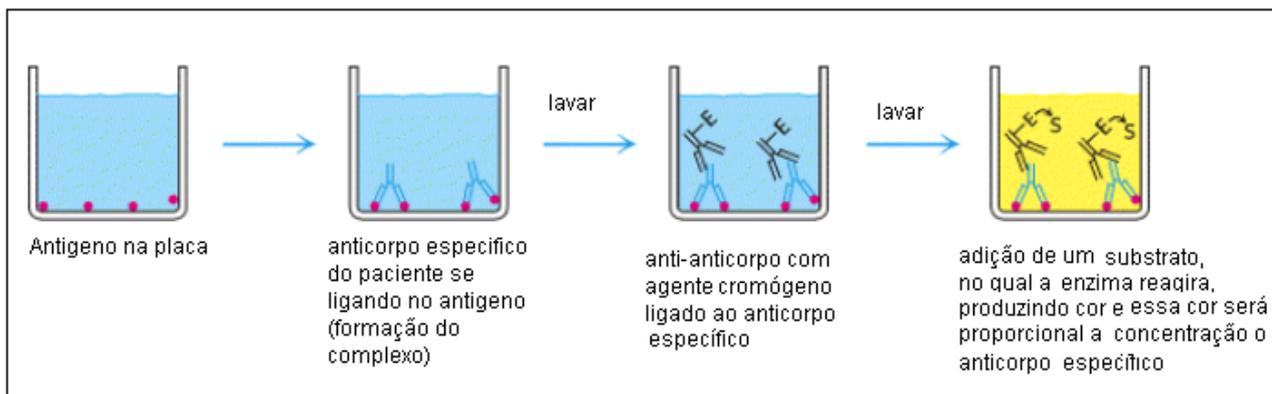
TESTES SOROLÓGICOS

A utilização de teste sorológico é um importante método para diagnóstico de criptococose, o teste sorológico pode ser realizado tanto para detectar antígenos, principalmente capsular, como a pesquisa de anticorpos formados pelo paciente contaminado. Os antígenos capsulares podem ser encontrados no líquido cefalorraquidiano, lavado broncoalveolar e na urina e podem ser detectados por vários métodos, mas devido à alta sensibilidade que é superior a 90% no líquor, além de sua rapidez o método mais empregado é o teste de aglutinação de partículas de látex sensibilizadas com anticorpos monoclonais contra os polissacarídeos principal da capsula do *Cryptococcus neoformans* (GARCIA, 2008).

O teste tem positividade de 94% no LCR e 70% nas amostras do soro em casos de meningite comprovada e o teste pode ser positivo mesmo que a cultura for negativa. Títulos iguais ou maiores que 1:4 são considerados casos sugestivos de infecção do fungo *Cryptococcus sp*, e titulações iguais ou maiores que 1:8 são considerados casos positivos de infecção ativa. Casos com titulações menores que 1:4 são indicativos de casos de meningite bacteriana ou tumores no sistema nervoso central. Pacientes que infectados pela SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Humana) como fator de pré disposição para o fungo possui titulação alta para o antígeno. Resultados falso-positivos não são comumente encontrados, mas o falso-negativos podem ocorrer em pacientes com infecções muito recente ou em doenças prolongadas, sendo a cultura positiva (LEÃO,1997).

Outro método a ser empregado no diagnóstico é o teste de ELISA (Ensaio Imunoenzimático), no qual é um método que apresenta alta sensibilidade, importante para a detecção no início da doença e é altamente específico, este teste pode ser utilizado para pesquisa de antígeno e/ou anticorpos. O ELISA quando comparado com o teste de aglutinação por látex, a leitura do ELISA é menos subjetivo e não apresenta facilmente o efeito de prozona é possui maior sensibilidade, não sofre interferentes (especificidade) do efeito reumatóide, o teste de ELISA consiste em uma desvantagem em relação ao látex que seria o seu tempo maior para a liberação do resultado (MANDELL, BENNETT, DOLIN, 2000).

Figura 17 - Esquema do teste de ELISA indireto.



Fonte: MANDELL, G.L., BENNETT, J.E., DOLIN, R., 2000.

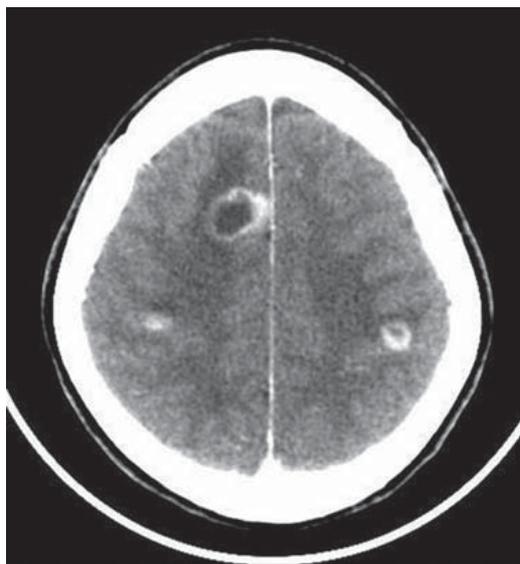
A determinação antigênica durante a evolução da doença permite a avaliação do efeito terapêutico e o prognóstico da doença (MANDELL, BENNETT, DOLIN, 2000).

DIAGNÓSTICO POR IMAGEM – TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA

Devido o tropismo do *Cryptococcus* sp de atingir o sistema nervoso central, a tomografia se torna importante tanto para diagnosticar (indicar lesão encefálica), como o acompanhamento do quadro da doença. Nota-se que a maioria das lesões no sistema nervoso central é evidentes nódulos hipodensos múltiplos localizados principalmente na região ganglionar basal da massa branca cerebral. Esse quadro pode evoluir para o atrofiamento associada à dilatação do ventrículo e saliências no sulco cerebral, podendo também apresentar abscesso, lesão em massa, alterações da substância branca, edema, evidências de hemorragia, cerebrites, pseudocisto e infarto. Podem ser observadas também alterações moderadas na região do córtex cerebral, levando a seqüelas neurologias nos pacientes com a doença (MANDELL, BENNETT, DOLIN, 2000).

As alterações intracranianas formadas pelo fungo não são de características exclusivas do mesmo, no qual se pode ocorrer infecção da meninge, mas não apresentar alterações na tomografia ou até mesmo essas lesões serem causadas por outros agentes (MANDELL, BENNETT, DOLIN, 2000).

Figura 18 - Tomografia de crânio demonstra múltiplas lesões ovaladas, de diferentes tamanhos, com edema periférico e realce intenso pelo meio de contraste venoso, por vezes com aspecto anelar, localizadas nas regiões núcleo-capsulares, corticais e subcorticais.



Fonte: MANDELL, G.L., BENNETT, J.E., DOLIN, R., 2000.

DISCUSSÃO

A rotina da microscopia é realizada pela coloração da tinta da china no qual apresenta sensibilidade de 96,3% em pacientes com SIDA. A utilização de outros corantes pode ser empregados, como o azul de alciano que detecta a presença do fungo, mas apresenta baixa sensibilidade (MATHISEN, JOHNSON, 2003).

A sensibilidade do meio de cultura é de aproximadamente 75%. Em algumas ocasiões como, por exemplo, meningite criptocócica crônica, a cultura do líquor pode dar resultado negativo, isso ocorre devido à baixa carga de microrganismos viáveis que atinge o sacro lombar. A concentração baixa do fungo pode ser dada devido a tratamento prévio, tornando-se um problema no monitoramento da doença no paciente crônico (GARCIA, 2008).

Em cerca de 30% dos casos de infecção intracraniana, o fungo não é encontrado no líquor. Os exames de imagem (tomografia computadorizada, ressonância nuclear magnética) não especificam a etiologia da lesão (TABORDA, 2009).

Na Tomografia Computadorizada, as lesões apresentam-se como áreas de baixa densidade (semelhante à do líquor), em locais como gânglios da base, tálamo, substância nigra e regiões periventriculares, sendo raro o edema cerebral. As lesões são mais evidentes a Ressonância magnética.

A técnica de PCR apresenta maiores níveis de sensibilidade e especificidade que a cultura e a coloração da tinta de nanquim (MATHISEN, JOHNSON, 2003).

Os antígenos capsulares podem ser encontrados no líquido cefalorraquidiano, lavado bronco alveolar e na urina. Podem ser detectados por vários métodos, mas devido à alta sensibilidade que é superior a 90% no líquor, além de sua rapidez o método mais empregado é o teste de aglutinação de partículas de látex sensibilizadas com anticorpos monoclonais contra os polissacarídeos principal da cápsula do *Cryptococcus neoformans*. O teste tem positividade de 94% no LCR e 70% nas amostras do soro em casos de meningite comprovada e o teste pode ser positivo mesmo que a cultura for negativa (RIBEIRO et al, 2007).

O exame de ELISA quando comparado com o teste de aglutinação por látex, a leitura é menos subjetivo e não apresenta facilmente o efeito de prozona é possui maior sensibilidade, não sofre interferentes (especificidade) do efeito reumatóide, o teste de ELISA consiste em uma desvantagem em relação ao látex que seria o seu tempo maior para a liberação do resultado (MANDELL, BENNETT, DOLIN, 2000).

Se o paciente estiver com sua imunidade íntegra, a cura pode ser alcançada em até quatro semanas. O sucesso terapêutico é conseguido quando as culturas do líquor são negativas. Se houver recidiva, o tratamento deve ser repetido (RIBEIRO et al, 2007).

O tratamento é acompanhado com culturas de líquor onde deve ser observada ausência de brotamentos do fungo, até atingir a inexistência do mesmo. (TABORDA, 2009).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora rara, a criptococose é uma doença potencialmente fatal, principalmente para os hospedeiros imunocomprometidos. O diagnóstico laboratorial da criptococose pode ser feito com segurança quando técnicas e métodos laboratoriais são utilizados adequadamente.

A suspeita clínica e os dados clínicos do paciente permitem também agilizar os procedimentos laboratoriais, permitindo a utilização de meios de cultura seletivos e/ou diferenciais, incubação em temperatura adequada e realização de provas de identificação direcionadas.

Estudos epidemiológicos sobre o *Cryptococcus neoformans* são indispensáveis à identificação de microfocos desse fungo, facilitando a adoção de medidas preventivas como o controle de portadores, especialmente as aves sinantrópicas. O atraso no diagnóstico e as dificuldades em controlar a infecção são importantes causas de mortalidade e morbidade.

REFERÊNCIAS

BASTOS, F. I., BARCELLOS, C.; Geografia social da Aids no Brasil. Revista de Saúde Pública, São Paulo, v.29 n.1, fev. 2005.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, AIDS e DST, Ministério da Saúde, BRASIL, 2010.

DIAGNÓSTICO E PREVALÊNCIA DA MENINGITE CRIPTOCOCÓCICA EM PACIENTES PORTADORES DA SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA – SIDA

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. BASTOS FI., e SZWARCOWALD CL. AIDS e pauperização: principais conceitos e evidências empíricas sobre a epidemia da AIDS no Brasil: distintas abordagens, p. 07-19. Brasília, 2010.

BRITO A. M., CASTILHO, E. A. E SZWARCOWALD, C. L.; AIDS e infecção pelo HIV no Brasil: uma epidemia multifacetada; Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 34(2): 207-217, mar-abr, 2000.

BUCHALLA, C. M. et al. A AIDS/SIDA: as estatísticas de mortalidade como fonte de informação. São Paulo: Centro Brasileiro de Classificação de Doença, São Paulo, 1990.

BUCHALLA C. M. et al, Avaliação do uso da Classificação Internacional; de Doenças para codificar a síndrome da imunodeficiência adquirida, São Paulo, 2006.

CAMARGO, J., ROCHEL K. – As Ciências da Aids e a Aids das Ciências – O discurso médico e a construção da aids. Rio de Janeiro: Relume Dumará: ABIA: IMS, UERJ, 2004.

CASALI A.K., et al, Cryptococcus neoformans Aspectos moleculares e epidemiológicos, Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento - nº 20, Rio de Janeiro, maio/junho 2001.

Casos de HIV no mundo, <<http://www.aidsbrasil.com/epidemiologia/07>> acesso em 12/07/2011.

CONTIN J. T. et al; Minas Gerais, Ocorrência de Cryptococcus neoformans em fezes de pombos na cidade de Caratinga, MG – Brasil, Revista Médica de Minas Gerais 2011; 21(1): 19-24, 2011.

COSTA, A. K. F.; Leveduras associadas à cloaca e a excrementos de pombos (Columba livia): um enfoque especial para os aspectos micológicos de Cryptococcus spp; FORTALEZA – CE, 2007.

DENNING, D.W. Therapeutic outcome of invasive aspergillosis. Clin Infect Dis, 23:608-15, 1996.

FERREIRA, C. E. C., CASTIÑEIRAS, L. L. O rápido aumento da mortalidade dos jovens adultos em São Paulo: uma trágica tendência. Revista São Paulo em Perspectiva, São Paulo, v. 10 n. 2, abr./jun. 2006.

FIGUEIREDO J. F. C. et al; Características clínicas e epidemiológicas de pacientes da região de Ribeirão Preto, SP, BRASIL, com AIDS e infecções oportunistas, Ribeirão Preto, 2000.

FUNDAÇÃO SEADE. Sistema de Mortalidade por SIDA. São Paulo, 1988/1997.

GAGLIANI L. H.; Avaliação imunológica e virológica dos pacientes Diagnosticados pelo hiv-1, no período de 2000 a 2001, Matriculados no centro de referência em AIDS de SANTOS – SP – BRASIL, Santos 2004.

GAGLIANI L. H. ; Caseiro M. M.; Rocha S., Correlação entre alterações líquóricas e sobrevida em pacientes com neurocriptococose x aids que foram atendidos no centro de referência em AIDS de Santos – SP – BRASIL, Santos 2005.

GALVÃO, J.; AIDS no Brasil: A agenda de construção de uma epidemia - Rio de Janeiro: ABIA; São Paulo: Ed. 34, 2000.

- GARCIA, L. C.; Estudo genotípico de *Cryptococcus neoformans* isolados de amostras ambientais no Município de Florianópolis, Santa Catarina. Santa Catarina, 2008.
- GAZZONI, A. F., Diagnóstico histopatológico da criptococose; Porto Alegre, 2007.
- HAMANN, M.E. Grau de informação, atitudes e representações sobre o risco e a prevenção de Aids em adolescentes pobres do Rio de Janeiro, Brasil. Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 11, n. 3, jul./set. 1996.
- HANCI, M., A.Cerebral candidiasis presenting as a mass lesion.Zentralb Neurochir, 59(2):129-31, 1998.
- HARRIS, D.E, ENTERLINE D.S.: Fungal infections of the central nervous system. Neuroimaging Clin N Am, 7(2): 187-98, 1997.
- LEÃO N. Q. Doenças Infecciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico - Belém: Cejup: UEPA: Instituto Evandro Chagas, 1997,pg 750-757.
- MAFRA M. O. et al;;, Criptococose Disseminada em Lúpus Eritematoso Sistêmico Juvenil, Revista Brasileira de Reumatologia , v. 48, n.6, p. 373-378, nov/dez, 2008.
- MANDELL, G.L, BENNETT, J.E., DOLIN, R.: Principles and practice of infectious disease, 5o ed., Churchill Livingstone, 2000, p.2663-770.
- MATIDA, L. H. AIDS e a transmissão materno-infantil. Boletim Epidemiológico, São Paulo, CVE, n. 1, mar. 1998.
- MATHISEN, G.E., JOHNSON, J.P., Brain abscess. Clin Infect Dis, 25: 763-81, 2003.
- NOVELINO, M.S.F. Disseminação de informação sobre a epidemia de HIV/Aids para mulheres. Brasília, v. 22 n. 3, set./dez. 1993.
- OLIVEIRA, B. P. R.; Criptococose LEÃO, R. N. Q.; Doenças Infecciosas e Parasitárias- Belém: Cejup: UEPA: Instituto Evandro Chagas, 1997.
- PEDROSO, R. S., CANDIDO, R. C., Diagnóstico Laboratorial da Criptococose, News Lab - edição 77 – 2006.
- PETRAGLIA P., Relato de um caso de criptococose em gato, Rio de Janeiro 2008.
- QUEIROZ, J. P. A. et al; CRIPTOCOCOSE - UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA, Acta Veterinaria Brasilica, v.2, n.2, p.32-38, 2008.
- RIBEIRO G. P. et AL; CRIPTOCOCOSE ARTICULAR: RELATO DE CASO1, Revista Paraense de Medicina V.21 (4) dezembro 2007.
- RIHS, J.D., PADHYE, A A., GOOD, C.B. Brain abscess caused by *Schizophyllum commune*: na emerging basidiomycete pathogen. J Clin Microbiol, 34(7): 1628-32, 1996.
- SHARMA, B.S.et al. Intracranial fungal granuloma. Surg Neurol. 47(5): 489-97, 1997.
- SILVA P. R., Susceptibilidade a antifúngicos e resposta imunológica in vitro às variedades do *Cryptococcus neoformans*, Rio de Janeiro, Outubro/2006.

DIAGNÓSTICO E PREVALÊNCIA DA MENINGITE CRIPTOCOCÓCICA EM PACIENTES PORTADORES DA SÍNDROME DA
IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA – SIDA

TAKAHARA D. T., Isolamento e identificação de *Cryptococcus neoformans* a partir de excretas de pombos provenientes de locais públicos e residenciais de Cuiabá e várzea grande – MT, CUIABÁ – MT, 2007.

WALZ, R., et al. Cerebral phaeohyphomycosis caused by *Cladophialopora bantiana* in a Brazilian drug abuser. *J Med Vet Mycol*, 35(6): 427-31, 2002.

WATSON D.F., STERN, B.J., LEVIN, M.L. et al. Isolated cerebral phycomycosis presenting as focal encefalitis. *Arch. Neurol*, 42: 922-23, 1985.

WEBB, M. Cerebral mucormycosis after liver transplantation: a case report. *Clin Transplant*, 12(6): 596-9, 1998.