



UFG

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

MOARA ALVES SANTA BÁRBARA BORGES

**PREVALÊNCIA DE ANTIGENEMIA CRIPTOCÓCICA EM PESSOAS
COM AIDS EM UM HOSPITAL DE REFERÊNCIA EM GOIÂNIA,
GOIÁS**

Goiânia
2019

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECADIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9.610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ Dissertação ☐ Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

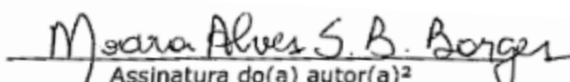
Nome completo da autora: **Moara Alves Santa Bárbara Borges**

Título do trabalho: **Prevalência de antigenemia criptocócica em pessoas com aids em um hospital de referência em Goiânia, Goiás.**

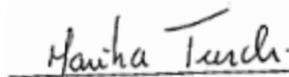
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento: ☐ SIM ☒ NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:


Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 05/02/19

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o(a) autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ **Dissertação** ☐ **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do(a) autor(a): **Moara Alves Santa Bárbara Borges**

Título do trabalho: **Prevalência de antigenemia criptocócica em pessoas com aids em um hospital de referência em Goiânia, Goiás.**

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ **SIM** ☐ **NÃO**¹

Independente da concordância com a disponibilização eletrônica, é imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.



Assinatura do(a) autor(a)²



Ciente e de acordo:

Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 19/07/2022

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante: a) consulta ao(a) autor(a) e ao(a) orientador(a); b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² As assinaturas devem ser originais sendo assinadas no próprio documento. Imagens coladas não serão aceitas.

MOARA ALVES SANTA BÁRBARA BORGES

**PREVALÊNCIA DE ANTIGENEMIA CRIPTOCÓCICA EM PESSOAS
COM AIDS EM UM HOSPITAL DE REFERÊNCIA EM GOIÂNIA,
GOIÁS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Marília Dalva Turchi
Co-orientador: Prof. Dr. João Alves de Araújo Filho

Goiânia
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Borges, Moara Alves Santa Bárbara

Prevalência de antigenemia criptocócica em pessoas com aids em
um hospital de referência em Goiânia, Goiás [manuscrito] / Moara
Alves Santa Bárbara Borges. - 2019.

xvii, 92 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Marília Dalva Turchi; co-orientador Dr. João
Alves de Araújo-Filho.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás,
Faculdade de Medicina (FM), Programa de Pós-Graduação em Ciências
da Saúde, Goiânia, 2019.

Bibliografia. Anexos. Apêndice.

Inclui siglas, fotografias, abreviaturas, símbolos, tabelas, lista de
figuras, lista de tabelas.

1. Prevalência. 2. Criptococose. 3. Aids. 4. Meningite Criptocócica.
5. Imunocromatografia. I. Turchi, Marília Dalva, orient. II. Título.

CDU 616-093

Ata de Defesa da Dissertação de Mestrado

PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE MEDICINA - FM



Ata de Defesa de Dissertação de Mestrado realizada por **Moara Alves Santa Bárbara Borges**. Aos **oito dias do mês março de 2019**, às 09:00 horas, reuniu-se na Sala de Defesas da Pós-Graduação/FM/UFG, a Comissão Julgadora infra nomeada para proceder ao julgamento da Defesa de Dissertação de Mestrado intitulada **"PREVALÊNCIA DE ANTIGENEMIA CRIPTOCÓCICA EM PESSOAS COM AIDS EM UM HOSPITAL DE REFERÊNCIA EM GOIÂNIA, GOIÁS"**, como parte de requisitos necessários à obtenção do **título de Mestre**, área de concentração **PATOLOGIA, CLÍNICA E TRATAMENTO DAS DOENÇAS HUMANAS**. A Presidente da Comissão julgadora, **Profª. Drª. Marília Dalva Turchi**, iniciando os trabalhos concedeu à palavra a candidata, para exposição em até **50** minutos do seu trabalho. A seguir, a senhora presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos Examinadores, os quais passaram a arguir a candidata durante o prazo máximo de 30 minutos, assegurando-se a mesma igual prazo para responder aos Senhores Examinadores. Ultimada a arguição que se desenvolveu nos termos regimentais, a Comissão, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando a candidata aprovada ou reprovada.

Banca Examinadora

Aprovado(a)/Reprovado(a)

Profª. Drª. Marília Dalva Turchi - Presidente
Profª. Drª. Ledice Inácia de Araújo Pereira – Membro
Prof. Dr. José Ernesto Vidal Bermudez – Membro
Prof. Dr. Paulo Sérgio Sucasas da Costa – Suplente

Aprovada
Aprovada
Aprovada

Em face do resultado obtido, a Comissão Julgadora considerou a candidata **Moara Alves Santa Bárbara Borges** (**X**) Habilitada () Não habilitada. Nada mais havendo a tratar, eu, **Profª. Drª. Marília Dalva Turchi**, lavrei a presente ata que, após lida e achada conforme foi por todos assinada.

Assinatura:

Profª. Drª. Marília Dalva Turchi - Presidente
Profª. Drª. Ledice Inácia de Araújo Pereira – Membro
Prof. Dr. José Ernesto Vidal Bermudez – Membro
Prof. Dr. Paulo Sérgio Sucasas da Costa – Suplente

[Assinatura]
[Assinatura]
[Assinatura]

A banca examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Dissertação:

Moara Alves S. B. Borges
Moara Alves Santa Bárbara Borges

Dedico...

À minha família, que sempre me incentivou a buscar meus objetivos e fazer algo que me trouxesse realização pessoal e profissional.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, a quem agradeço a paciência e competência.

Aos meus professores, que me ensinaram e despertaram a paixão pela Infectologia.

A todos os profissionais e pacientes, que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste estudo.

Aos meus pais, Paulo e Persiliana, e à minha família, que sempre me incentivaram a aprender e crescer, como pessoa de bem e como profissional humana e dedicada.

À minha madrinha, Genilda, que me inspirou o gosto pelos estudos e a admiração pela docência.

Aos amigos, que me apoiaram nas decisões difíceis e nos momentos de dedicação aos meus objetivos.

Ao Laboratório de Saúde Pública de Goiás, pela parceria e apoio.

Ao Hospital Estadual de Doenças Tropicais Dr. Anuar Auad, pelo apoio em pesquisa.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, pela oportunidade.

E à Espiritualidade maior, que me apoia e guia.

APRESENTAÇÃO

A Infectologia tocou minha alma ainda como acadêmica, durante a graduação realizada na Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP, 2018), desde os primeiros contatos com bactérias, fungos e protozoários. A escolha por esta área, que cuida de indivíduos por vezes desamparados e negligenciados, foi guiada especialmente pela paixão por investigar, pensar em múltiplos diagnósticos, combinar as várias áreas da medicina e, principalmente, poder curar o paciente, grande parte das vezes.

O contato com pessoas vivendo com HIV/aids (PVHA) foi intenso durante os três anos da Residência Médica, na UNICAMP. Nessa época, acompanhei muitos pacientes infectados pelo HIV e, apesar dos grandes avanços da terapia antirretroviral (TARV), me surpreendi com a frequência de doenças oportunistas e de complicações clínicas, muitas vezes simultâneas. Cuidei de pacientes que chegavam já em fase avançada da imunossupressão e vivenciei as dificuldades do manejo clínico deles. Tudo isso representou um grande estímulo para aprender sempre mais.

Durante os primeiros anos de especialidade, como médica infectologista no Hospital Estadual de Doenças Tropicais (HDT) “Dr. Anuar Auad”, hospital de referência em Infectologia, unidade da Secretaria de Estado da Saúde de Goiás, atendi um grande número de pacientes com HIV apresentando infecções fúngicas graves, sobretudo histoplasmose disseminada e criptococose em SNC. Deparei-me com as dificuldades diagnósticas e terapêuticas inerentes a essas infecções e me interessei ainda mais pelo tema.

Seguindo o entusiasmo da Dra. Cassia Miranda de Godoy, médica infectologista do HDT, ingressei na Rede Criptococose Brasil (RCB), visando aprender e trazer melhorias ao manejo desta afecção grave e de alta morbimortalidade. No Brasil, a RCB foi constituída em 2011, na Fiocruz (RJ), com o objetivo de agregar um grande número de interessados em juntar esforços para a sistematização de dados sobre criptococose, cooperação em projetos de pesquisa, formação acadêmica e melhoria nos serviços de saúde. A RCB atualmente conta com a adesão de profissionais de saúde e pesquisadores de universidades, institutos de pesquisa, hospitais e laboratórios de saúde pública de 21 Estados, entre eles Rio de Janeiro,

São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Goiás, Mato Grosso do Sul, Bahia, Ceará, Piauí, Minas Gerais, Roraima e Distrito Federal.

O subprojeto CRAG “Detecção de antigenemia criptocócica em Aids”, despertou meu interesse. O mesmo é desenvolvido em diferentes centros no Brasil e busca o diagnóstico precoce e detecção de antigenemia criptocócica em Aids, utilizando uma técnica imunocromatográfica inovadora, de fácil armazenamento e realização, denominada *Lateral Flow Assay* (LFA). A opção de um diagnóstico precoce, rápido e que pudesse alterar a realidade vivenciada – de diagnóstico tardio e complicações – foi o fator decisivo para que eu aceitasse participar do Projeto CRAG em Goiânia. O mesmo teve início em 2015, com prazo inicial de recrutamento de dois anos. Foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HDT em abril de 2015. Inicialmente o financiamento dos kits diagnósticos foi realizado pela Fundação Osvaldo Cruz (RJ). Porém, com a dificuldade de fornecimento dos mesmos, em final de 2016 foi encerrado o recrutamento pelo projeto por tempo indeterminado.

Com o intuito de dar continuidade ao projeto, busquei a colaboração do Dr. João Alves de Araújo Filho, médico infectologista do HDT e Professor do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (IPTSP/UFG) e, juntos, conseguimos recursos via Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG).

Ingressei no Mestrado em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da UFG em março de 2017, buscando finalizar o Projeto CrAg e visando aprimorar minha formação em pesquisa e docência. A experiência com a pós-graduação *stricto sensu* incentivou-me a ingressar como professora efetiva do IPTSP UFG em abril de 2018.

Espero contribuir para a melhoria do atendimento, diagnóstico e manejo de indivíduos HIV positivos em imunodepressão grave e que apresentam alto risco de complicações por Criptococose e subsidiar a justificativa para a implementação do rastreamento com teste antigênico criptocócico na rotina do Sistema Único de Saúde.

Por fim, esta dissertação de conclusão de mestrado foi elaborada em modelo de artigos – resultados serão apresentados no formato de dois artigos científicos. Os mesmos foram submetidos e encontram-se sob avaliação para publicação nas revistas PLOS One e Mycopathologia.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	1
1.1 Contextualização	1
1.2 Histórico e Taxonomia de <i>Cryptococcus spp.</i>	3
1.3 Ecologia e Ciclo de Vida de <i>Cryptococcus spp.</i>	6
1.4 Aspectos Clínicos, Laboratoriais e Complicações da Infecção Criptocócica	8
1.5 Diagnóstico Laboratorial da Criptococcose	11
1.5.1 Pesquisa direta	11
1.5.2 Cultura	12
1.5.3 Diagnóstico Antigênico	13
1.6 Manejo Terapêutico da Meningoencefalite Criptocócica em Portadores de HIV	18
1.7 Meningite Criptocócica no Mundo: Relevância e Mortalidade	25
1.8 Magnitude da Antigenemia Criptocócica no Mundo e no Brasil	28
1.9 Impacto econômico da triagem com os testes antigênicos criptocócicos	32
2 OBJETIVOS	34
2.1 Objetivo Geral	34
2.2 Objetivos Secundários	34
3 METODOLOGIA	35
3.1 Delineamento do Estudo:	35
3.2 Local de Estudo	35
3.3 População de Estudo	35
3.4 Parâmetros para Cálculo do Tamanho Amostral	36
3.5 Recrutamento dos Participantes e Coleta de Dados	36
3.5.1 Entrevista Estruturada	36
3.5.2 Exames Laboratoriais	37
3.5.3 Conduas frente aos resultados do CrAg	38
3.6 Processamento e Análise de Dados	39
4 RESULTADOS	42
4.1 Artigo 1 – <i>Prevalence of cryptococcal antigenemia among patients with AIDS in Midwest Brazil using a lateral flow assay</i>	42

4.2 Artigo 2 – <i>False-negative result for cryptococcal antigenemia by lateral flow assay: case report</i>	64
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	72
REFERÊNCIAS	75
APÊNDICES	86
Apêndice A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	86
Apêndice B - Ficha Clínica	88
ANEXOS.....	90
Anexo A – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa	90

FIGURAS, TABELAS, APÊNDICES E ANEXOS

FIGURAS

Figura 1 - Mudanças em nomenclatura de <i>Cryptococcus</i> spp. e proposta atual.	5
Figura 2 - Modo de transmissão do complexo <i>Cryptococcus</i>	7
Figura 3 - <i>Cryptococcus neoformans</i> no líquido com tinta da China, revelando a cápsula clara, em contraste com o pigmento negro.....	12
Figura 4 – A) meio canavanina, glicina e azul de bromotimol (CGB), identificando a colônia de <i>Cryptococcus gattii</i> em azul ; B) crescimento de colônias leitosas do complexo <i>Cryptococcus neoformans</i> ; C) fita de teste de CrAg por Lateral Flow Assay positiva	13
Figura 5 - Sequência temporal esquemática da concentração de CrAg em fluidos corporais durante a progressão da doença desde a fase pulmonar à meningite.....	14
Figura 6 - Painel A: esquema mostrando operação de ensaio imunocromatográfico de fluxo lateral (LFA) para detecção de antígeno criptocócico (CrAg). O LFA é construído a partir de anticorpos monoclonais específicos para o CrAg. Painel B: imagens de LFA positivo e negativo.	16
Figura 7 - Etapas para a realização do teste CrAg. Cinco passos simples para executar a detecção do antígeno criptocócico utilizando LFA. Passo 1: adicionar uma gota de diluente no tubo. Passo 2: adicionar cerca de 40 µL (1 gota) da amostra do paciente no tubo. Passo 3: inserir a tira de LFA para dentro do tubo. Passo 4: incubar durante 10 minutos. Passo 5: interpretar os resultados. Dados contidos em bula do produto.....	16
Figura 8 - Fluxograma de manejo de hipertensão intracraniana associada à meningite criptocócica.....	23
Figura 9 - Fluxograma de atendimento a casos de neurocriptococose	25
Figura 10 - Etapas realizadas para coleta de dados e condutas frente aos resultados	38
Figura 11 - Fluxograma de rastreamento utilizando antígeno criptocócico (CrAg) e terapêuticas preconizadas. Proposta sugerida para a implantação no Hospital de Doenças Tropicais.	39

TABELAS

Tabela 1 - Estudos que avaliaram sensibilidade e especificidade do teste antigênico criptocócico pela técnica Lateral Flow Assay	18
Tabela 2 - Estudos de prevalência de antigenemia criptocócica em pessoas infectadas pelo HIV, na América Latina e no Brasil.....	31

APÊNDICES

Apêndice A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	86
Apêndice B - Ficha Clínica.....	88

ANEXOS

Anexo A – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa.....	90
--	----

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

5FC	Flucitosina
ABdx	Anfotericina B Deoxicolato
aids	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i> (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)
ATV/r	Atazanavir + Ritonavir
CDC	<i>Center of Diseases Control</i> (Centro de Controle de Doenças dos Estados Unidos da América)
CE	<i>Conformité Européenne</i>
cél	Células
CGB	Meio de cultura contendo canavanina, glicina e azul de bromotimol
SIRI	Síndrome Inflamatória da Reconstituição Imunológica
cmH ₂ O	Centímetro de Água
CrAg	Antígeno Criptocócico
CV	Carga Viral do HIV
DP	Desvio-padrão
EFZ	Efavirenz
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (Ensaio de Imunoabsorção ENZIMÁTICA)
EUA	Estados Unidos da América
FAPEG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FLU	Fluconazol
GMX	Glucuronoxylomanana
HAART	<i>Highly Active Antiretroviral Treatment</i> (Terapia Antirretroviral Altamente Ativa)
HDT	Hospital Estadual de Doenças Tropicais “Dr. Anuar Auad”
HIC	Hipertensão Intracraniana
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> (Vírus da Imunodeficiência Humana)
IC	Intervalo de Confiança
kg	Quilograma
Lacen	Laboratório Central de Saúde Pública Dr. Giovanni Cysneiros

LCR	Líquido Cefalorraquidiano
LFA	<i>Lateral Flow Assay</i> (Ensaio de Fluxo Lateral)
LT CD4	Linfócitos T CD4 positivos
MC	Meningoencefalite Criptocócica
mg	Miligrama
mL	Mililitro
MS	Ministério da Saúde do Brasil
NNT	Número Necessário para Tratar
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
PCDT	Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas
PPP	Programa Primeiros Projetos
PVHA	Pessoas Vivendo com HIV/Aids
RR	Risco Relativo
SICLOM	Sistema de Controle Logístico de Medicamentos
Sinan	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SIRI	Síndrome de Reconstituição Imune
SISCEL	Sistema de Controle de Exames Laboratoriais da Rede Nacional de Contagem de Linfócitos CD4+/CD8+ e Carga Viral do HIV
SNC	Sistema Nervoso Central
TARV	Terapia Antirretroviral
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TDF	Fumarato de Tenofovir Desoproxila

RESUMO

Introdução: A criptococose é uma infecção oportunística grave, causada pelos complexos de espécies *Cryptococcus* (*Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*). Acomete indivíduos imunocomprometidos, incluindo aqueles com Aids. A detecção do antígeno criptocócico (CrAg) na população portadora de HIV com contagem de CD4 ≤ 100 ou < 200 células / mL tem sido recomendada pela Organização Mundial da Saúde desde 2011. **Objetivos:** Estimar a prevalência e avaliar fatores associados com a positividade de antigenemia criptocócica em pessoas com Aids em Goiás, região Centro-Oeste. **Metodologia:** Estudo transversal, que avaliou adultos portadores de HIV, com contagem de linfócitos T CD4 < 200 céls/mL, sem história prévia de criptococose, independente do uso de terapia antirretroviral (TARV), tempo de diagnóstico ou sintomas, atendidos em hospital de referência em doenças infecciosas em Goiânia, Goiás, de junho de 2015 a julho de 2018. Foram investigadas características demográficas, clínicas e laboratoriais por meio de entrevista com os participantes e revisão de prontuários. O teste CrAg foi realizado pela técnica *Lateral Flow Assay* (Immuno-Mycologics Inc®, Norman, Oklahoma). Estimou-se a prevalência de antigenemia criptocócica com Intervalo de Confiança de 95% (IC95%). Foram utilizados Teste Qui-quadrado ou Teste exato de Fisher para comparar variáveis categóricas e Teste T para variáveis contínuas. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$. **Resultados:** 214 indivíduos participaram do estudo, dos quais 72% eram homens. A idade dos participantes variou de 18 a 78 anos (mediana de 40 anos), 47% tinham diagnóstico recente de HIV (≤ 12 meses), 88,8% ($n = 190$) com uso prévio de TARV, dos quais 51,4% ($n = 110$) em uso regular de TARV nos últimos três meses. A carga viral era indetectável em 25/214. Os valores de CD4 variaram de 1 a 199 céls/mL (mediana de 47 céls/mL). A prevalência global de CrAg foi 7,9% (IC95% 4,7-12,4), sendo 7,5% (12/159) no grupo com CD4 ≤ 100 céls/mL e 9,1% (5/55) no grupo com CD4 101 a 199 céls/mL. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre características sócio demográficas, clínicas ou laboratoriais para predição de positividade do CrAg ($p > 0,05$). **Conclusão:** A prevalência de criptococose na Região Centro-Oeste, estimada por método antigênico em população HIV com CD4 < 200 céls/mL é alta, considerando-se o ponto de corte para custo efetividade da rotina de rastreamento com CrAg. Não foram identificados fatores clínicos ou laboratoriais que possam auxiliar na predição de positividade, o que corrobora a implementação do rastreamento global de CrAg em regiões semelhantes.

Palavras-chave: Prevalência; Criptococose; Aids; Meningite Criptocócica; Imunocromatografia; Antígenos Fúngicos.

ABSTRACT

Introduction: Cryptococcosis is a severe opportunistic infection caused by *Cryptococcus* species complexes (*Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*). It targets immunocompromised individuals, including those with AIDS. Cryptococcal antigen (CrAg) detection in HIV population with CD4 counts ≤ 100 or < 200 cells/mL has been recommended by the World Health Organization since 2011 in areas with CrAg prevalence $> 3\%$. **Objectives:** To estimate the prevalence and to evaluate associated factors to CrAg positivity in AIDS population in Goiás, Midwest of Brazil. **Methodology:** A cross-sectional study, which evaluated HIV-infected adults, with a CD4 T-cell count < 200 cells/mL, without previous history of cryptococcosis, regardless of the use of antiretroviral therapy (ART), time of diagnosis or symptoms, attended at an infectious diseases reference hospital in Goiânia, Goiás, from June 2015 to July 2018. Demographic, clinical and laboratory characteristics were investigated through interviews with the participants and review of medical records. The serum CrAg test was performed by the Lateral Flow Assay technique (Immuno-Mycologics Inc®, Norman, Oklahoma). The prevalence of cryptococcal antigenemia with confidence interval of 95% (95%CI) was estimated. Chi-square test or Fisher's exact test were used to compare categorical variables and T-test for continuous variables. The level of significance was set at $p < 0.05$. **Results:** Of the 214 individuals recruited, 72% were men ranging in age from 18 to 78 years (median, 40 years). HIV diagnosis was recent in 47% (≤ 12 months) and 88.8% ($n=190$) were antiretroviral experienced, of which 51.4% ($n=110$) were taking this regularly in the previous 3 months. Viral load was undetectable in 25/214. CD4 values ranged from 1 to 199 cells/mL (median, 47 cells/mL). The overall prevalence of CrAg was 7.9% (95%CI 4.7-12.4); 7.5% (12/159) in those with CD4 ≤ 100 cells/mL and 9.1% (5/55) in those with CD4 101 to 199 cells/mL. There were no statistically significant differences between sociodemographic, clinical or laboratory characteristics to predict CrAg positivity ($p > 0.05$). **Conclusion:** The prevalence of cryptococcal antigenemia in an HIV population with CD4 < 200 cells/mL from Midwest Brazil is high, above the cut-off point for the cost-effectiveness of CrAg screening. No clinical or laboratory factors could predict positivity, corroborating the need for universal screening for CrAg in severely immunosuppressed individuals infected with HIV in similar regions.

Key words: Prevalence; Cryptococcosis; AIDS; Cryptococcal Meningitis; Immunochromatography; Fungal Antigens.

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Contextualização

Cryptococcus spp. são fungos encapsulados, basidiomicotas, de distribuição cosmopolita (PERFECT, 2015). Apesar de existirem mais de 30 espécies do gênero *Cryptococcus*, as duas espécies principais, responsáveis pela grande maioria das infecções em humanos, fazem parte dos chamados complexos de espécies *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. Estas espécies foram previamente classificadas em três variedades: *C. neoformans* var. *neoformans*, *C. neoformans* var. *grubii* e *C. neoformans* var. *gattii* (CHAYAKULKEEREE; PERFECT, 2006).

Conforme descrição do Consenso Brasileiro em Criptococose (GRUPO DO CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE, 2008), esta micose abrange duas entidades distintas do ponto de vista clínico e epidemiológico:

“- a criptococose oportunista, cosmopolita, associada a condições de imunodepressão celular causada predominantemente por *Cryptococcus neoformans*;

- a criptococose primária, de hospedeiro aparentemente imunocompetente, endêmica em áreas tropicais e subtropicais, causada predominantemente por *Cryptococcus gattii*”.

O *Cryptococcus* emergiu como um importante patógeno oportunista após o aumento de populações imunodeprimidas (PERFECT, 2015). A criptococose acomete principalmente pessoas com comprometimento da imunidade celular, como os portadores de neoplasias hematológicas, receptores de transplantes de órgãos sólidos, usuários crônicos de corticosteroides ou quem recebe outro tipo de imunossupressão (MITCHELL; PERFECT, 1995). Após o surgimento da aids, a sua incidência aumentou dramaticamente, tendo sido descrito que a infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) estava associada a mais de 80% dos casos de criptococose (PERFECT; CASADEVALL, 2002), chegando a 95% em um estudo brasileiro retrospectivo realizado no Rio Grande do Sul (LEAL et al., 2008).

Na era previa à terapia antirretroviral (TARV) altamente ativa (HAART - *Highly Active Antiretroviral Treatment*), a infecção criptocócica tornou-se uma importante infecção oportunística e uma das principais causas de morte em pessoas infectadas pelo HIV, à medida que as contagens de linfócitos T CD4 (LT CD4) caíam abaixo de

100 céls/mL (PERFECT; CASADEVALL, 2002). Embora o aumento do uso de HAART tenha sido associado a uma menor incidência de casos de criptococose em países desenvolvidos (DROMER et al., 2004), a sua incidência e mortalidade ainda são extremamente altas em certas áreas, em especial na África (BAMBA et al., 2012; DZOYEM et al., 2012; ALEMU et al., 2013). Uma mudança nas características de indivíduos com meningite criptocócica vem ocorrendo, visto que, apesar da disponibilidade da testagem e do tratamento antirretroviral, os pacientes ainda se apresentam tardiamente, se recusam a tratar ou encontram-se em falha terapêutica (JARVIS; HARRISON, 2016; RHEIN et al., 2016; SCRIVEN; LALLOO; MEINTJES, 2016).

A Organização Mundial da Saúde (OMS), desde 2011, tem recomendado o uso da detecção de antígenos de *Cryptococcus* em indivíduos infectados pelo HIV que apresentem CD4 baixo e que sejam assintomáticos do ponto de vista neurológico (WHO, 2011; RAJASINGHAM; MEYA; BOULWARE, 2012). Esta estratégia foi inicialmente recomendada para regiões com prevalência de criptococose maior que 3%, permitindo identificar precocemente indivíduos com doença criptocócica, até mesmo em estágio subclínico (WHO, 2011, 2018).

Estudos têm demonstrado que esta estratégia é custoefetiva em diversos cenários (KAPLAN et al., 2015), inclusive no Brasil (VIDAL et al., 2016), incluindo locais que apresentem prevalência tão baixa quanto 0,6% (JARVIS et al., 2013), muito menor que o valor inicialmente sugerido como ponto de corte pela OMS.

Até o presente momento, existem poucos estudos sobre a prevalência dessa doença no Brasil. Em sua maioria, os estudos brasileiros são: de revisão (PAPPALARDO; MELHEM, 2003), séries de casos (PAPPALARDO; PASCHOAL; MELHEM, 2007), observacionais (LEAL et al., 2008; LINDENBERG et al., 2008; SOUZA et al., 2013; AGUIAR et al., 2017; NUNES et al., 2018), de avaliações ambientais (NISHIKAWA et al., 2003), de avaliação molecular ou sorotipagem (LACAZ; RODRIGUES, 1983; HORTA et al., 2002; OHKUSU et al., 2002; BARRETO DE OLIVEIRA et al., 2004; IGREJA et al., 2004; MARTINS et al., 2007; TRILLES et al., 2008), de suscetibilidade antifúngica (SOUZA et al., 2005; MORALES, 2009) e de dados provenientes do Sistema de Informação do Ministério da Saúde (MS) (SOARES, 2015). Ao serem consideradas informações sobre a prevalência de antigenemia criptocócica no Brasil, os dados são ainda mais escassos, sendo apenas

um da Região Centro-Oeste, variando de 2,6% (COSTA et al., 2013) a 13,9% (NEGRI et al., 2017).

1.2 Histórico e Taxonomia de *Cryptococcus* spp.

Os fungos atualmente classificados como pertencentes ao gênero *Cryptococcus* foram descritos pela primeira vez por Francesco Sanfelice em 1884, na Itália, em amostra ambiental de suco de pêssago. Ele nomeou a levedura de *Saccharomyces neoformans*, por causa de sua forma rara em colônia. A primeira descrição como um patógeno humano foi realizada no mesmo ano, pelo patologista Otto Busse e o cirurgião Abraham Buschke, quando isolaram uma levedura semelhante a *Saccharomyces* de um tumor sarcomatoso presente em tibia de uma mulher jovem (ANTINORI, 2013; KWON-CHUNG et al., 2014).

Em 1914, Versé descreveu seu reconhecido neurotropismo em um caso de meningoencefalite. Em 1916, Stoddard e Cutler descreveram a patogênese da infecção no sistema nervoso central (SNC), relatando pela primeira vez a presença da cápsula polissacarídica, que é uma estrutura própria desta levedura (KWON-CHUNG et al., 2014). O *Cryptococcus* já recebeu vários nomes: *Saccharomyces neoformans*, *Cryptococcus hominis* e *Torula histolytica*. No Brasil, as primeiras descrições de criptococose em isolados clínicos foram realizadas por Carlos da Silva Lacaz em 1941 e por Floriano de Almeida em 1944 (REIS-FILHO et al., 1985; PAPPALARDO; MELHEM, 2003; PERFECT, 2015).

Por várias décadas, as variantes de *C. neoformans* foram agrupadas em cinco sorotipos, baseados em sua estrutura capsular (A, B, C, D e AD). Posteriormente, foi proposto que existiriam duas variedades: *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D) e *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (sorotipo A) e outra espécie, *Cryptococcus gattii* (sorotipo B e C) (KWON-CHUNG, 1976; PERFECT; CASADEVALL, 2002; KWON-CHUNG et al., 2014).

O estudo pioneiro de Lacaz e Rodrigues (1983), sobre sorotipagem de *Cryptococcus* no Brasil, mostrou que a maioria (64%) das 25 amostras biológicas pertenciam à variedade *C. neoformans* sorotipo A, seguido de B e D. A espécie *C. gattii* é endêmica no nordeste do Brasil, sendo responsável por 71% dos casos nesta região (LACAZ; RODRIGUES, 1983).

Em 2005, estudos filogenéticos demonstraram distinção e divergência entre as variedades *gattii* e *neoformans*, com novas propostas de nomenclatura, por

constituírem grupos monofiléticos distintos (BOEKHOUT et al., 2001). A classificação baseada em marcadores moleculares discrimina 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 (BOEKHOUT et al., 2001; TRILLES et al., 2008; KWON-CHUNG et al., 2014).

Em geral, os tipos moleculares mais comumente encontrados no Brasil são VNI (64%) e VGII (21%), seguido por VNII (5%), VGIII (4%), VGI e VNIV (3% cada) e VNIII (<1%), sendo VGII mais comum na região Norte-Nordeste e VNI na região Sul-Sudeste (TRILLES et al., 2008).

Há relatos ocasionais de infecções por diversas espécies não-*neoformans*, como *Cryptococcus laurentii*. Entretanto, para que se defina a casualidade entre a doença por outras espécies de *Cryptococcus* spp., são necessárias comprovação histopatológica rigorosa e o crescimento em cultura (PERFECT, 2015).

Recentemente, foi proposto que *C. neoformans* fosse dividido em duas espécies separadas (*C. neoformans* e *C. deneoformans*) e *C. gattii* em outras cinco espécies, com base em uma análise filogenética de 115 isolados. De acordo com Hagen et al. (2015), as espécies recém-delimitadas diferem em aspectos de patogenicidade, prevalência para grupos de pacientes, bem como aspectos bioquímicos e fisiológicos, como suscetibilidade a antifúngicos, podendo ser diferenciadas pela técnica de MALDI-TOF (*Matrix Associated Laser Desorption-Ionization - Time of Flight*) (HAGEN et al., 2015; KWON-CHUNG et al., 2017). Kwon-Chung et al. (2017), entretanto, recomendam manter o uso da denominação “complexo de espécies *Cryptococcus neoformans*” e “complexo de espécies *C. gattii*” por ser uma estratégia que reconhece a diversidade genética sem criar confusão. Isto porquê, de acordo com este grupo, não há diferenças biológicas entre os clados e inexistiu um consenso de que a sequência genética sozinha pudesse delinear uma espécie ou criar novas. Portanto, a classificação historicamente utilizada ainda seria válida para descrever as diferenças em epidemiologia, patogênese e características clínicas (KWON-CHUNG et al., 2017). A Figura 1 descreve as mudanças de nomenclatura do complexo *Cryptococcus* e as classificações referidas.

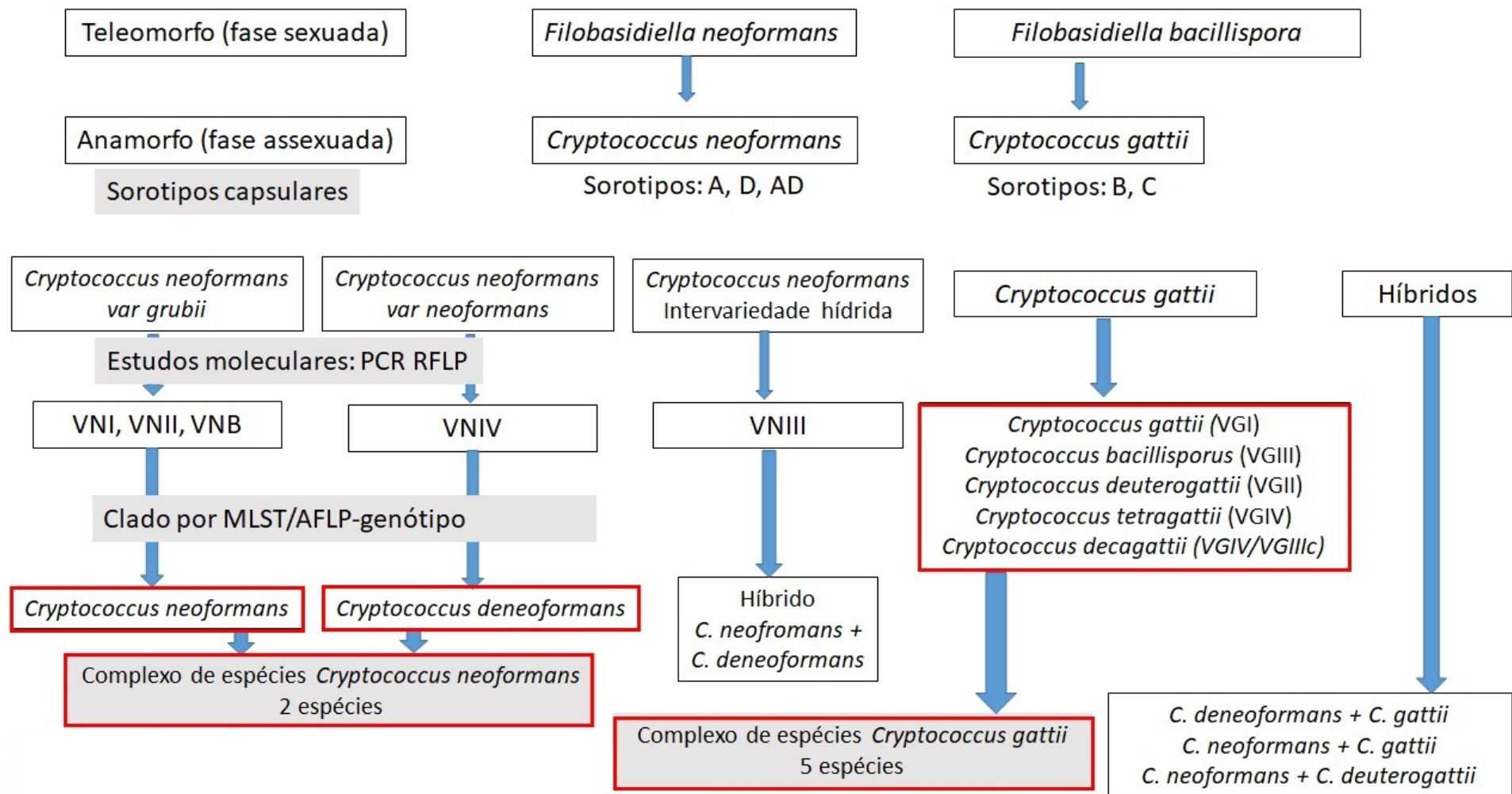


Figura 1 - Mudanças em nomenclatura de *Cryptococcus* spp. e proposta atual.

Fonte: Adaptado de (HAGEN et al., 2015; KWON-CHUNG et al., 2017)

RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism; AFLP - Amplified fragment length polymorphism fingerprinting; MLST - Multi-locus sequence typing.

1.3 Ecologia e Ciclo de Vida de *Cryptococcus* spp.

Os fungos dos complexos *Cryptococcus* são saprófitos na natureza, sendo os do complexo *C. neoformans* primariamente encontrados associados com excretas de certas aves, como pombos e em cavidades de árvores em decomposição (PAPPALARDO; MELHEM, 2003). Os do complexo *C. gattii* foram associados primeiramente a *Eucalyptus*, em áreas tropicais e subtropicais (LAZÉRA et al., 1996). Entretanto, o surto reportado em Vancouver mostrou que sua distribuição e ecologia estão mudando, com habilidade em associar-se a uma variedade de árvores, incluindo abetos e carvalhos (GALANIS et al., 2010; MAY et al., 2016).

Cryptococcus spp. apresenta-se como duas formas distintas, em sua fase assexuada e sexuada. A estrutura primária, isolada em culturas durante a doença clínica, é o estágio assexuado, na forma de leveduras encapsuladas, que se reproduzem por brotamento simples. O estágio sexuado foi observado apenas em laboratório. Contudo, a recombinação sexual aparentemente ocorre na natureza, podendo ser um importante fator de evolução e aptidão patológica de cepas (KWON-CHUNG, 1976; PERFECT, 2015).

As formas leveduriformes podem existir em um ou dois tipos pareados designados de *a* e *alfa*. Coculturas das leveduras de cada tipo, pareados em certos meios de cultura, podem resultar em conjugação entre os tipos *alfa* e *a*, resultando na formação de teleomorfos (formas sexuadas), que consistem em hifas dicarióticas. Em 1976, KWON-CHUNG, descreveu e caracterizou o estágio sexual do *Cryptococcus* e os seus teleomorfos foram chamados *Filobasidiella neoformans* (sorotipos A e D) e *Filobasidiella bacillispora* (sorotipo B e C). Entretanto, esta denominação distinta foi abandonada a partir de 2013 e somente *Cryptococcus* é usado como nomenclatura atual (KWON-CHUNG, 1976; KWON-CHUNG et al., 2014).

A infecção criptocócica é adquirida pela inalação de leveduras desidratadas ou de basidiósporos, que alcançam as vias aéreas distais e vão se depositar nos alvéolos pulmonares (GALANIS et al., 2010). Após a inalação, a maioria das pessoas apresenta uma infecção assintomática ou subclínica, podendo permanecer latente e reativar anos mais tarde, seja em imunodeprimidos seja em imunocompetentes (Figura 2). Eventualmente, a infecção pode ser adquirida diretamente por trauma ou transplante (PERFECT; CASADEVALL, 2002).

A infecção pulmonar primária é, na maior parte das vezes, assintomática ou oligossintomática. A resposta imune do hospedeiro, representada especialmente por linfócitos T auxiliares, pode eliminar a presença do fungo. A levedura pode permanecer em forma latente dentro de fagolisossomos dos macrófagos alveolares, em linfonodos torácicos ou em granulomas. Quando a imunidade é comprometida, a levedura pode se reproduzir, alcançar a corrente sanguínea e atingir o SNC, o principal órgão de predileção em hospedeiros susceptíveis (PERFECT, 2015; MAZIARZ; PERFECT, 2016).

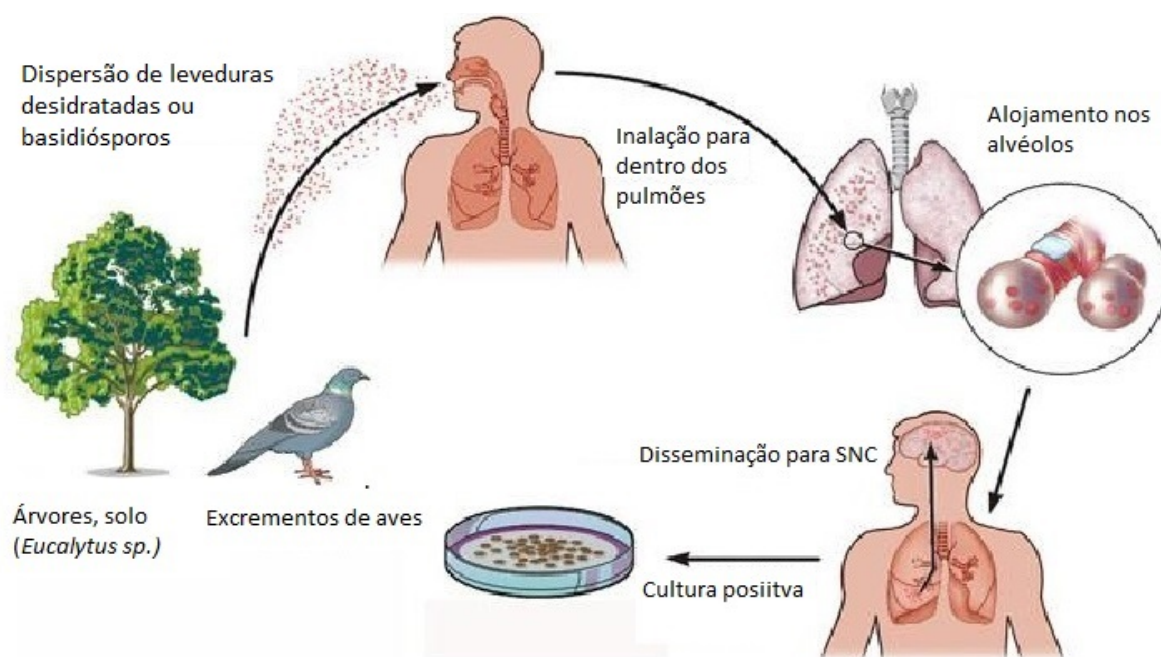


Figura 2 - Modo de transmissão do complexo *Cryptococcus*.

Fonte: Traduzido e adaptado de (RAKSHA; SINGH, 2013).

O fungo adentra o líquido cefalorraquidiano (LCR) através do endotélio microvascular da barreira hematoencefálica, utilizando alguns mecanismos como: o cavalo de Tróia, ao se esconder dentro de células mononucleares; ou por vias de migração trans celular e paracelular (LIN; HEITMAN, 2006; SABIITI; MAY, 2012; FRANCO-PAREDES et al., 2015).

Possíveis explicações para o neurotropismo de espécies de *Cryptococcus* spp. baseiam-se em aspectos anatômicos e funcionais em humanos. O SNC, e particularmente os espaços perivasculares (espaços de Virchow-Robin), podem servir de nicho para esses fungos. Além disso, parece haver receptores neuronais específicos que atraem este agente. Uma vez no SNC, o *Cryptococcus* spp. utilizaria

os substratos neuronais, como os neurotransmissores (dopamina ou adrenalina), para a síntese da melanina, um componente da parede celular que aumenta a proteção contra o estresse oxidativo e a fagocitose, promovendo o crescimento e a sobrevivência do fungo (LIN; HEITMAN, 2006; FRANCO-PAREDES et al., 2015).

Em geral, em avaliações histológicas revelam o caráter meningoencefálico da infecção, evidenciando o envolvimento de meninges e parênquima cerebral, incluindo abscessos e pseudocistos (COLOMBO; RODRIGUES, 2015).

1.4 Aspectos Clínicos, Laboratoriais e Complicações da Infecção Criptocócica

As apresentações clínicas da infecção criptocócica são diversas, variando entre colonização do trato respiratório, presença de antígeno criptocócico (CrAg) sérico positivo sem repercussão clínica ou a forma disseminada da doença. Ela pode acometer qualquer órgão, sendo as principais apresentações: pulmonar, meningoencefálica, hematogênica, cutânea, ocular, prostática e óssea (MITCHELL; PERFECT, 1995; CDC; NIH; HIV MEDICINE ASSOCIATION, 2018).

Embora a infecção se inicie nos pulmões, a meningite é a manifestação mais frequentemente encontrada dentre todos os indivíduos acometidos, incluindo os portadores de HIV. A infecção é mais propriamente caracterizada como meningoencefalite visto que o parênquima cerebral é quase sempre envolvido em exames histológicos. As formas não-meníngeas são proporcionalmente mais frequentes entre indivíduos não infectados pelo HIV (SLOAN; PARRIS, 2014; BOWEN et al., 2016).

A meningoencefalite criptocócica representa 70% a 90% dos casos de doença criptocócica em pacientes com HIV, sendo uma infecção ameaçadora à vida. Apresenta alta morbidade e mortalidade, contando com 15% de todas as mortes por aids globalmente (RAJASINGHAM et al., 2017; WHO, 2018). Nesta população, são mais frequentes a criptocococemia (hemocultura positiva), a apresentação meningoencefálica, o aumento da pressão intracranial e a presença de maiores títulos antígenicos (JARVIS et al., 2014).

Os sintomas da neurocriptococose geralmente se iniciam de forma indolente, durante um período de duas a quatro semanas, podendo ocorrer por meses antes do diagnóstico. Os mais comuns são febre, fraqueza, cefaleia, letargia, alteração de personalidade e perda de memória. Rigidez de nuca, fotofobia e vômito são vistos em

um quarto a um terço dos pacientes, ocasionalmente evoluindo para coma e morte fulminante em dias. Perda visual e auditiva também são relatadas. Outros sintomas podem sugerir doença disseminada associada, como tosse, dispneia e lesões cutâneas semelhantes a molusco contagioso (PERFECT, 2015; BOWEN et al., 2016).

Uma alta suspeição de meningite criptocócica em indivíduos com LT CD4 menor que 100 céls/mL, que apresentam febre isolada e cefaleia é importante. A avaliação inicial deve incluir anamnese detalhada, exame neurológico, pesquisa de CrAg sérico e punção lombar com análise do líquido (PERFECT et al., 2010; WHO, 2018).

A punção lombar deve ser realizada em todos aqueles com sintomas neurológicos ou CrAg sérico positivo, auxiliando na confirmação do diagnóstico e na detecção de hipertensão intracraniana. O aumento da pressão intracraniana pode estar presente ao diagnóstico e o nível da hipertensão associa-se com mortalidade. O manejo agressivo da hipertensão intracraniana, pode reduzir complicações e óbitos (PERFECT et al., 2010; BRIZENDINE; BADDLEY; PAPPAS, 2013; VIDAL et al., 2013; JARVIS et al., 2014; CDC; NIH; HIV MEDICINE ASSOCIATION, 2018).

O mecanismo que causa aumento da pressão intracraniana em indivíduos com criptococose no SNC não é completamente compreendido. Acredita-se que pode dever-se ao aumento da permeabilidade vascular e ao edema cerebral resultante da inflamação induzida por citocinas. Ou ainda resultar da deterioração da função reabsortiva das vilosidades aracnoideanas, secundária ao acúmulo do fungo e de polissacarídeos capsulares, resultando em má circulação do LCR (PETER, 2005).

Muito embora a hidrocefalia comunicante pode estar presente, uma punção lombar geralmente pode ser executada sem complicações significativas para a grande maioria dos indivíduos. Uma tomografia computadorizada de crânio deve ser solicitada como avaliação radiológica inicial. Entre aqueles com pressão intracraniana persistentemente elevada, o momento para a realização de uma derivação permanente, seja ela ventriculoperitoneal ou ventriculoatrial, deve ser discutido. Quando indicada, deve ser realizada após o início da terapia antifúngica eficaz (PETER, 2005; PERFECT, 2015).

A avaliação líquórica em portadores de HIV classicamente demonstra baixa contagem de leucócitos, com predomínio mononuclear; a proteína pode ser pouco aumentada e a concentração de glicose comumente é baixa. Aproximadamente 25-

30% dos pacientes com cultura comprovando neurocriptococose tem perfil liquórico normal (HAJJEH et al., 1999).

Pacientes aparentemente imunocompetentes – não portadores de HIV, não transplantados e sem uso de medicações imunossupressoras – apresentam maior pleocitose liquórica, maior proteinorraquia, hipoglicorraquia mais acentuada, o que representa uma resposta inflamatória mais intensa. Esta população tem, em geral, tempo mais prolongado de sintomas e maior mortalidade, se comparados à população HIV e transplantados, possivelmente pela baixa suspeição clínica (BRIZENDINE; BADDLEY; PAPPAS, 2013).

Fatores de risco independentemente relacionados à mortalidade por meningoencefalite criptocócica em indivíduos HIV positivos incluem: alta carga fúngica, baixa taxa de depuração fúngica, estado mental alterado, escassez de pleocitose de leucócitos no LCR, imagens cerebrais anormais, pressão intracraniana elevada à admissão, persistência da hipertensão intracraniana, infecção disseminada e longa duração dos sintomas prévios ao diagnóstico (VIDAL et al., 2012; JARVIS et al., 2014). A presença de criptococcemia e a pressão liquórica inicial maior que 25 cmH₂O também foram identificados como preditores de mortalidade em uma coorte retrospectiva composta por PVHA, transplantados de órgãos sólidos e outros fatores de imunossupressão (BRIZENDINE; BADDLEY; PAPPAS, 2013).

O momento de início do tratamento antirretroviral deve considerar a vantagem potencial de recuperação imune precoce e o risco de desenvolver uma Síndrome de Reconstituição Imune (SIRI), com suas complicações. Acredita-se que esta síndrome resulte de resposta imune celular específica exagerada, com liberação intensa de citocinas pró-inflamatórias (CHANG et al., 2013). A SIRI pode apresentar-se como um agravamento de uma infecção conhecida (SIRI "paradoxal") ou infecção pré-existente não reconhecida (SIRI "oculta") no cenário de melhora da função imunológica. Em geral os sintomas são sugestivos de doença em atividade, com cefaleia, febre, sinais meníngeos e aumento da pressão intracraniana, porém as culturas são na maior parte das vezes negativas, embora leveduras podem estar presentes em esfregaços (GRUPO DO CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE, 2008).

Os principais fatores de risco para SIRI paradoxal em meningite criptocócica são relacionados a doença criptocócica mais grave, incluindo fungemia, uma contagem de LT CD4 muito baixa, a falta de TARV prévia, a falta de esterilização liquórica na segunda semana de tratamento, a introdução da HAART durante a parte

inicial da terapia de indução, a queda rápida da carga viral em resposta à TARV, elevados títulos de CrAg e uma escassez de inflamação líquórica (por exemplo, leucócitos <25 células/ μ L), no momento do diagnóstico (CHANG et al., 2013).

1.5 Diagnóstico Laboratorial da Criptococose

O diagnóstico laboratorial é constituído principalmente de: pesquisa direta do agente em fluido biológico, pesquisa de antígeno capsular criptocócico, cultivo e exame anatomopatológico (CHAMMARD et al., 2018).

1.5.1 Pesquisa direta

Há três testes que podem ser utilizados para a identificação rápida de *Cryptococcus* spp.: visualização de leveduras encapsuladas em preparados de tinta da China; teste de urease positivo e atividade de lacase, evidenciando a capacidade de conversão de compostos difenólicos em melanina (PERFECT, 2015).

A tinta nanquim, tinta da China ou nigrosina, é um pigmento utilizado como contraste durante a visualização direta, pois não penetra a cápsula do *Cryptococcus*. Um centrifugado de líquido é misturado a uma gota de tinta da China e examinado ao microscópio, demonstrando estruturas arredondadas, leveduriformes, encapsuladas. O fungo destaca-se contra o fundo negro proporcionado pela tinta e é visto como a esfera central e a parte periférica é a cápsula mucopolissacarídica, com espessura comparável ao diâmetro do parasita (Figura 3).

A pesquisa em tinta da China é um exame útil e rápido, sendo positiva em 58,9% nos indivíduos HIV negativos e 78,0% a 91,5% nos com aids (ANTINORI, 2013). Todavia, é um exame dependente da experiência do microbiologista. Existem relatos na literatura de falso negativo em até 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 (GRUPO DO CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE, 2008; PERFECT et al., 2010; WHO, 2018).

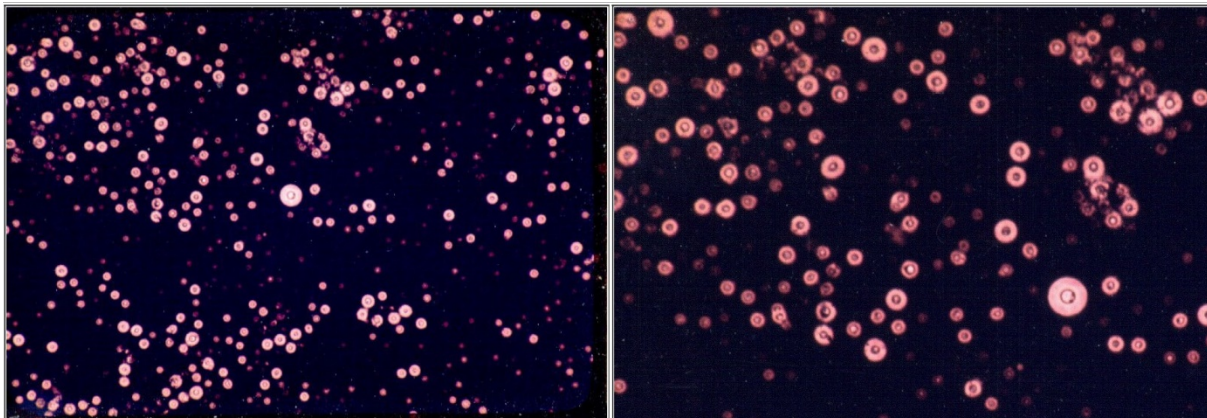


Figura 3 - *Cryptococcus neoformans* no líquido com tinta da China, revelando a cápsula clara, em contraste com o pigmento negro

Fonte: UNICAMP (2018).

As leveduras de *Cryptococcus* spp. podem ser identificadas em espécimes histopatológicos usando algumas colorações: Grocott-Gomori (metenamina de prata), ácido periódico de Schiff (PAS), o mucicarmim - que tingem a cápsula com coloração vermelha - e a coloração de Fontana-Massom, que revela as leveduras que contêm melanina como marrom-avermelhadas (RAKSHA; SINGH, 2013).

1.5.2 Cultura

A cultura do líquido é considerada padrão ouro para diagnóstico de neurocriptococose, pois a mesma se apresenta positiva em 50 a 89% nos indivíduos HIV negativos e 90% a 100% nos com aids. Hemoculturas são positivas em 47 a 70% dos casos em HIV positivos e 21% em não infectados pelo HIV (GRUPO DO CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE, 2008; ANTINORI, 2013). Fungos do complexo *Cryptococcus* spp. crescem na maior parte dos meios de cultura rotineiramente utilizados em laboratório: ágar-sangue, ágar Sabouraud-dextrose e ágar infusão de cérebro-coração. A temperatura ótima para crescimento é entre 30 e 35°C e a termotolerância máxima é de 40°C. Colônias de *C. neoformans* aparecem entre 48 a 72 horas após semeadura, como colônias opacas de coloração branco a creme, mucoides, com alguns milímetros de diâmetro (Figura 3) (GRUPO DO CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE, 2008; RAKSHA; SINGH, 2013).

Meios seletivos contendo cicloheximida inibem o crescimento desta levedura e devem ser evitados. Em meios que identificam melanina, as colônias mudam de coloração marrom para preto. E em meio de cultura contendo canavanina, glicina e

azul de bromotimol (CGB), a espécie *C. gattii* torna o meio azul por assimilar a glicina como fonte de carbono, formando amônia e alcalinizando o meio (Figura 4). Para hemoculturas, o método de lisecentrifugação pode ser utilizado para melhorar o isolamento (MITCHELL; PERFECT, 1995; GRUPO DO CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE, 2008; RAKSHA; SINGH, 2013).

Em geral, na rotina dos serviços de micologia, as amostras com suspeita de infecção fúngica são semeadas em ágar Sabouraud-dextrose. Após isolamento da levedura, são realizadas provas de identificação constituídas de: visualização da cápsula em tinta da China, assimilação de açúcares e detecção das enzimas urease (ágar ureia) e fenoloxidase (ágar semente de Níger). A diferenciação entre *C. neoformans* e *C. gattii* é feita em duplicata por quimiotipagem, através do meio CGB.

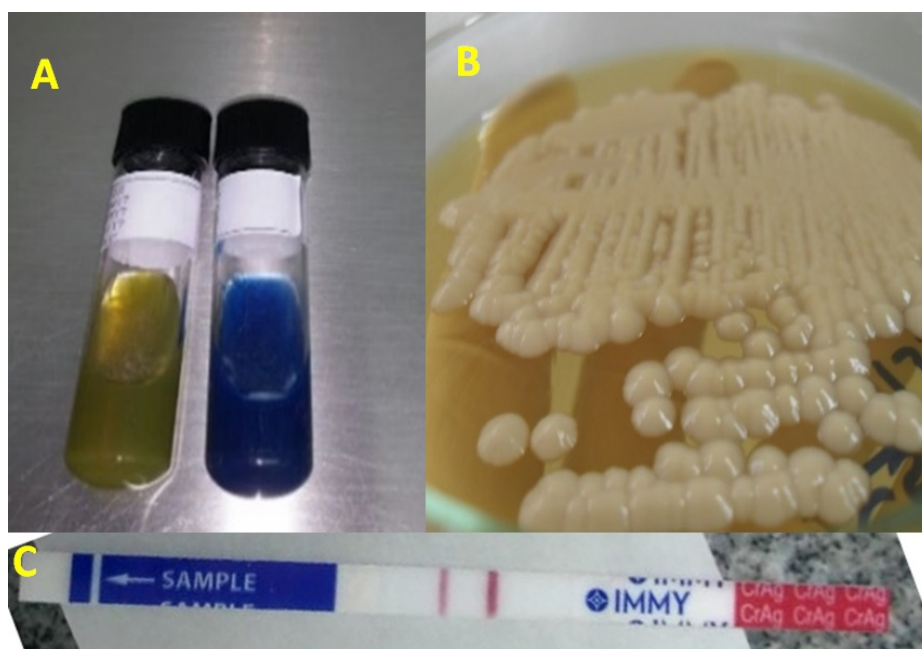


Figura 4 – A) meio canavanina, glicina e azul de bromotimol (CGB), identificando a colônia de *Cryptococcus gattii* em azul ; B) crescimento de colônias leitosas do complexo *Cryptococcus neoformans*; C) fita de teste de CrAg por *Lateral Flow Assay* positiva

Fonte: Autoria própria. Seção de Micologia/Laboratório de Saúde Pública Dr. Giovanni Cyneiros (Lacen-GO).

1.5.3 Diagnóstico Antigênico

A pesquisa do CrAg é uma metodologia diagnóstica considerada sensível e específica para a identificação de criptococose. Ela geralmente é realizada por meio

de técnicas imunodiagnósticas, como a aglutinação em látex, o ensaio de imunoabsorção enzimática em sanduíche (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* - ELISA) e, mais recentemente, o ensaio de fluxo lateral (*Lateral Flow Assay* - LFA) (WHO, 2018).

A presença de CrAg em amostra sanguínea pode ser identificada pelo menos 22 dias até mais de 100 dias antes da apresentação de sintomas neurológicos (FRENCH et al., 2002; WHO, 2018). Foi verificado tratar-se de um preditor independente de mortalidade nas primeiras 12 semanas de TARV e do desenvolvimento de criptococose no primeiro ano de tratamento (LIECHTY et al., 2007; JARVIS et al., 2009). A Figura 5 demonstra a concentração de CrAg em fluidos biológicos durante a progressão da criptococose.

A presença de meningite precoce, sintomática, com evidência de antigenemia sérica positiva e em líquido negativa foi descrita recentemente, com mortalidade elevada mesmo em uso de Fluconazol (SSEBAMBULIDDE et al., 2018).

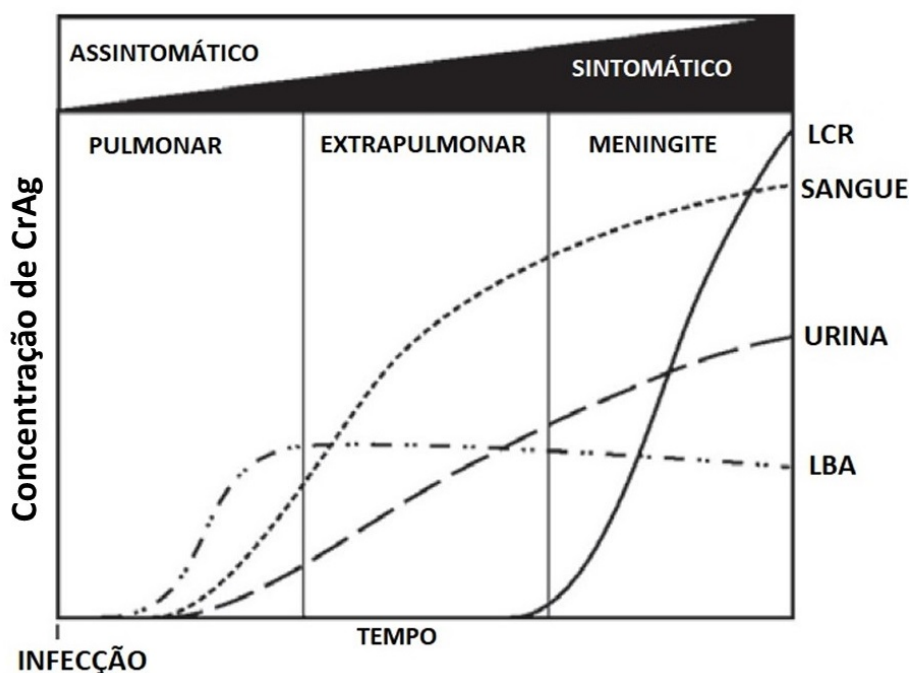


Figura 5 - Sequência temporal esquemática da concentração de CrAg em fluidos corporais durante a progressão da doença desde a fase pulmonar à meningite.

Fonte: Kozel e Bauman (2012).

CrAg: antígeno criptocócico, LCR: líquido cefalorraquidiano, LBA: fluido de lavado broncoalveolar.

1.5.3.1 Ensaio de Fluxo Lateral (Lateral Flow Assay - LFA)

Em 2011, a agência americana de Administração de Alimentos e Remédios (*Food and Drug Administration* - FDA) aprovou a técnica para detecção de antígenos criptocócicos, denominada ensaio de fluxo lateral - LFA (Immuno-Mycologics Inc®, Norman, Oklahoma), para uso em soro e em LCR. Ela foi posteriormente aprovada também pelo *Conformité Européene* (CE) para soro, plasma, sangue total (punção venosa e dedo) e LCR (KAPLAN et al., 2015).

O LFA consiste na aplicação do método imunocromatográfico, similar às fitas utilizadas para o diagnóstico de gravidez (Figuras 4 e 6), desenhado para ser utilizado em cenários “onde o paciente está” (*point-of-care*). Ela apresenta custo menor que outras técnicas para detecção de antígenos, não necessita de refrigeração e sua realização é simples, requerendo menos de 10 minutos para obter o resultado.

O LFA utiliza dois anticorpos monoclonais conjugados, impregnados de ouro, em uma tira de teste imunocromatográfico. Eles têm ampla reatividade contra os quatro principais sorotipos de antígenos capsulares criptocócicos (A e D para o complexo *Cryptococcus neoformans* e B e C para o complexo *Cryptococcus gattii*), de tal modo que, se o CrAg está presente num espécime, anticorpos conjugados com ouro em suspensão ligam-se ao antígeno. Os complexo ouro-anticorpo-CrAg migram por ação capilar, interagem com os anticorpos monoclonais contra CrAg imobilizados, e formam uma linha vermelha (KOZEL; BAUMAN, 2012; VIDAL; BOULWARE, 2015; WILLIAMS et al., 2015). A Figura 6 ilustra a sequência para a detecção de CrAg utilizando LFA.

O kit Immy CrAg/LFA® contém 50 tiras de teste CrAg/LFA, diluente de titulação e amostra de controle positivo. O kit pode ser armazenado à temperatura ambiente por aproximadamente dois anos. O custo do kit adquirido em 2017 foi de aproximadamente R\$ 1.500,00 (\$ 395,00 dólares), totalizando R\$ 30,00 (\$ 7,90 dólares) por teste. A Figura 7 mostra as etapas para a realização do teste CrAg LFA.

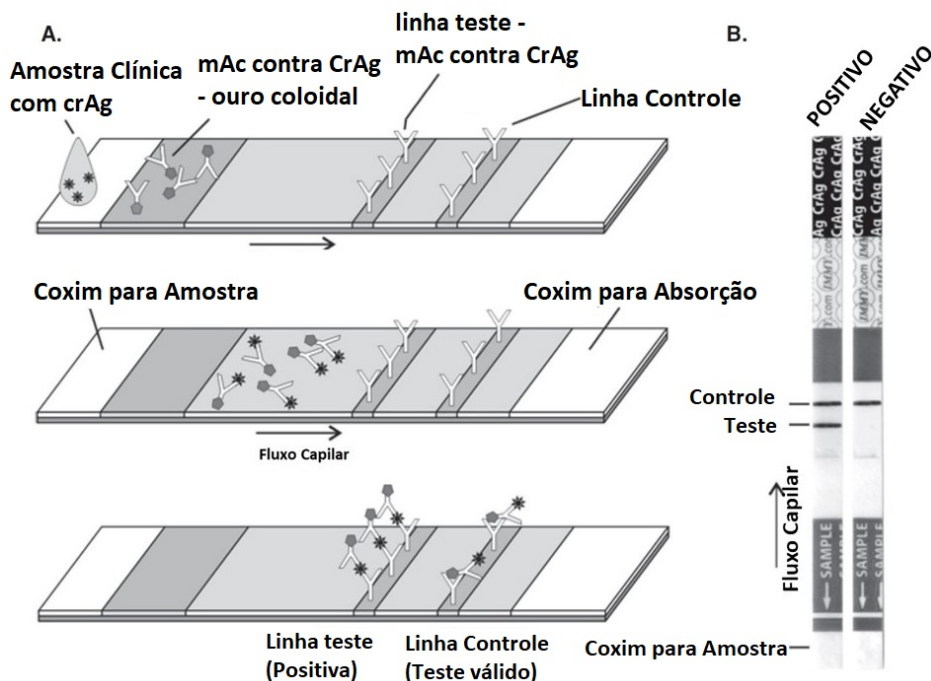


Figura 6 - Painei A: esquema mostrando operação de ensaio imunocromatográfico de fluxo lateral (LFA) para detecção de antígeno criptocócico (CrAg). O LFA é construído a partir de anticorpos monoclonais específicos para o CrAg. Painei B: imagens de LFA positivo e negativo.

Fonte: Kozel e Bauman (2012).

LFA: *Lateral Flow Assay*, mAbs: *monoclonal antibodies*

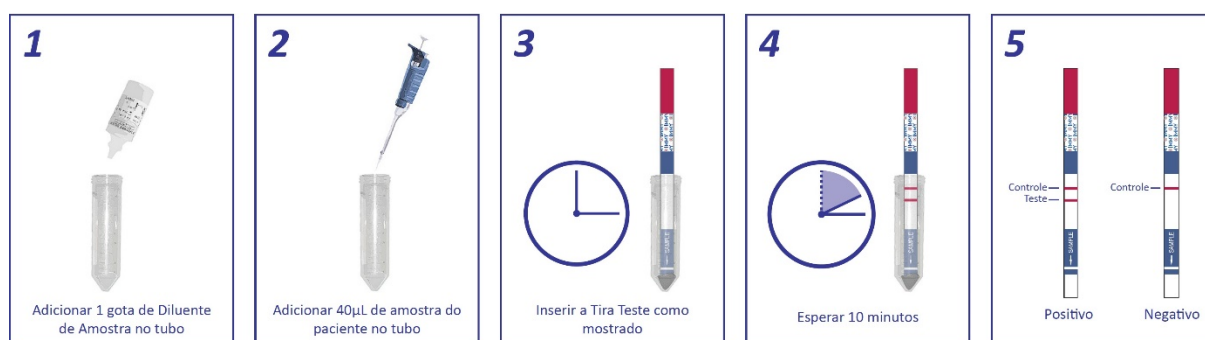


Figura 7 - Etapas para a realização do teste CrAg. Cinco passos simples para executar a detecção do antígeno criptocócico utilizando LFA. Passo 1: adicionar uma gota de diluente no tubo. Passo 2: adicionar cerca de 40 µL (1 gota) da amostra do paciente no tubo. Passo 3: inserir a tira de LFA para dentro do tubo. Passo 4: incubar durante 10 minutos. Passo 5: interpretar os resultados. Dados contidos em bula do produto.

Fonte: IMMY (2016).

LFA: *Lateral Flow Assay*

A OMS recomenda em seu guia, desde 2011, o rastreamento de CrAg, seguido por terapia antifúngica preemptiva em indivíduos CrAg positivos, para prevenir o desenvolvimento de doença criptocócica invasiva. Esta estratégia é recomendada antes de iniciar ou reiniciar TARV para adultos e adolescentes vivendo com HIV que apresentem contagem de LT CD4 <100 céls/mL, podendo ser considerado um limite superior de contagem de LT CD4 <200 céls/mL. A pesquisa de CrAg permite identificar precocemente indivíduos com doença criptocócica em estágio subclínico (FORD et al., 2018; WHO, 2018).

O CrAg LFA apresenta algumas vantagens: tempo de resultado rápido (menor que 10 minutos), requer pouco treinamento para uso e interpretação e pode ser executado com o mínimo de infraestrutura laboratorial e sem armazenamento refrigerado .

Recentemente, a técnica de LFA foi validada no escopo dessa estratégia de rastreio, facilitando sua aplicação na prática clínica (PONGSAI; ATAMASIRIKUL; SUNGKANUPARPH, 2010; OYELLA et al., 2012; RAJASINGHAM; MEYA; BOULWARE, 2012; ALEMU et al., 2013; RUGEMALILA et al., 2013; CHIPUNGU et al., 2015; HUANG et al., 2015; KAPLAN et al., 2015; MFINANGA et al., 2015; LARSON et al., 2016). Adicionalmente, outros estudos demonstraram que o rastreio pode também ser relevante em PVHA já experimentadas em TARV e com imunodepressão grave (BEYENE et al., 2013; VIDAL et al., 2016).

Até o momento, nenhum estudo abordou de forma randomizada especificamente a questão da triagem de antígenos criptocócicos ou da profilaxia com fluconazol (FLU) entre os indivíduos com TARV que se apresentam após um período de abandono de tratamento e com a doença avançada pelo HIV. No entanto, o Grupo de Desenvolvimento de Diretrizes da OMS considerou que essas recomendações se aplicariam igualmente a esse grupo (WHO, 2018).

Em uma revisão que avaliou o desempenho do teste LFA em diversos estudos, a sensibilidade em sangue e líquido foi de 100% e a especificidade de 99,5% e 97,7%, respectivamente (KLAUSNER; VIJAYAN; CHILLER, 2013). A Tabela 1 demonstra dados sobre sensibilidade e especificidade do teste. Elaboramos a tabela com os dados do fabricante (PELFREY; BAUMAN, 2012), dois estudos de validação (JARVIS et al., 2011; BOULWARE et al., 2014a) e três revisões, incluindo a análise presente no guia da OMS (KLAUSNER; VIJAYAN; CHILLER, 2013; HUANG et al., 2015; WHO, 2018).

Tabela 1 - Estudos que avaliaram sensibilidade e especificidade do teste antigênico criptocócico pela técnica *Lateral Flow Assay*

Autores e ano de publicação	LFA em soro, plasma, sangue total		LFA em líquido cefalorraquidiano	
	Sensibilidade	Especificidade	Sensibilidade	Especificidade
	% (IC95%)	% (IC95%)	% (IC95%)	% (IC95%)
Jarvis et al. (2011)	100,0 (94,0-100,0)	-	-	-
Pelfrey; Bauman (2012)	100,0 (98,0-100,0)	99,0 (97,0-99,0)	100,0 (97,0-100,0)	97,0 (92,0-99,0)
Klausner; Vijayan; Chiller (2013)	100,0 (95,6-100,0)	99,5 (95,7-100,0)	100,0 (96,2-100,0)	97,7 (70,4-100,0)
Boulware et al. (2014)	98,3	92,0	99,3	99,1
Huang et al. (2015)	97,6 (95,6-98,9)	98,1 (97,4-98,6)	98,9 (97,9-99,5)	98,9 (98,0-99,5)
WHO (2018)	100,0 (97,6-100,0)	96,8 (93,7-98,6)	94,1 (91,8-96,4)	97,1 (95,4-98,8)

LFA: *Lateral Flow Assay*.

O Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos do MS do Brasil (PCDT) recomenda o uso da técnica antigênica, desde 2017.

“A estratégia de triagem e tratamento preemptivo de doença criptocócica tem demonstrado evitar óbitos, sendo custo-efetiva para PVHA sem uso prévio de TARV ou experimentados em ARV – mas sem tratamento efetivo – com contagem de LT-CD4+ abaixo de 100 céls/mm³ e procedentes de locais de elevada prevalência de antigenemia criptocócica. Métodos que podem ser utilizados para a estratégia são o teste de aglutinação com látex ou LFA em soro ou plasma. Pacientes sem manifestações clínicas de doença criptocócica e teste demonstrando antigenemia criptocócica isolada devem ser submetidos a punção lombar, visando descartar meningite criptocócica” (BRASIL, 2018).

1.6 Manejo Terapêutico da Meningoencefalite Criptocócica em Portadores de HIV

O diagnóstico precoce e o tratamento adequado são os fatores cruciais para o sucesso terapêutico em meningite criptocócica. Sem tratamento, ela é considerada fatal (SRICHATRAPIMUK; SUNGKANUPARPH, 2016). O tratamento da meningite criptocócica consiste em três aspectos principais: terapia antifúngica, manejo da hipertensão intracraniana e recuperação imune com a TARV. O objetivo principal do

tratamento é a rápida depuração das leveduras no líquido (CDC; NIH; HIV MEDICINE ASSOCIATION, 2018). Uma alta carga fúngica e uma lenta esterilização do LCR são fatores de pior prognóstico (LOFGREN et al., 2017).

A integração entre o tratamento específico da criptococose e do HIV, leva à melhor sobrevida dos pacientes. O tempo para a introdução de TARV necessita ser cuidadosamente avaliado (SRICHATRAPIMUK; SUNGKANUPARPH, 2016). Em estudo randomizado (BOULWARE et al., 2014b) e em recente revisão sistemática (ESHUN-WILSON et al., 2018), foi demonstrado que o início imediato da TARV, conjuntamente ao tratamento da meningite criptocócica, tem maior mortalidade se comparado a adiar por certo período após o início da terapia antifúngica.

Cryptococcus spp. são, em geral, suscetíveis a antifúngicos poliênicos (anfotericina B), flucitosina (5FC) e azólicos como o Fluconazol (FLU). Poucas mudanças ocorreram nas opções terapêuticas nos últimos 20 anos, sem perspectivas imediatas de novas drogas. O tratamento consiste em três fases: indução, preferencialmente com combinação de drogas, por uma a duas semanas; consolidação, com altas doses de FLU (400 mg a 800 mg) por oito a dez semanas; e manutenção, com FLU 200 mg por dia, até recuperação imune adequada (CDC; NIH; HIV MEDICINE ASSOCIATION, 2018).

A OMS, em seu guia publicado em 2018 (WHO, 2018) recomenda a realização de uma punção lombar com aferição da pressão de abertura do LCR e um teste rápido de CrAg em sangue e posteriormente em líquido, para todos os adultos, adolescentes e crianças vivendo com HIV, com suspeita de apresentar um primeiro episódio de meningoencefalite criptocócica.

O tratamento para meningoencefalite criptocócica, foi recentemente atualizado, baseado em um estudo randomizado, controlado realizado na África (MOLLOY et al., 2018) e em uma revisão sistemática (TENFORDE et al., 2018). Trata-se de um curso de uma semana de regime de indução, com a associação de anfotericina B deoxicolato (ABdx) (1,0 mg/kg/dia) e 5FC (100mg/kg, dividido em quatro doses por dia), seguido pelas fases de consolidação e manutenção com FLU. O guia para tratamento de doenças oportunistas em HIV do *National Health Institute* dos Estados Unidos (CDC; NIH; HIV MEDICINE ASSOCIATION, 2018) e o PCDT do MS do Brasil (BRASIL, 2018) ainda recomendam o tempo de duas semanas, com uso preferencial da anfotericina B lipossomal (3-4mg/kg/dia) em substituição à ABdx no guia norte-americano.

Outras opções para a fase de indução são (BRASIL, 2018; CDC/NIH, 2018; WHO, 2018):

- ABdx (1,0 mg/kg/dia) associada ao FLU (1.200 mg ou 12 mg/kg) por duas semanas;
- FLU (1.200 mg ou 12 mg/kg) associada à 5FC (100 mg/kg, dividido em quatro doses por dia) por duas semanas;
- FLU 1.200 mg em monoterapia.

No Brasil, assim como na maioria dos países de baixa e média renda, a 5FC não está disponível, restando como opção para a fase de indução a associação de anfotericina B (deoxicolato ou formulação lipídica) e FLU em altas doses (800 a 1.200 mg) por no mínimo duas semanas. A monoterapia com FLU nesta fase é desaconselhada, por apresentar pior prognóstico, porém, por vezes, é a única opção disponível em algumas áreas da África (WILLIAMSON et al., 2017; BRASIL, 2018).

As formulações lipídicas, quando disponíveis, devem ser utilizadas em substituição à ABdx, como opções para minimizar efeitos adversos e nefrotoxicidade. As doses recomendadas são: anfotericina B lipossomal 3-4 mg/kg/dia e anfotericina B complexo lipídico 5 mg/kg/dia (PERFECT et al., 2010).

Na revisão realizada por Tenforde et al. (2018), o regime de uma semana de ABdx 1,0 mg/kg/dia associada à 5FC 100 mg/kg, dividido em quatro doses por dia, seguido de FLU 1.200 mg nos dias 8 a 14, teve menor mortalidade quando comparado com:

- 1) duas semanas de ABdx associada a 5FC (Risco Relativo [RR]=0,62, IC95% 0,42 a 0,93; 228 participantes, 1 estudo);
- 2) duas semanas de ABdx e FLU (RR=0,58, IC95% 0,39 a 0,86; 227 participantes, 1 estudo),
- 3) uma semana de ABdx com duas semanas de FLU (RR=0,49, IC95% 0,34 a 0,72; 224 participantes, 1 estudo); e
- 4) duas semanas de 5FC e FLU (RR=0,68, IC95% 0,47 a 0,99; 338 participantes, 1 estudo).

A evidência para cada uma dessas comparações foi de certeza moderada.

A fase de consolidação deve ser iniciada após pelo menos duas semanas de terapia de indução bem sucedida, definida como melhora clínica substancial e cultura negativa do LCR após repetição da punção lombar (CDC; NIH; HIV MEDICINE ASSOCIATION, 2018). Pode ser considerado maior tempo de indução em pacientes

comatosos ou com deterioração clínica, hipertensão intracraniana persistentemente elevada, cultura líquórica positiva após as duas semanas de terapia e/ou achados neuroradiológicos atribuídos à criptococose (por exemplo, pseudocistos mucinosos) (BRASIL, 2018).

O esquema preconizado para consolidação consiste no uso de FLU 800 mg/dia para adultos ou 6-12 mg/kg/dia para crianças e adolescentes, segundo a OMS (WHO, 2018). Há ainda a recomendação de FLU 400mg a 800mg por oito semanas após a indução, com menor dose especialmente se a indução for realizada com Anfotericina B e 5FC. Itraconazol 200 mg 12/12h pode ser alternativa, em casos em que o FLU não está disponível ou indicado (SLOAN; PARRIS, 2014; CDC; NIH; HIV MEDICINE ASSOCIATION, 2018). Porém, o itraconazol tem potencial para interações com vários medicamentos antirretrovirais comumente usados (incluindo efavirenz, darunavir, lopinavir e ritonavir) e a OMS não recomenda seu uso como primeira opção (WHO, 2018).

A manutenção ou profilaxia secundária deve conter FLU 200mg/dia para adultos ou 6 mg/kg/dia para adolescentes e crianças e deve ser mantida por pelo menos um ano em pacientes com uma contagem de LT CD4 $\geq$ 100 céls/mL e uma carga viral totalmente suprimida (WHO, 2018). De acordo com o PCDT (BRASIL, 2018), esta dose deve ser mantida por pelo menos 12 meses e duas contagens de CD4 superiores a 200 céls/mL, com intervalo de seis meses. O guia americano orienta a manutenção até contagem de LT CD4 maior que 100 céls/mL, por pelo menos três meses em uso de TARV, carga viral indetectável e ausência de sintomas. Caso o CD4 caia abaixo de 100 céls/mL, deve ser reiniciada a profilaxia secundária. O FLU é superior ao itraconazol e à anfotericina B como terapêutica para a manutenção (CDC; NIH; HIV MEDICINE ASSOCIATION, 2018; WHO, 2018).

A terapia com anfotericina B pode ser administrada a mulheres grávidas com doença meníngea e não meníngea. A exposição à 5FC e ao FLU durante a gravidez tem sido associada a um aumento do risco de defeitos congênitos em estudos em animais e alguns estudos em humanos não controlados. O uso de 5FC e FLU no tratamento da doença criptocócica em gestantes deve ser avaliado individualmente, considerando os benefícios e possíveis danos (WHO, 2018).

O uso de corticosteroides como terapia adjuvante durante a fase de indução não é recomendado. Um ensaio clínico randomizado, placebo, controlado (BEARDSLEY et al., 2016), comparou o uso de dexametasona por seis semanas

versus placebo, em um grupo de 451 pacientes HIV-positivos e com meningite criptocócica, onde todos eles receberam o mesmo esquema terapêutico antifúngico. Não houve diferença na mortalidade entre os dois grupos - razão de risco de morte no grupo dexametasona foi 1,11 (IC95% 0,84-1,47) em 10 semanas e 1,18 (IC95% 0,91-1,53) em seis meses. Eventos adversos graves foram mais comuns no grupo da dexametasona, incluindo infecções grau 3 ou 4, distúrbios cardíacos, renais e gastrointestinais e anormalidades bioquímicas. A taxa de depuração fúngica no LCR nas primeiras duas semanas de tratamento foi mais lenta no grupo dexametasona do que no grupo controle (BEARDSLEY et al., 2016).

Outras medidas importantes no manejo clínico dos pacientes com meningoencefalite criptocócica (MC) incluem: hidratação adequada, reposição de eletrólitos de forma preventiva e monitorização de toxicidade renal e medular em decorrência do uso de esquemas contendo anfotericina B (WHO, 2018).

Além das medidas acima expostas, o monitoramento do aumento da pressão intracraniana é um dos pilares do tratamento. A repetição da punção lombar para acessar a pressão, independente da presença de sinais ou sintomas de hipertensão intracraniana (HIC), é uma recomendação importante e que auxilia na diminuição da mortalidade (PETER, 2005). O objetivo é aliviar a hipertensão intracraniana, drenando volume suficiente para que a pressão reduza para níveis menores que 20 cmH₂O ou reduzi-la em 50%, aliviando pressões extremamente altas. Pacientes com persistência ou recorrência de hipertensão intracraniana se beneficiam de punções terapêuticas diárias, que devem ser repetidas até que esteja assintomático e que a pressão de abertura esteja normal por pelo menos dois dias (WILLIAMSON et al., 2017).

Se a pressão intracraniana se mantiver persistentemente elevada após sete a dez dias de punções lombares diárias, considerar a abordagem neurocirúrgica para derivação líquórica (usualmente, derivação lombar externa ou lombo-peritoneal). Manitol, acetazolamida e corticosteroides não devem ser utilizados no manejo de HIC secundária à criptococose (BRASIL, 2018). Punções lombares terapêuticas foram associadas a 69% de melhora em sobrevida relativa, independentemente do nível inicial da pressão (ROLFES et al., 2014). Figura 8 demonstra o fluxograma para manejo de hipertensão intracraniana em meningite criptocócica.

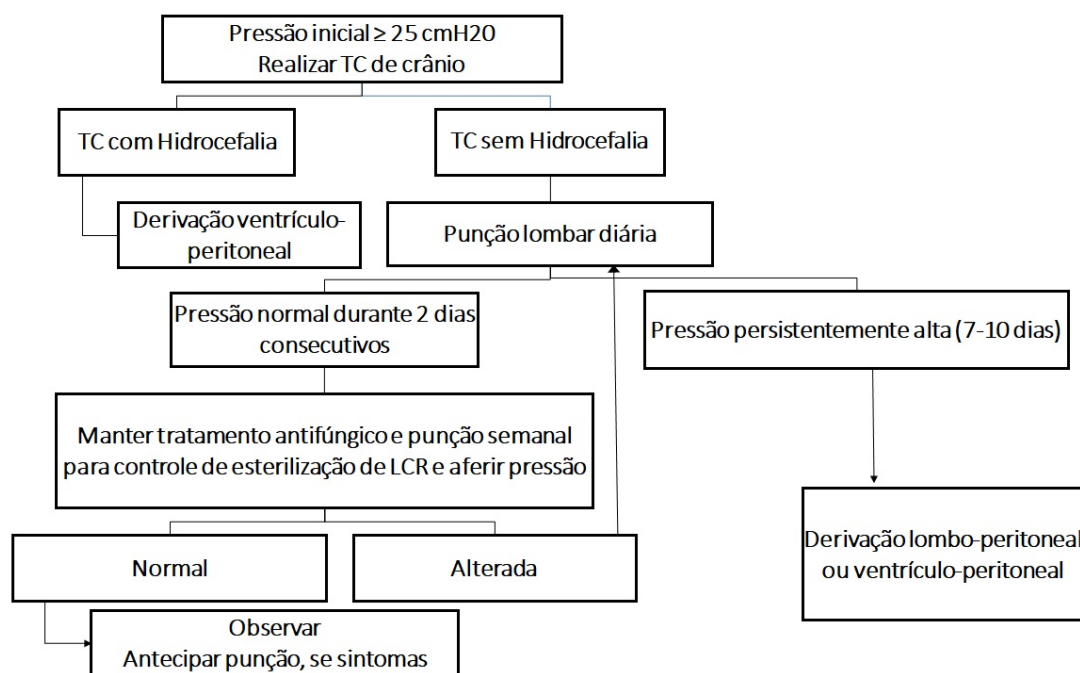


Figura 8 - Fluxograma de manejo de hipertensão intracraniana associada à meningite criptocócica.

Fonte: Adaptado de GRUPO DO CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE (2008)

TC: tomografia computadorizada; LCR: líquido cefalorraquidiano.

O tempo de introdução da TARV após o diagnóstico de meningite criptocócica ainda é um desafio. É necessário balancear o risco da SIRS e o risco de complicações por doenças oportunistas. A recaída de meningite criptocócica após tratamento pode chegar a 15%, mesmo associada à realização adequada das fases de tratamento (PERFECT et al., 2010).

O início imediato de antirretrovirais não é recomendado, pelo aumento do risco de mortalidade e alto risco de síndrome de reconstituição imunológica. A TARV deve ser adiada por pelo menos quatro a seis semanas após iniciada a fase de indução (WHO, 2018). Uma revisão sistemática publicada em 2018 (ESHUN-WILSON et al., 2018) concluiu que o início precoce da TARV pode aumentar a mortalidade por todas as causas, em comparação com o início tardio da mesma (RR=1,42, IC95% 1,02-1,97; 294 participantes, quatro ensaios; baixa evidência de certeza).

Dentro do contexto do rastreamento antigênico para a criptococose em PVHA com LT CD4 $\leq$ 100 e até 200 céls/mL, é recomendado a realização de punção lombar para acessar possível acometimento meníngeo nos casos CrAg positivos. O tratamento preemptivo com FLU deve ser iniciado, caso a bowenencefalite seja

descartada. Esta estratégia tem impacto em mortalidade, conforme demonstrado em recente revisão sistemática (TEMFACK et al., 2019). O esquema proposto é (SLOAN; PARRIS, 2014; WHO, 2018):

- fase de indução com FLU 800 mg por dia por duas semanas;
- fase de consolidação com FLU 400 mg por oito semanas; e
- fase de manutenção, conforme o preconizado na terapêutica habitual.

Em casos com CrAg sérico positivo e com evidência de acometimento do SNC, demonstrado por tinta da China positiva, CrAg ou cultura em líquido positivos, mesmo assintomático, o tratamento deve seguir as orientações recomendadas para meningite criptocócica. Quando evidenciada criptococosemia ou sinais de gravidade como insuficiência respiratória, o tratamento é o mesmo recomendado para SNC.

A profilaxia primária com FLU pode ser utilizada em locais em que o rastreio antigênico não está disponível. Porém não é recomendado pela OMS nem pelo PCDT brasileiro se considerar o custo, o potencial para o desenvolvimento de resistência a antifúngicos e preocupações sobre a segurança fetal entre mulheres em idade fértil, sem acesso a contracepção adequada (BRASIL, 2018; WHO, 2018).

A Figura 9 apresenta as opções de tratamento de meningoencefalite criptocócica, de acordo com as recomendações da OMS (WHO, 2018) e do MS (BRASIL, 2018) e Protocolo para Manejo de Neurocriptococose do HDT.

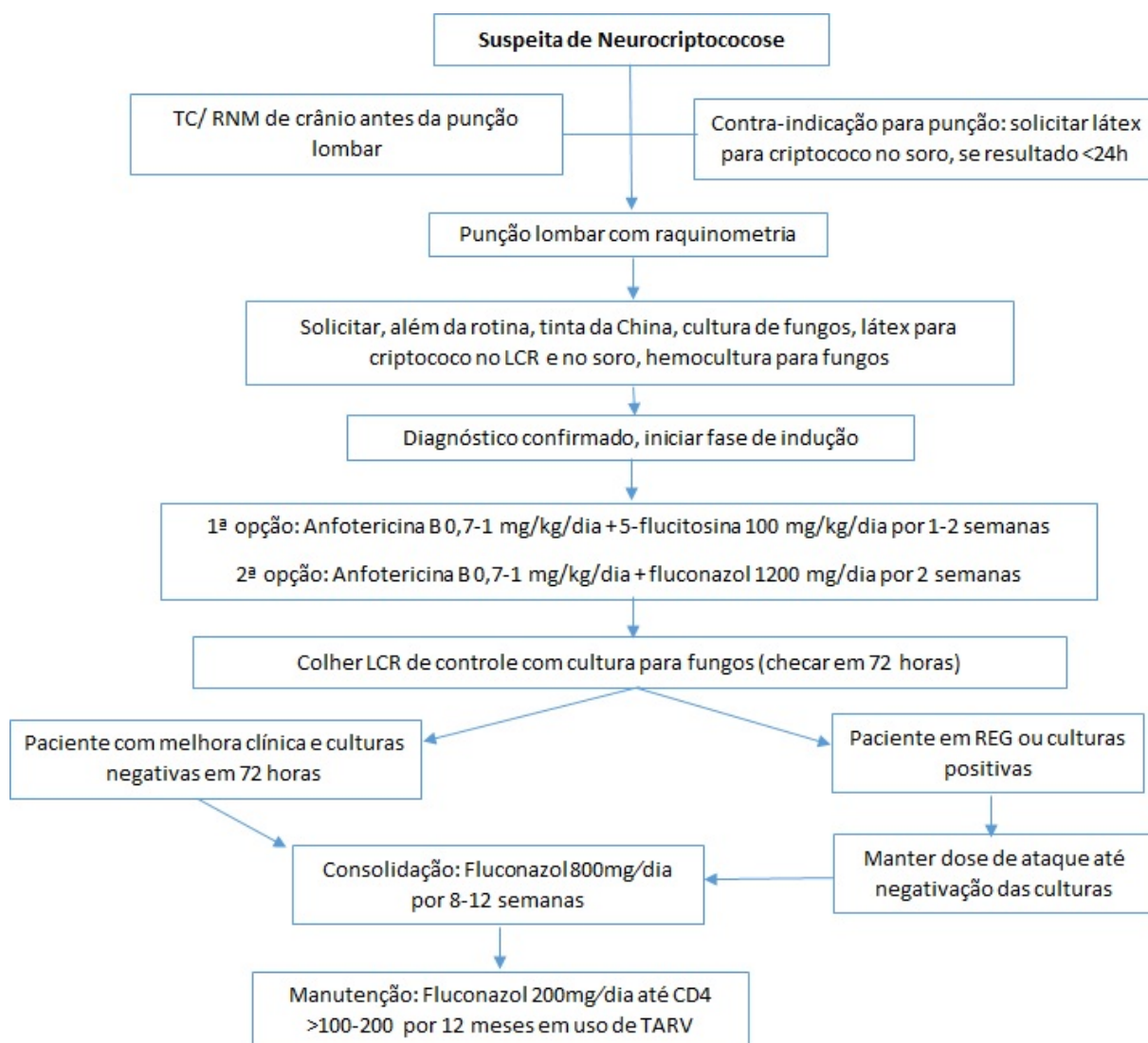


Figura 9 - Fluxograma de atendimento a casos de neurocriptococose

Fonte: Adaptado de Brasil (2018), WHO (2018) e Protocolo para Manejo de Criptococose do Hospital de Doenças Tropicais.

1.7 Meningite Criptocócica no Mundo: Relevância e Mortalidade

A maioria dos casos de meningoencefalite criptocócica ocorre em indivíduos com aids e contagem de CD4 < 100 céls/mL (MITCHELL; PERFECT, 1995). Outras populações, todavia, podem ser acometidas, especialmente as que apresentam comprometimento da imunidade celular por causas não relacionadas ao HIV. Brizendine et al. (2013) avaliaram 302 indivíduos hospitalizados com diagnóstico de criptococose na Universidade do Alabama em Birmingham, de janeiro de 1996 a dezembro de 2010. Dentre os casos: 36% eram HIV positivos, 28% eram transplantados de órgãos sólidos e 36% eram não-HIV e não transplantados, sendo

13% sem fatores de imunodeficiência identificável (BRIZENDINE; BADDLEY; PAPPAS, 2013).

Em 2008, foi estimado que aproximadamente 957.900 casos de criptococose meningoencefálica ocorreriam a cada ano, resultando em mais de 600.000 mortes. As regiões com maior número estimado de casos em 2006 encontravam-se na África Sub-Saariana (720.000 de casos; variando de 144.000 a 1,3 milhão) (PARK et al., 2009).

Em 2017, foi novamente estimado o número de casos anuais e de óbitos por meningite criptocócica, utilizando dados do Programa Conjunto da Organização das Nações Unidas (ONU) sobre HIV/aids (UNAIDS) e de estudos de prevalência de antigenemia criptocócica em 48 países. Em relação à estimativa de 2008, o número absoluto de casos de meningite criptocócica tem diminuído, em consequência provavelmente da disponibilidade de antirretrovirais altamente ativos (RAJASINGHAM et al., 2017). A prevalência global de antigenemia criptocócica em PVHA e LT CD4 < 100 céls/mL seria de 6,0%, totalizando 278.000 pessoas ao ano (IC95% 195.500–340.600). A incidência de meningite criptocócica atingiria 223.100 casos por ano (IC95% 150.600–282.400), resultando em 181.100 (IC95% 119.400–234.300) mortes anuais em 2014. A África Subsaariana continuou a representar a maior carga desta doença. Foi estimado que a meningite criptocócica ainda seja responsável por 15% (IC95% 10–19) das mortes relacionadas à aids em todo o mundo (RAJASINGHAM et al., 2017).

Neste contexto, a criptococose continua a ser a segunda causa mais comum de óbitos relacionados à aids, atrás apenas da tuberculose, em especial em países de baixa e média renda, onde o acesso à TARV é limitada e a prevalência do HIV permanece alta (JARVIS; HARRISON, 2016; RAJASINGHAM et al., 2017).

Segundo dados da UNAIDS, as mortes por causas relacionadas à aids caíram 48% desde 2005, com redução de 42% na África Oriental de 2010 a 2016. A introdução da HAART, a sua maior disponibilidade e acessibilidade, foram fatores importantes para esta redução da mortalidade. Entretanto, apenas 60% das pessoas estão em TARV na África Sub-Saariana (UNAIDS, 2017), onde, conseqüentemente, as taxas de meningite criptocócica e mortalidade por esta doença parecem ter se estabilizado em um nível relativamente alto, variando de 27,0–62,2% (MEYA et al., 2015; TENFORDE et al., 2016).

A América Latina tem a terceira maior taxa de meningite criptocócica associada a HIV/Aids no mundo, com um número estimado de 7.000 (IC95% 3.600-11.100) pessoas com antigenemia positiva, 5.300 (IC95% 2.600-8.900) com meningite criptocócica e 2.400 (IC95% 1.100-4.400) óbitos por criptococose anualmente (RAJASINGHAM et al., 2017).

A mortalidade em indivíduos infectados pelo HIV com meningoencefalite criptocócica varia entre os locais e mantém-se elevada entre países de baixa, média e alta renda, apesar da disponibilidade do tratamento (JARVIS; HARRISON, 2016). Rjasingham et al. (2017) estimaram uma mortalidade de 70% (IC95% 59-81) em países de baixa renda, 40% (IC95% 34-46) em países de média renda e 20 a 30% em países de alta renda..

No Brasil e Argentina, as taxas de mortalidade por neurocriptococose persistem muito altas, entre 30-63% (HORTA et al., 2002; GRUPO DO CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE, 2008; LINDENBERG et al., 2008; BAMBA et al., 2012; AGUIAR et al., 2017). Ramirez et al. (2017) incluíram 340 indivíduos com diagnóstico de neurocriptococose provenientes de múltiplos centros e em seguimento de 1985 a 2014. Verifica-se que eram 58 da Argentina, 138 do Brasil, 28 do Chile, 27 de Honduras, 34 do México e 55 dos EUA. A mortalidade global foi 42%, sendo 66% na era pré-HAART e 38% na era pós-HAART, com uma média de acompanhamento de 0,92 anos. Aqueles diagnosticados com neurocriptococose após o início de TARV tiveram maior risco de morte ($p=0,03$) (RAMÍREZ et al., 2017).

Dados mostram uma tendência de queda da frequência de criptococose em pessoas com aids ao longo da epidemia, no Brasil. Pappalardo e Melhem (PAPPALARDO; MELHEM, 2003) relataram uma prevalência de 6% de criptococose ao diagnóstico de aids de 1980 a 2002. Esses autores divulgaram dados de um serviço público especializado em São Paulo, que mostravam uma tendência de queda da incidência de criptococose até os anos 2001, variando de 7,7% em 1995 para 3,1% em 2001.

Um estudo da Fundação Osvaldo Cruz do Rio de Janeiro, analisou a mortalidade por criptococose e a aids no Brasil, de 2000 a 2012, com base em dados secundários. A taxa de mortalidade por criptococose como causa básica foi de 0,47/milhão de habitantes, enquanto a taxa de mortalidade por criptococose como causa associada foi de 1,94/milhão de habitantes, resultando em uma taxa total de

2,41/milhão de habitantes quando considerados todos os casos citados (SOARES, 2015).

A criptococose é uma doença endêmica na Região Centro-Oeste e em Goiás, sendo o Hospital Estadual de Doenças Tropicais “Dr. Anuar Auad” o centro de referência que assiste a quase 60% das PVHA no estado. Segundo dados fornecidos pelo serviço de vigilância epidemiológica do HDT, de 2008 a 2017 foram notificados 5.394 casos de aids com diagnóstico no serviço em questão, sendo que 3.073 tinham como critério contagem de LT CD4 < 350 céls/mL. No mesmo período, houve 163 casos de aids com diagnóstico de criptococose extrapulmonar ao momento da notificação (Sistema de Informações de Agravos de Notificação – Sinan) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

Em uma dissertação de mestrado (BASTOS, 2017), foram avaliados 130 casos de criptococose atendidos no Hospital de Doenças Tropicais, de 2011 a 2014. Foi verificado predomínio do sexo masculino; 89,2% eram HIV positivos, sendo o uso crônico de medicamentos imunossupressores relacionado como fator de risco em 64,3% dos soronegativos. A média da contagem de células LT CD4 em indivíduos HIV positivos foi de 58,7 céls/mL, com taxa de mortalidade global de 60,8%, sendo 47,7% com criptococose como causa básica ou associada de morte.

Nunes et al. avaliaram casos de criptococose no estado de Mato Grosso do Sul, também na Região Centro-Oeste, sendo descritos 129 casos de meningoencefalite criptocócica de 1997 a 2014. A média de idade foi de 37 anos, 76,7% eram homens, soropositivos para HIV em 87,5% (NUNES et al., 2018).

Estudos de susceptibilidade antifúngica realizados no Brasil não evidenciaram diferença de concentração inibitória mínima entre isolados ambientais e clínicos, nem resistência à anfotericina B, FLU, flucitosina (5FC) e itraconazol (SOUZA et al., 2005; MORALES, 2009; FIGUEIREDO et al., 2016; AGUIAR et al., 2017).

1.8 Magnitude da Antigenemia Criptocócica no Mundo e no Brasil

Estimativas de prevalência de antigenemia criptocócica variam de 0,2% a 22,5%, dependendo da área geográfica e das características clínicas da população estudada (FORD et al., 2018).

Uma revisão sistemática que objetivou avaliar a prevalência de antigenemia criptocócica em PVHA em diferentes níveis de LT CD4, incluiu 60 estudos observacionais, sendo 40 estudos prospectivos e 20 retrospectivos, contabilizando

mais de 25.000 indivíduos. Nesta revisão, foram analisados dados provenientes de 28 países, de todos os continentes, sendo a maior parte da África. A maioria utilizou soro como amostra sanguínea e LFA como técnica. A prevalência de CrAg foi de 6,4% (IC 95% 5,7-7,2%; 55 estudos) entre pessoas com LT CD4 $\leq$ 100 céls/mL e 2,0% (IC95% 1,2–2,7%; 21 estudos) entre pessoas com LT CD4 de 101 a 200 céls/mL (FORD et al., 2018).

A prevalência de CrAg positivo dentre aqueles com contagem de células CD4 $\leq$ 100 céls/mL, foi maior entre indivíduos hospitalizados (9,8%, IC95% 4,0–15,5%) do que entre os atendidos ambulatorialmente (6,3%, IC95% 5,3–7,4%) (FORD et al., 2018). Nessa revisão sistemática, foram incluídos dois estudos brasileiros, sendo a prevalência de CrAg de 3,1% em São Paulo (VIDAL et al., 2016) e 13,9% no Mato Grosso do Sul (NEGRI et al., 2017).

Outra revisão sistemática com metanálise (TEMFACK et al., 2019) avaliou o impacto da rotina de rastreamento de CrAg e terapia preemptiva com FLU em portadores de HIV virgens de tratamento antirretroviral e CD4 $\leq$ 100 céls/mL. Nesta revisão, foram incluídos 31 estudos, de 22 países, 67,7% da África Sub-Saariana, sendo 22 coortes, 3 estudos randomizados e 6 transversais, totalizando 35.644 pacientes. Estudos brasileiros não foram incluídos. A prevalência acumulada de CrAg foi de 6% (IC95% 5-7), sendo 2% em indivíduos com CD4 $>$ 100 céls/ μ L. A prevalência de acometimento meníngeo assintomático foi de 33% dentre os CrAg positivos (IC95% 21-45) (TEMFACK et al., 2019).

Entre os estudos de coorte, a incidência de meningite criptocócica foi de 0,4% entre CrAg negativos, 21,4% entre os positivos que não realizaram terapia preemptiva com FLU e de 5,7% dentre os que a utilizaram (dose 800 mg/dia). A realização de punção lombar nos casos com antigenemia positiva antes de iniciar a terapia preemptiva praticamente eliminou a incidência posterior de neurocriptococose. O uso de FLU preemptivo na presença de antigenemia positiva alterou as taxas de mortalidade. A taxa de mortalidade foi de 13,9% entre CrAg negativos, 17,4% em CrAg positivos com uso de pelo menos 800mg de FLU e 39,7% em CrAg positivos sem uso de terapia preemptiva. O risco de morrer foi 2,2 vezes maior entre os CrAg positivos que não receberam terapia preemptiva se comparado aos que receberam (RR=2,2, IC95%: 1.7-2.9) (TEMFACK et al., 2019).

Poucos estudos foram identificados, até o presente, sobre a prevalência de antigenemia criptocócica em pessoas com aids, na América Latina, incluindo o Brasil.

Durante elaboração desta dissertação, realizamos uma revisão não sistemática da literatura, nas bases de dados Medline e Scielo, utilizando os descritores: “criptococose” e/ou “CrAg” e/ou “prevalência” e/ou “HIV”, com o intuito de localizar estudos sobre prevalência de CrAg na América Latina e no Brasil, pôsteres apresentados em anais de Congressos e dissertações de mestrado. Os dados são apresentados na Tabela 2.

No Peru, a prevalência foi 3,6% (BARANDIARAN; PAZ; BUSTAMANTE, 2012), na Argentina foi 8,1% (FROLA et al., 2017) e, em alguns estados do Brasil, também foram identificadas prevalências de antigenemia criptocócica (Tabela 2). Todavia, todos evidenciam uma prevalência acima do ponto de corte considerado em literatura como uma estratégia custo-efetiva.

Tabela 2 - Estudos de prevalência de antigenemia criptocócica em pessoas infectadas pelo HIV, na América Latina e no Brasil

Autores e ano de publicação	Local e data do estudo	Teste Antigênico utilizado	População	Uso de TARV Adesão à TARV	Presença de sintomas de criptococose	Homens	Idade (ano) média (± DP)	Nível de CD4 (cél/s/mL) % por faixa	Prevalência global de CrAg positivos e em subgrupos
Negroni <i>et al.</i> , 1995	Argentina	Látex	193		Assintomáticos			< 300	6,7% CrAg isolado: 5,2%
Linares Barandiaran <i>et al.</i> , 2012 (Poster ICCCC)	Lima, Peru 2011-2012	Látex	365	Virgens		77%	36,5 (±10,7)	≤ 100	3,6 % (1,7- 5,5) CrAg isolado: 2,7%
Costa <i>et al.</i> 2013	Brasil, Belém, PA 2009 a 2012	Látex	418	Experimentados 100%	Assintomáticos	27%		≤ 200: 14,3% > 200: 85,6%	2,6% ≤ 200: 8,3% > 200: 1,7%
Vidal <i>et al</i> 2016	Brasil, São Paulo, SP 2014 a 2015	LFA	219	Virgens 26% Experimentados 74% (com uso irregular)	Assintomáticos (163) Com sintomas de meningite (56)	61%	38,4 (±10)	≤ 100: 79% 101-200: 21%	<100: 3,1% 100-200: 2,9% < 200 CrAg isolado: 3,1% (1-7) <200 c/ ou s/ sintomas: 11,4%
Machado <i>et al.</i> , 2015 (Dissertação)	Brasil, Piauí 2015	LFA	109	Virgens 32,5% Experimentados: 77,5% Uso Irregular: 49,5%	Com e sem sintomas	67%	35	< 100: 3,6% 100-200: 58,7% > 200: 37,7%	8,2%
Ferreira, 2016 (Dissertação)	Brasil, Rio de Janeiro, RJ	LFA	89	Maioria experimentados Sem TARV no momento: 85,3%	Com e sem sintomas	69%	30,3 (±9,9)	≤ 100: 65% > 100: 35%	11,23% CrAg isolado: 4,81%
FROLA <i>et al.</i> , 2017	Buenos Aires 2014-2015		123	Sem TARV regular	Com e sem sintomas	64,2% Positivos 50%	38 (±9,7)	≤ 100	8,1% (3,3-13) CrAg isolado: 3,25%
Negri <i>et al.</i> , 2017 (Poster ICCCC)	Brasil, Mato Grosso do Sul	LFA Latex	188		Com e sem sintomas		41,5 (±11,3)	< 200	LFA 13,9% Latex 11,3%

CD4: contagem de linfócitos T CD4; CrAg: Antígeno Criptocócico; DP: desvio padrão; CrAg isolado: antigenemia positiva, sem meningite criptocócica diagnosticada; ICCCC: *International Congress of Cryptococcus and Cryptococcosis*; Látex: técnica de aglutinação em látex; LFA: técnica de Ensaio de Fluxo Lateral (*Lateral Flow Assay*); TARV: terapia antirretroviral.

1.9 Impacto econômico da triagem com os testes antigênicos criptocócicos

Avaliações econômicas em saúde indicam que, em áreas endêmicas de criptococose e de infecção por HIV, a triagem sérica com CrAg e a profilaxia primária são duas estratégias adequadas para prevenir a criptococose associada à Aids em indivíduos com contagem de $CD4 \leq 100$ céls/mL. A triagem se mostrou mais econômica mesmo em locais com estimativa de prevalência baixa, porém, menos eficaz do que a profilaxia, especialmente em níveis de $CD4 < 50$ céls/mL (KAPLAN et al., 2015). Estudo conduzido em Uganda (MEYA et al., 2010), com a participação de 295 indivíduos, o número necessário para testar (NNT) com o CrAg e tratar com FLU (estratégia testar e tratar) para salvar uma vida foi de 11,3 pessoas (IC95% 7,9–17,1), com custo de \$190 (IC95% \$132–\$287). Em contrapartida, utilizando-se a estratégia de profilaxia primária, o número necessário para evitar um óbito foi de 15,9 pessoas (IC95% 11,1–24,0) com custo de \$266 (IC95% \$185–\$402).

No Camboja, a população do estudo foi composta por portadores de HIV, sendo que 81% tinham contagem de $CD4 \leq 50$ céls/mL e 19% entre 51 a 100 céls/mL. A proporção de indivíduos vivos, em um ano após a inclusão, foi de 61% sem intervenção (custo \$472), 70% com rastreamento com CrAg (custo \$483) e 72% com profilaxia com FLU (custo \$492). Para salvar uma vida, seriam necessárias 10,8 pessoas na estratégia testar e tratar e 8,9 pessoas utilizando-se profilaxia primária (MICOL et al., 2010). Após um ano de acompanhamento, a relação custo-efetividade do rastreamento versus nenhuma intervenção foi de \$ 180/anos de vida ganho e da profilaxia versus rastreamento foi de \$511/anos de vida ganho. Se a proporção de indivíduos com contagem de $CD4 \leq 50$ céls/mL diminuísse em 75%, a custo-efetividade da profilaxia vs. rastreamento seria estimada em \$1.538/anos de vida ganho (MICOL et al., 2010).

Em Malawi, pacientes provenientes de uma clínica para HIV/aids realizaram triagem com CrAg conjuntamente à contagem de $CD4$. Foi instituído tratamento preemptivo com FLU para os casos positivos. O custo da triagem antigênica (\$72,5), em uma população cuja prevalência encontrada foi de 3,5%, foi menor que o tratamento de um caso de meningite criptocócica (\$734) (CHIPUNGU et al., 2015).

Na República Unida da Tanzânia e Zâmbia foram randomizados 1.999 adultos portadores de HIV e virgens de TARV, com uma contagem de células $CD4 < 200$ céls/mL. Um grupo recebeu rastreamento de antígenos criptocócicos e tratamento

antifúngico preemptivo em casos positivos. O outro grupo recebeu tratamento padrão. Foi encontrada uma redução de 28% na mortalidade (13% *versus* 18%) entre as pessoas que receberam a intervenção, em comparação com o tratamento padrão (MFINANGA et al., 2015). Em uma subanálise posterior, foi demonstrado declínio estatisticamente significativo da mortalidade entre os indivíduos com contagem de LT CD4 <100 céls/mL (taxa de mortalidade=0,75, IC95% 0,58–0,95) e aquelas com contagem de LT CD4 de 100-200 céls/mL (taxa de mortalidade=0,56, IC95% 0,32–0,97) (FORD et al., 2018; WHO, 2018).

Jarvis et al. (2013), utilizando um modelo matemático e dados de uma coorte de Cape Town, África do Sul, demonstraram que a triagem com CrAg seguida por uso de FLU em altas doses em casos positivos foi a estratégia com menor custo. Testar e tratar foi considerada a estratégia padrão de cuidado em locais onde a prevalências foi maior ou igual a 0,6%. Portanto, até mesmo em populações com prevalência tão baixa quanto 0,6%, a estratégia de rastreamento com pesquisa de CrAg sérico se mostrou custo-efetiva. Neste estudo, a realização de punção lombar em todos os CrAg positivos e o tratamento com anfotericina B naqueles com acometimento do SNC foi a estratégia mais efetiva clinicamente, com pequeno aumento em custo (\$158 vs. \$51/pessoa-ano) e grande ganho na relação custo-efetividade (\$889.267/anos de vida ganhos). Mais uma vez, a profilaxia primária foi verificada como mais efetiva que a terapia padrão, porém, custo-inefetiva (\$ 20.495/anos de vida ganhos).

Um estudo brasileiro recente avaliou 219 indivíduos HIV positivos de novembro de 2014 a outubro de 2015, com LT < 200 céls/mL. A prevalência de CrAg foi 11,4% dentre sintomáticos e assintomáticos e de 3,1% em assintomáticos. A única análise de custo efetividade realizada no Brasil revelou que o custo do rastreamento de antígenos criptocócicos por vida salva foi de US\$ 326 (IC95% \$ 91–2.685). O NNT para detectar um caso CrAg positivo foi de 8,8 (IC95% 7,5-16,4). Se todos os pacientes hospitalizados com LT CD4 <200 céls/mL fossem rastreados, o custo por caso detectado seria de US\$ 35 (IC95% US\$24 a US\$53) (VIDAL et al., 2016).

Conforme atualmente recomendado pela OMS e pelo MS, a incorporação da estratégia de rastreamento com CrAg na rotina de atendimento a PVHA é custo efetiva e pode ser justificada se identificada uma alta prevalência de criptococose (BRASIL, 2018; WHO, 2018). Neste contexto, considerando-se a alta morbimortalidade da criptococose e a necessidade de diagnóstico e de tratamento precoces, o conhecimento da prevalência de antigenemia criptocócica em nosso meio torna-se relevante.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estimar a prevalência da positividade do CrAg no soro de indivíduos vivendo com HIV e CD4 menor que 200 céls/mL, em Goiás.

2.2 Objetivos Secundários

- Identificar fatores sócio demográficos potencialmente associados com a antigenemia criptocócica positiva;
- Identificar aspectos clínicos e laboratoriais potencialmente associados com a presença de antigenemia criptocócica positiva
- Avaliar a presença de meningite criptocócica dentre os pacientes com antigenemia positiva

3 METODOLOGIA

Este estudo integra um projeto maior intitulado CRAG Brasil, coordenado pela Rede Criptococose Brasil. Foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Estadual de Doenças Tropicais “Dr. Anuar Auad” (HDT), em 4 de maio de 2015, sob o nº 1.016.288 (CAAE: 42429715.5.1001.0034). Foi aprovado para financiamento por meio do Edital Programa Primeiros Projetos (PPP), Chamada Pública 3/2015, da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG), controle digital nº 17809.

3.1 Delineamento do Estudo:

Trata-se de um estudo transversal.

3.2 Local de Estudo

Estudo conduzido no HDT, unidade da Secretaria de Estado da Saúde de Goiás, em Goiânia. O HDT é referência terciária para doenças infecciosas e dermatológicas no estado de Goiás, a qual presta atendimento eletivo e de emergência de média e alta complexidade. Esta unidade é responsável pelo atendimento especializado da maior parte das pessoas vivendo com HIV no estado de Goiás.

3.3 População de Estudo

A população de estudo foi composta por indivíduos adultos, HIV positivos, de ambos os sexos e que concordaram em participar, assinando um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice 1).

a) Critérios de inclusão

- Pessoas com diagnóstico confirmado de infecção pelo HIV, segundo o algoritmo do MS (BRASIL, 2016);
- Idade maior ou igual a 18 anos;
- Contagem de CD4 < 200 céls/mL; em última coleta realizada há menos de seis meses da data de inclusão;
- Pessoas internadas ou em acompanhamento ambulatorial, independentemente de manifestações clínicas;

- Em uso ou não de TARV.

b) Critérios de exclusão: história prévia de doença criptocócica

- Idade menor que 18 anos
- Contagem de LT CD4 $\geq$ 200 células/mL

3.4 Parâmetros para Cálculo do Tamanho Amostral

Estudos conduzidos no Brasil, em indivíduos na fase avançada da infecção pelo HIV, assintomáticos ou não, mostram prevalências de antigenemia criptocócica variando de 2,6 (COSTA et al., 2013) a 11,4% (VIDAL et al., 2016). No presente estudo, para realizar o cálculo do tamanho amostral consideramos uma prevalência de 10% de antigenemia criptocócica, na população a ser estudada, com precisão de 4% e nível de confiança de 95%, resultando em uma amostra de 208 pacientes.

3.5 Recrutamento dos Participantes e Coleta de Dados

Em junho de 2015, iniciou-se o recrutamento de sujeitos, por meio de amostra de conveniência, em ambulatórios, setores de emergência e internação do Hospital Estadual de Doenças Tropicais, conforme critérios de inclusão e exclusão.

O Laboratório Central de Saúde Pública Dr. Giovanni Cysneiros (Lacen-GO) forneceu, a partir de dezembro de 2015 até julho de 2018, uma lista dos pacientes com CD4 < 200 células/mL provenientes do serviço em questão, de forma confidencial. Após avaliação de prontuário eletrônico, para exclusão de doença criptocócica prévia e óbito, foi realizado contato telefônico, com verificação de disponibilidade para o comparecimento em consulta médica para a entrevista. Quando não havia dados telefônicos, ou não foi estabelecido contato ou o indivíduo se recusou a comparecer à consulta, o mesmo foi excluído da lista de convocação. Pacientes internados em unidades de emergência, enfermaria ou UTI, que preencheram critérios de inclusão, foram submetidos à entrevista pelo pesquisador ou pelo médico assistente.

3.5.1 Entrevista Estruturada

Durante a consulta agendada, foi explicado ao paciente ou responsável legal que o objetivo principal da convocação era informar sobre a contagem baixa de linfócitos CD4 e o risco de desenvolvimento de doenças oportunistas, dentre elas a criptococose. Os pacientes foram informados sobre os objetivos do estudo em

questão e sobre o teste diagnóstico a ser realizado por meio de punção venosa. Caso o exame antigênico resultasse positivo, seria necessária a realização de uma punção lombar para a investigação de acometimento em SNC. OS riscos de cada procedimento foram esclarecidos.

Foi informado ao entrevistado que o aceite ou a recusa não interfeririam em seu acompanhamento regular no serviço. Após o consentimento, foi coletada a assinatura do TCLE. Seguiu-se então a entrevista estruturada, com coleta de dados sócio-demográficos, clínicos e laboratoriais, conforme ficha elaborada pela Rede Criptococose Brasil e adaptada pelo pesquisador (Apêndice 2).

Foi realizada revisão de prontuário, para complementar as informações avaliadas pela ficha de coleta de dados e excluir criptococose prévia. O histórico de dispensação foi acessado eletronicamente via Sistema de Controle Logístico de Medicamentos (SICLOM), com intuito de acessar a regularidade do uso da TARV nos últimos 100 dias. O histórico de contagem de LT CD4 e carga viral foi acessado via Sistema de Controle de Exames Laboratoriais da Rede Nacional de Contagem de Linfócitos CD4+/CD8+ e Carga Viral do HIV (SISCEL).

Os participantes foram posteriormente encaminhados ao laboratório interno do Hospital, para punção venosa e realização dos exames laboratoriais.

3.5.2 Exames Laboratoriais

Os exames solicitados a todos os indivíduos, pelo pesquisador ou médico assistente, conforme estabelecido no projeto eram:

- 1) Hemograma completo, ureia, creatinina, sódio, potássio, proteinograma;
- 2) Hemocultura para fungos (processada pelo Lacen-GO);
- 3) Detecção de antigenemia criptocócica em soro pela técnica LFA;
- 4) Análise de LCR (em casos CrAg sérico positivos) - bioquímica, celularidade com diferencial, bacterioscopia ao gram, exame direto com tinta da china, cultura para bactérias e cultivo em meios específicos para fungos (sem cicloheximida);
- 5) Detecção de CrAg pela técnica LFA em LCR.

3.5.3 Condutas frente aos resultados do CrAg

Em caso de teste CrAg LFA positivo em soro, o médico assistente, o paciente ou seu representante legal foram informados sobre o resultado e sobre a necessidade de se realizar a punção lombar para a coleta de amostra líquórica. Quando disponível o raquimanômetro, foi aferida a pressão intracraniana em cmH₂O.

Nos casos em que fosse detectado CrAg positivo em LCR, foi realizado encaminhamento para tratamento em regime de internação. Quando descartado o acometimento em SNC, o paciente com antigenemia sérica isoladamente positiva recebeu o tratamento preemptivo com FLU, conforme os protocolos vigentes (WHO, 2011; SLOAN; PARRIS, 2014).

A Figura 10 sumariza as etapas de seleção e coleta de exames dos participantes e a Figura 9 esquematizou a proposta de manejo clínico dos pacientes.

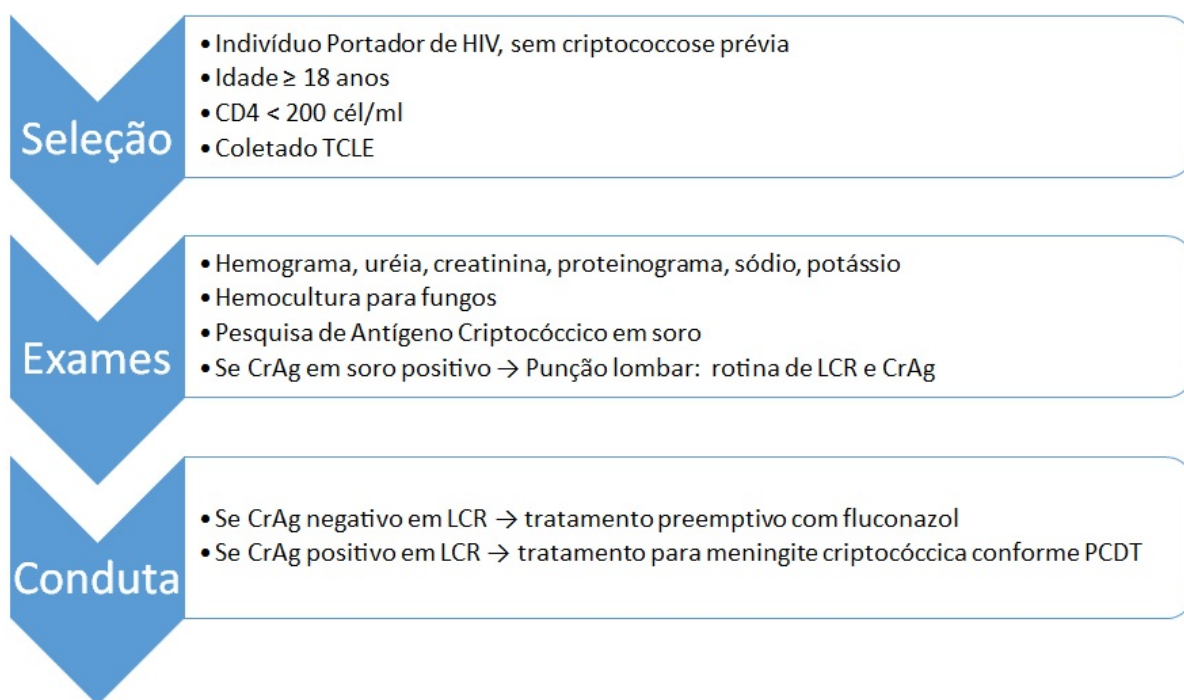


Figura 10 - Etapas realizadas para coleta de dados e condutas frente aos resultados

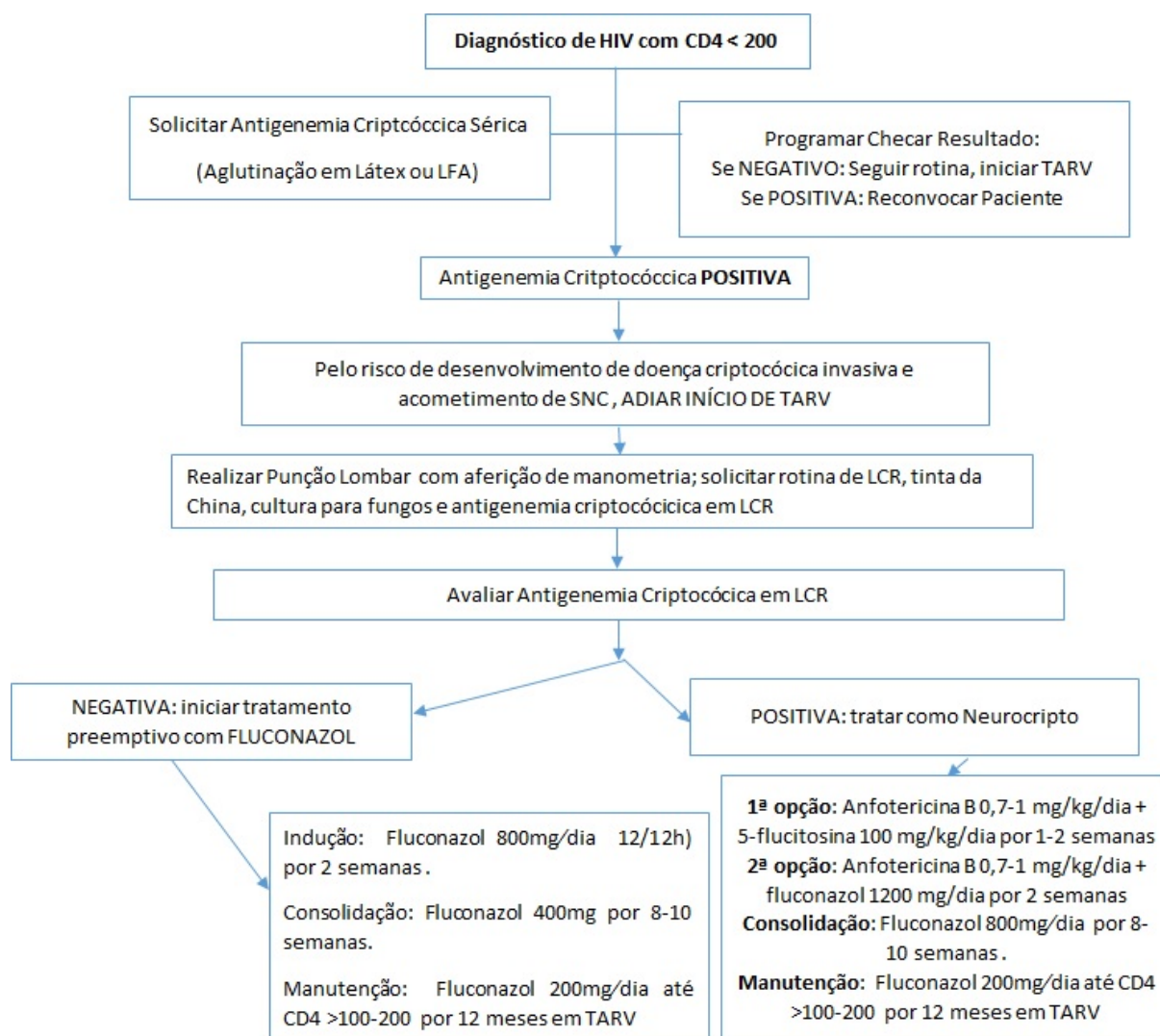


Figura 11 - Fluxograma de rastreamento utilizando antígeno criptocócico (CrAg) e terapêuticas preconizadas. Proposta sugerida para a implantação no Hospital de Doenças Tropicais.

Fonte: Adaptado de Brasil (2018) e WHO (2018).

3.6 Processamento e Análise de Dados

Os dados coletados, contendo variáveis categóricas e contínuas foram inseridos em planilhas do Microsoft Office® Excel® e analisadas utilizando o programa *Statistical Package for the Social Sciences*, versão 23.0 (SPSS® IBM Corporation, Armonk, NY, USA). Foi mantida a confidencialidade sobre os dados e identidade dos participantes.

Inicialmente foi realizada análise descritiva e exploratória de dados. Para variáveis contínuas tais como idade, tempo de diagnóstico de HIV e tempo de

tratamento antirretroviral, foram calculadas medidas de tendência central (média e mediana) e de dispersão (desvio-padrão). Variáveis categóricas, tais como sexo, presença ou ausência de sintomas clínicos, antecedentes de uso de TARV, etc. foram expressas em percentuais.

O uso regular de TARV foi considerado presente quando relatado pelo paciente, em associação à dispensação de medicação nos últimos 90 dias, de acordo com o registro de dados do SICLOM. Em caso de discordância, foi considerado a informação obtida via SICLOM. O histórico de abandono de TARV em algum momento do seguimento também foi investigado e definido quando houve ausência de retirada de medicação por mais de 100 dias, conforme preconizado pela Assistência Farmacêutica do MS.

Considerou-se como diagnóstico recente de infecção pelo HIV aquela diagnosticada a menos de 12 meses da data da entrevista. O tempo de diagnóstico de HIV foi categorizado em até 12 meses e maior que 12 meses. Resultados de exames laboratoriais tais como dosagem de hematócrito, hemoglobina, ureia, creatinina, sódio, potássio, proteínas totais, albumina, e globulinas séricas foram expressos como normais ou alterados, considerando os pontos de corte de normalidade. Valores de hemoglobina $\geq 12\text{mg/dL}$, hematócrito $\geq 35\%$, leucograma ≥ 3.500 céls/L, plaquetas ≥ 150.000 e albumina $\geq 3,5$ mg/dL, foram considerados como normais, independentemente do sexo e idade.

Valores de LT CD4 e de CV do HIV foram expressos como variáveis contínuas e como variáveis categóricas. Indivíduos com carga viral menor do que o limite de detecção (40 cópias/mL) foram contabilizados com valor de zero e aqueles com níveis maiores que o limite de detecção foram contabilizados como 10.000.000 cópias/mL. Valores de CV foram agrupados em duas categorias: altos quando a CV era superior a 100.000 cópias/mL e CV baixa a moderada, para valores de até 100.000 cópias/mL. Valores de CD4 foram categorizados em dois estratos: ≤ 100 e 101-199 céls/mL.

Resultados da pesquisa de CrAg foram apresentados de forma categórica (positivo ou negativo) e expressos em percentuais, com os respectivos IC95%. Para os casos com CrAg positivo no soro foram descritos os resultados do LCR (número de leucócitos e hemácias, valores de glicose e proteína, a pressão intracraniana, pesquisa de CrAg, exame direto e cultura para *Cryptococcus spp.*). Também foram descritos o tratamento realizado (anfotericina B, FLU, itraconazol) e a adesão às fases de indução, consolidação e manutenção.

Foi realizada análise univariada para investigar fatores sócio-demográficos, clínicos e laboratoriais potencialmente associados com a positividade do CrAg no soro. Foram utilizados Teste do Qui-quadrado ou Teste Exato de Fisher, quando pertinente, para comparação de variáveis categóricas e Teste T para variáveis contínuas. Todos os testes foram bicaudais, com nível de significância estabelecido em 5%. Caso detectadas correlações com $p < 0,1$, seria indicada análise multivariada.

4 RESULTADOS

4.1 Artigo 1 – Prevalence of cryptococcal antigenemia among patients with AIDS in Midwest Brazil using a lateral flow assay

Revista: Manuscrito a ser submetido para publicação no periódico PLoS ONE.

Title: Prevalence of cryptococcal antigenemia among patients with AIDS in Midwest Brazil using a lateral flow assay

Short title: Prevalence of cryptococcal antigenemia in AIDS patients at Midwest Brazil

Authors:

Moara Alves Santa Barbara Borges^{1,2}, João Alves de Araújo Filho^{1,3,4}, Bruno de Jesus Silva Oliveira³, Isabela Silvério Moreira³, Vanessa Valadares De Paula³, Angélica Lima de Bastos⁵, Renata de Bastos Ascenço Soares^{3,4}, Marília Dalva Turchi^{1,4}.

Affiliations: ¹Institute of Tropical Pathology and Public Health of Federal University of Goiás – Goiânia, Goiás, Brazil. ²Infectious Disease Unit, Clinical Hospital of Federal University of Goiás – Goiânia, Goiás, Brazil. ³Pontifical Catholic University of Goiás – Goiânia, Goiás, Brazil. ⁴Tropical Diseases State Hospital “Dr. Anuar Auad” – Goiânia, Goiás, Brazil. ⁵State Laboratory of Public Health Dr. Giovanni Cysneiros – Goiânia, Goiás, Brazil

Corresponding author: Moara Alves Santa Barbara Borges, Institute of Tropical Pathology and Public Health of Federal University of Goiás; Rua 235, s/nº, Setor Universitário, Goiânia, Goiás, Brazil. E-mail: moarasb@gmail.com.

Abstract

Background: Cryptococcosis is caused by *Cryptococcus* species complex (*Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*) and targets immunocompromised individuals, including those with AIDS. Cryptococcal antigen (CrAg) detection in the HIV population with CD4 counts <100-200 cells/mL has been recommended by the World Health Organization since 2011 in areas with CrAg prevalence >3%. These data are scarce in Brazil. We aimed to estimate the prevalence of CrAg positivity in midwest Brazil. **Methods:** Cross-sectional study with a prospective component conducted at an infectious diseases hospital from 2015 to 2018. Adults infected with HIV with CD4 <200 cells/mL, without previous cryptococcal disease, were enrolled. Serum CrAg tests were performed by lateral flow assay. We calculated the prevalence of CrAg positivity with 95% confidence intervals (CI). **Results:** Of the 214 individuals recruited, 72% were men ranging in age from 18 to 78 years (median, 40 years). HIV diagnosis was recent in 47% (≤ 12 months) and 88.8% (n=190) were antiretroviral experienced, of which 51.4% (n=110) were taking this regularly in the previous 3 months. Viral load was undetectable in 25/214. CD4 values ranged from 1 to 199 cells/mL (median, 47 cells/mL). The overall prevalence of CrAg was 7.9% (95%CI 4.7-12.4); 7.5% (12/159) in those with CD4 ≤ 100 cells/mL and 9.1% (5/55) in those with CD4 101 to 199 cells/mL. Only 1/17 CrAg-positive individual had documented cryptococcal meningitis, with no other case during follow-up. There were no statistically significant differences between sociodemographic, clinical or laboratory characteristics to predict CrAg positivity ($p > 0.05$). **Conclusions:** The prevalence of cryptococcal antigenemia in an HIV population with CD4 <200 cells/mL from Midwest Brazil is high, above the cut-off point for the cost-effectiveness of CrAg screening. No clinical or laboratory factors

could predict positivity, corroborating the need for universal screening for CrAg in severely immunosuppressed individuals infected with HIV in similar regions.

Introduction

Cryptococcosis is a serious opportunistic fungal infection caused by *Cryptococcus* species complex: *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* [1, 2]. It mainly affects people with impaired cellular immunity, such as those with HIV and a CD4 count <100 cells/ μ L, haematological malignancies, solid-organ transplant recipients, chronic corticosteroid users, those who have received another type of immunosuppressive therapy [3]. After the burden of AIDS, the incidence of cryptococcosis increased dramatically worldwide. HIV infection was associated with >80% of cases of cryptococcosis [4], reaching 95% in a Brazilian retrospective study [5].

In individuals with AIDS, cryptococcaemia, meningoencephalic presentation, high intracranial pressure and high antigenic titres are frequent and are associated with a poor prognosis and mortality [6, 7]. Cryptococcal meningoencephalitis accounts for 70% to 90% of cases of cryptococcal disease in patients with HIV; it is a life-threatening infection and the second leading cause of death in this population [8, 9]. Highly active antiretroviral treatment (HAART) has been associated with a reduction in the incidence of cryptococcosis, mainly in developed countries [10]. However, the incidence rates are still extremely high in some low- and middle-income countries [11–13]. Despite the widespread availability of antiretroviral treatment (ART), patients still present late for care, have low adherence and a significant proportion do not achieve a sustained undetectable viral load, remaining without immune recovery [13, 14]. In Brazil in 2017, around 860,000 (630,000-1,100,000) people were living with HIV, 84%

of whom were aware of their status; 64% received ART and 59% had an undetectable viral load [15].

Latin America has the third highest rate of HIV/AIDS-related cryptococcal meningitis in the world, with an estimated 7,000 (3,600-11,100) people with positive antigenemia, 5,300 (2,600-8,900) with cryptococcal meningitis and 2,400 (1,100-4,400) deaths annually [8]. A mortality rate around 70% has been estimated in low-income countries, 40% in middle-income countries and 20%-30% in high-income countries such as the United States and Europe [8]. In Latin America, the lethality of meningeal cryptococcosis has been reported to range from 13% to 73% [11]. The mortality rate of cryptococcosis as the primary cause of death in Brazil was found to be 0.47/million inhabitants [16]. Fatality in the HIV population reaches 30% to 62% in this country [17–19].

Since 2011, the World Health Organization (WHO) has recommended screening for *Cryptococcus* antigen (CrAg) in people living with HIV/AIDS (PLHAs) with a CD4 count <100 cells/mL. Screening may be also considered at a higher CD4 cell count threshold of 200 cells/mL [20, 21]. The presence of CrAg in a blood sample can be identified at least 22 days to >100 days before the presentation of neurological symptoms [9, 22]. It is an independent predictor of mortality in the first 12 weeks of ART and of the development of cryptococcosis in the first year of ART [23, 24].

CrAg screening was initially recommended for regions with a prevalence of cryptococcosis $\geq 3\%$, allowing early identification of cryptococcal disease, even at a subclinical stage [9, 21]. The lateral flow assay (LFA) (Immuno-Mycologics Inc®, Norman, OK, USA) was validated within the scope of this screening strategy, favouring its application in clinical practice [20, 25–33]. The CrAg LFA has some advantages: quick results (<10 minutes), little training required for use and interpretation, minimal

laboratory infrastructure required and no need for refrigerated storage [34]. It is cost-effective in several scenarios [28], including sites with a prevalence as low as 0.6% [35], much lower than the cut-off point suggested initially.

Since 2017, the Brazilian Guideline for Adult HIV Care [36] recommends CrAg screening in people living with HIV with advanced immunosuppression and from areas with a high prevalence of cryptococcal antigenemia. To date, there are few data on the prevalence of this disease in Brazil [37–39]. Therefore, this study aimed to estimate the prevalence of cryptococcal antigenemia and to evaluate the sociodemographic factors, and clinical and laboratory aspects potentially associated with CrAg positivity in PLHAs with CD4 <200 cells/mL in the Midwest Region of Brazil (State of Goiás).

Materials and methods

Participants and study design

A descriptive, cross-sectional study with a prospective component was conducted at the main infectious diseases public health service centre, responsible for caring for most PLHAs in the State of Goiás (6.77 million inhabitants), in Midwest Brazil. HIV assistance and ART are offered free of charge in Brazil. The recruitment period was from June 2015 to July 2018. The exclusion criterion was previous cryptococcal disease. Participants were older than 17 years, had a laboratory confirmed diagnosis of HIV and a CD4+ T lymphocyte count lower than 200 cells/mL.

The data were collected through a structured interview and extracted from medical records (age, sex, time of HIV diagnosis, CD4 cell count, HIV viral load, ART history, previous opportunistic infections and current systemic or neurological symptoms). We considered the presence of fever, weight loss, asthenia, pulmonary symptoms, diarrhoea or oral moniliasis as general symptoms. Neurological symptoms

included headache, convulsions, changed mental state, dizziness, and visual or auditory deficit. Serum cryptococcal antigen by LFA (Immuno-Mycologics Inc®) and complementary examinations were performed, including haemogram, urea, creatinine, proteinogram, and haemoculture for fungi.

We performed a lumbar puncture on all individuals with positive serum CrAg to rule out meningeal involvement through India ink microscopy on the cerebrospinal fluid (CSF), CSF CrAg test and fungal culture. When cryptococcal meningitis was detected, the patient was treated in hospital with amphotericin B deoxycholate (0.7-1 mg/kg/day) or with a lipid formulation (3-5 mg/kg/day) associated with fluconazole (800-1200 mg/day), because 5-fluoytosine is not available in Brazil.

Pre-emptive fluconazole treatment was proposed for those with positive serum CrAg, without central nervous system involvement. The following doses were prescribed: 900 mg for 2 weeks, 450 mg for 8 to 10 weeks and a subsequent maintenance dose of 150-300 mg, according to the modified WHO recommendations [9]. At that time, only 150 mg fluconazole capsules were available in the Brazilian public health system. Patients with positive CrAg had their medical records reassessed at January 2019. We investigated the rate of adherence to ART and pre-emptive therapy; the recent CD4 count and viral load; the incidence of cryptococcal diseases, and mortality rate in this group.

Statistical analysis

The sample size was calculated using the formula: $N=(Z^2 \times P[1 - P])/E^2$, where N is the sample size; Z is the level of confidence according to the standard normal distribution (for 95% level of confidence, $Z=1.96$), P is the estimated prevalence of CrAg positivity among the participants (we considered $p=0.10$), and E is the tolerated

margin of error (proportion within 4%), resulting in a required sample of 208 participants.

Data were input into Microsoft Office Excel ® spreadsheets and analysed using the Statistical Package for the Social Sciences version 23.0 (SPSS®, IBM Corporation, Armonk, NY, USA). Descriptive and exploratory analyses were performed to summarize the characteristics of the individuals. Central measures (mean or median) and dispersion measures (standard deviation) were calculated for continuous variables, and percentage for categorical variables. We estimated CrAg prevalence considering CD4 $\leq$ 100 and 101-199 cells/mL, with 95% confidence intervals (CI).

Univariate analysis was performed to investigate sociodemographic, clinical, and laboratory factors potentially associated with serum CrAg positivity. Chi-squared test or the Fisher exact test were used for comparison of categorical variables and the t test for continuous variables. All tests were two-tailed, with the significance level set at 5%.

Ethics statement

This study was approved by the institutional review board of Tropical Diseases State Hospital “Dr. Anuar Auad” (CAAE: 42429715.5.1001.0034). All patients gave written informed consent and the data collected were considered confidential.

Results

A total of 214 individuals with CD4 cell counts <200 cells/mL were enrolled, of whom 72.4% were male. The median age was 40 years and ranged from 18 to 78 years. Most of the individuals (78.5%) were interviewed on an outpatient basis and the others were hospitalized. About half of the participants were diagnosed with HIV within the previous 12 months, 40.2% had been diagnoses for more than 5 years and 68.2%

had previous opportunistic disease. Before enrolment, 88.8% of the participants had started HAART at some time, of whom 51.4% were regular users of this medication in the last 3 months. The sociodemographic, clinical and personal characteristics, including the use of ART, are shown in Table 1.

Table 1. Sociodemographic and clinical characteristics of 214 individuals screened for serum CrAg.

Variables	Total, n (%)	CrAg positive, n (%)	CrAg negative, n (%)	p-value ¹
Serum antigenemia	214	17 (7.9)	197 (92.1)	
Sex				
Male	155 (72.4)	14 (9.0)	141 (91.0)	0.411
Female	59 (27.6)	3 (5.1)	56 (94.9)	
Age				
Age (years), media (SD)	41.8 (10.9)	38.47 (11.4)	41.3 (10.9)	0.308
≤40 years	112 (52.3)	11 (9.8)	101 (90.2)	0.322
>40 years	102 (47.7)	6 (5.9)	96 (94.1)	
Presence of symptoms				
Asymptomatic	75(35)	4 (5.3)	71 (94.7)	0.316
Any symptoms	139 (65)	13 (9.3)	126 (90.7)	
General symptoms	103 (48.1)	6 (5.8)	97 (94.2)	0.318
Neurological symptoms	87 (40.7)	10 (11.5)	77 (88.5)	0.128
Previous opportunistic diseases				
Yes	146 (68.2)	13 (8.9)	133 (91.1)	0.591
No	68 (31.8)	4 (5.9)	64 (94.1)	
HIV diagnosis				
≤12 months	101 (47.2)	7 (6.9)	94 (93.1)	0.625
>12 months	113 (52.8)	10 (8.8)	103 (91.2)	
Experience with ART ²				
Yes	190 (88.8)	16 (8.4)	174 (91.6)	0.407
No (naive)	24 (11.2)	1 (4.2)	23 (95.8)	
Regular ³ use of ART				
Yes	110 (51.4)	11 (10)	99 (90)	0.316
No	104 (48.6)	6 (5.8)	98 (94.2)	

¹Level of significance. For categorical variables, the chi-squared test was used; if n<5 in any cell, the Fisher exact test was used. The t test was used for continuous variables. ²ART, antiretroviral therapy; ³regular use of ART, medication use during the last 3 months.

The CD4 cell counts ranged from 1 to 199 cells/mL (median, 47 cells/mL); 73.3% had <100 cells/mL, 53.3% had up to 50 cells/mL. The median CD4 count was 56 cells/mL in the CrAg-positive group and 47 in the CrAg-negative group (p=0.466). Regarding viral load, 51.4% had >100,000 copies/mL and 25 participants had a viral load below the detection threshold (< 40 copies/mL). Characteristics related to the laboratory tests are described in Table 2. No clinical, sociodemographic, personal or laboratory characteristics were identified as related to the positivity of cryptococcal antigenemia.

Table 2. Laboratory tests of the 214 individuals screened with serum CrAg.

Tests	Total	CrAg positive, n (%)	CrAg negative, n (%)	p-value
CD4				
≤100 cells/mL	159	12 (7.5)	147 (92.5)	0.717
>100 cells/mL	55	5 (9.1)	50 (90.9)	
Viral load				
<100,000 copies/mL	104	10 (9.6)	94 (90.4)	0.382
≥100,000 copies/mL	110	7 (6.4)	103 (93.6)	
Haemoglobin ¹				
<12 g/dL	75	3 (4)	72 (96)	0.122
≥12 g/dL	136	14 (10.3)	122 (89.7)	
Hematocrit ¹				
<35%	63	2 (3.2)	61 (96.8)	0.104
≥35%	148	15 (10.1)	133 (89.9)	
White blood cells ¹				
<3500 cells/L	56	3 (5.4)	53 (94.6)	0.568
≥3500 cells/L	155	14 (9.0)	41 (141)	
Platelets ²				
<150 × 10 ⁹ cells/L	46	4 (8.7)	42 (91.3)	1.000
≥150 × 10 ⁹ cells/L	151	13 (8.1)	48 (91.9)	
Albumin ³				
<3.5 g/dL	45	2 (4.4)	43 (95.6)	0.372
≥3.5 g/dL	151	14 (9.3)	137 (90.7)	

For categorical variables, the chi-squared test was used; if n<5 in any cell, the Fisher exact test was used. The t test was used for continuous variables. ¹Three missing values. ²Seven missing values. ³18 missing values.

Among the 214 participants, 17 presented with positive cryptococcal antigenemia, resulting in an overall prevalence of 7.9% (95%CI 4.8-12.2). Sixteen individuals who were CrAg positive had experience of ART but only one had an undetectable viral load. In the outpatient group (168 individuals), the prevalence of cryptococcal antigenemia was 7.7% (95%CI 4.4-12.6), and in the hospitalized group (46 individuals) it was 8.7% (95%CI 2.8–19.6), without a significant difference between the groups.

The prevalence of CrAg among asymptomatic participants was 5.3% (95%CI 1.4-13.1), and 9.3% (95%CI 5.5-15.3) among symptomatic participants, with no significant difference between the groups ($p=0.316$). The prevalence of CrAg was 7.5% (95%CI 4.1-12.6) in individuals with $CD4 \leq 100$ cells/mL and 9.1% (95%CI 3.4-19.0) in those with a CD4 count between 101 and 199 cells/mL ($p=0.17$).

All 17 individuals with positive serum antigenemia underwent lumbar puncture and one had documented cryptococcal meningitis. This was demonstrated by positive India ink microscopy, positive CrAg LFA and positive culture for *Cryptococcus* spp in CSF. This patient presented severe intracranial hypertension (initial CSF pressure of 140 cmH₂O), which improved without need for shunt, after 5 weeks of regular lumbar punctures. He received treatment with amphotericin B (first deoxycholate 50mg / day, then lipid complex 250mg / day, due to altered renal function) associated with fluconazole 800mg for 6 weeks. Regular outpatient follow-up was maintained at another facility. Most individuals with positive CrAg received pre-emptive induction therapy with fluconazole ($n=13$). Four individuals received itraconazole at a dose of 400 mg in the induction phase and maintained this antifungal therapy during consolidation and maintenance, three because of a history of histoplasmosis and one as aspergillosis treatment.

After a median follow-up of 12 months (range, 6-42 months), no further cases of cryptococcal meningitis or cryptococcosis were reported in the CrAg-positive group. Most of the patients (88.0%) remained under care and 76.4% (13/17) achieved undetectable viral load. The adherence to pre-emptive treatment was 68.7% (11/16) and the overall mortality rate was 11.7% (2/17), with no cryptococcal disease as the main cause of death. The median CD4 count increased from 56 cells/ μ L (range, 7-199 cells/ μ L) to 140 cells/ μ L (range, 6-485 cells/ μ L); only 23.5% (4/17) remained with a CD4 count <100 cells/ μ L. Details of the follow-up of CrAg-positive individuals are presented in Table 3.

Table 3. Characteristics of CrAg-positive individuals and follow-up.

Patient	Follow-up time (months)	Neuro crypto	T1 CD4 (cells/ μ L) ¹	T1 viral load (copies/mL) ¹	Regular ART on T1 ¹	T2 CD4 (cells/ μ L) ²	In care	T2 viral load (copies/mL) ²	Regular ART on T2 ²	Treatment (definitive or pre-emptive)
1	42	No	28	$\geq 100,000$	Yes	485	Yes	<40	Yes	Fluconazole
2	42	Yes	199	<100,000	Yes	425	Yes	183	Yes	Amphotericin +Fluconazole
3	28	No	130	<100,000	Yes	332	Yes	<40	Yes	Fluconazole
4	17	No	126	<100,000	Yes	47	Yes	<40	Yes	Itraconazole
5	16	No	7	$\geq 100,000$	Yes	184	Yes	<40	Yes	Fluconazole
6	15	No	75	$\geq 100,000$	No	140	Yes	<40	Yes	Itraconazole, irregular ³
7	14	No	36	<100,000	No	132	Death	<40	Yes	Fluconazole, irregular
8	12	No	10	<100,000	No	125	Yes	125,559	No	Fluconazole
9	12	No	37	$\geq 100,000$	Yes	124	Yes	<40	Yes	Fluconazole
10	7	No	27	<100,000	Yes	243	Yes	<40	Yes	No use
11	8	No	31	$\geq 100,000$	No	6	Death	1,112,547	No	No use
12	7	No	56	<100,000	No	72	Yes	<40	Yes	Itraconazole
13	7	No	20	$\geq 100,000$	No	117	Yes	<40	Yes	Fluconazole
14	6	No	96	$\geq 100,000$	Yes	290	Yes	<40	Yes	Itraconazole
15	6	No	97	<100,000	Yes	97	Yes	121	Yes	No Use
16	6	No	158	<100,000	Yes	202	Yes	<40	Yes	No Use
17	6	No	143	<100,000	Yes	308	Yes	<40	Yes	Fluconazole

¹At time of screening (first evaluation). ²At time of re-evaluation (second evaluation). ³Irregular use of pre-emptive treatment: <10 weeks.

Discussion

In the present study, the overall prevalence of cryptococcal antigenemia was 7.9% (95%CI 4.9-12.2). There was no difference in the prevalence of CrAg among individuals with CD4 lower than 100 cells/mL compared with those with CD4 counts between 101 and 199 cells/mL. Most individuals were experienced with ART, however only 11.6% had an undetectable HIV viral load, reinforcing the relevance of CrAg screening among severe immunosuppressed HIV individuals, regardless of ART status.

According to the WHO recommendations, areas with a prevalence of CrAg greater than 3% should provide comprehensive, early screening for cryptococcosis [9]. Furthermore, in regions with a high prevalence of cryptococcosis, screening for CrAg is cost-effective in reducing morbidity and mortality related to this infection in individuals infected with HIV. A systematic review that aimed to assess the prevalence of cryptococcal antigenemia found values ranging from 0.2% to 22.5%, depending on the geographic area and immune status of the HIV population studied [40].

Brazil is a large country with varying morbidity profiles and scarcity of data on the prevalence of CrAg among the HIV population. The prevalence of CrAg in Brazil was 2.6% in the north region (Pará state) [37], regardless of CD4 count and symptoms. In the southeast region, it varied from 3.1% (95%CI 1.0%-7.0%) in asymptomatic individuals with a CD4 count <200 cells/mL in São Paulo [39] to 11.2% (95%CI 6.2%-19.5%) in Rio de Janeiro, regardless of symptoms [38]. However, comparisons between different regions should be made with caution, considering the immunosuppressive profile of the individuals recruited, the presence or absence of symptoms suggestive of cryptococcal meningitis and the use of ART. For example, in the study by Costa et al. [37], if only participants with a CD4 count <200 cells/mL were

included, the prevalence of CrAg would be 8.3%. In the study by Vidal et al., if symptomatic and asymptomatic patients were grouped, the prevalence was 11.4% (95%CI 7.9%-16.3%) [39], both similar to our study.

In the previous mentioned systematic review [40], most of the studies were conducted in resource-limited settings, mainly in Africa, with only one study from Latin America. The pooled prevalence of CrAg among individuals with CD4 count <100 cells/mL was 6.4% (95%CI 5.7%-7.2%), which was similar to our results. However, among people with a CD4 count between 101 and 200 cells/mL, the pooled prevalence was 2.0% (95%CI 1.2%-2.7%), which was lower than the prevalence found in our study. The prevalence of CrAg among those with a CD4 cell count $\leq$ 100 cells/mL was shown to be higher among hospitalized patients (9.8%; 95%CI 4.0%-15.5%) than among patients treated at outpatient clinics (6.3%; 95%CI 5.3%-7.4%) [40]. We obtained a similar prevalence among these groups, with no statistically significant difference.

The difference in results could be explained by our small sample size, with low power to detect differences (type II error), as the cited review included >2,000 CrAg-positive cases. In addition, most of the studies screened ART-naïve individuals with a recent HIV diagnosis. Our population differed in that as it comprised mostly individuals with a long-term diagnosis of HIV, without virologic control and with a long period of severe immunosuppression.

We did not identify any demographic, clinical or laboratory variables that could assist in predicting CrAg positivity, reinforcing the concept that screening is needed for all individuals with advanced HIV immunosuppression regardless of clinical manifestations.

Similar to other studies [38, 39, 41, 42], our population comprised individuals with a previously established diagnosis of HIV, already on ART, with a history of signs and symptoms of AIDS and opportunistic diseases. Even in this scenario, the strategy of CrAg screening is still justifiable, because immunosuppression itself is a risk factor for reactivation of cryptococcal disease and the protective factor related to ART would only be relevant in the context of good adherence and viral suppression [40, 42].

No asymptomatic cryptococcal meningitis was detected and we did not find any new cases in CrAg-positive individuals, even in those with low adherence to pre-emptive treatment. This contrasts with a recent study reporting 33% (95%CI 21%-45%) of asymptomatic cryptococcal meningitis among CrAg-positive individuals and an incidence of cryptococcal meningitis during follow-up of 21.4% (95%CI 11.6%-34.4%) without pre-emptive fluconazole and 5.7% (95%CI 3.0%-9.7%) with pre-emptive fluconazole [43]. This is probably due to our small sample size, with few positive cases. In addition, our CrAg-positive individuals remained mostly on ART, with virologic control and CD4 count >100 cell/ μ L in more than 75%.

Our study has limitations because it is a cross-sectional study, with short prospective evaluation of the outcome of the individuals enrolled. The sample of people living with HIV and CD4 count <200 cells/mL was obtained by convenience and individuals who could not be contacted, who were not available to attend the consultation because of social issues or clinical status could create a population with different characteristics. Due to financial restriction, titration of the CrAg LFA tests was not performed; only qualitative results were obtained. Thus, there is a risk of false-positives in tests with low titration ($\leq 1:5$) up to 34% [44].

Conclusions

The prevalence of cryptococcal antigenemia in the Midwest Region of Brazil is high and well above the 3% recommended by the WHO to justify routine antigenic screening. Sociodemographic factors, duration of HIV diagnosis, ART history, clinical or laboratory characteristics could not predict positivity of CrAg in an HIV population with CD4 <200 cells/mL. To date, this strategy is unfortunately not routinely available in the Brazilian public health system as in other countries. Health policies incorporating antigenic diagnostic methodologies, such as the cost-effective LFA, are necessary for the early identification of cryptococcal disease and its treatment, in similar settings.

Acknowledgements

We thank all medical assistants and staff at the State Hospital for Tropical Diseases and State Laboratory of Public Health of Goiás for assistance in multiprofessional care, patient counselling and laboratory routine.

References

- [1] Hagen F, Khayhan K, Theelen B, et al. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. Fungal Genet Biol 2015; 78: 16–48.
- [2] Kwon-Chung KJ, Bennett JE, Wickes BL, et al. The case for adopting the ‘Species Complex’ nomenclature for the etiologic agents of cryptococcosis. mSphere 2017; 2: e00357-16.
- [3] Mitchell TG, Perfect JR. Cryptococcosis in the era of AIDS-100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. Clin Microbiol Rev 1995; 8: 515–548.

- [4] Perfect JR, Casadevall A. Cryptococcosis. *Infect Dis Clin North Am* 2002; 16: 837–74, v–vi.
- [5] Leal AL, Faganello J, Fuentefria AM, et al. Epidemiological profile of cryptococcal meningitis patients in Rio Grande do Sul, Brazil. *Mycopathologia* 2008; 166: 71–75.
- [6] Jarvis JN, Bicanic T, Loyse A, et al. Determinants of mortality in a combined cohort of 501 patients with HIV-associated cryptococcal meningitis: implications for improving outcomes. *Clin Infect Dis* 2014; 58: 736–745.
- [7] Brizendine KD, Baddley JW, Pappas PG. Predictors of mortality and differences in clinical features among patients with cryptococcosis according to immune status. *PLoS One* 2013; 8: e60431.
- [8] Rajasingham R, Smith RM, Park BJ, et al. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. *Lancet Infect Dis* 2017; 17: 873–881.
- [9] WHO. Guidelines for the diagnosis, prevention, and management of cryptococcal disease in HIV-infected adults, adolescents and children, March 2018: supplement to the 2016 consolidated guidelines of the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HI. Geneva: World Health Organization <https://apps.who.int/iris/handle/10665/260399> (2018).
- [10] Dromer F, Mathoulin-Pélissier S, Fontanet A, et al. Epidemiology of HIV-associated cryptococcosis in France (1985–2001): comparison of the pre- and post-HAART eras. *AIDS* 2004; 18: 555–562.
- [11] Firacative C, Lizarazo J, Illnait-Zaragozı MT, et al. The status of cryptococcosis in Latin America. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2018; 113: e170554.

- [12] La Hoz RM, Pappas PG. Cryptococcal infections: changing epidemiology and implications for therapy. *Drugs* 2013; 73: 495–504.
- [13] Scriven JE, Lalloo DG, Meintjes G. Changing epidemiology of HIV-associated cryptococcosis in sub-Saharan Africa. *Lancet Infect Dis* 2016; 16: 891–892.
- [14] Jarvis JN, Harrison TS. Forgotten but not gone: HIV-associated cryptococcal meningitis. *Lancet Infect Dis* 2016; 16: 756–758.
- [15] UNAIDS. Data Sheet 2017 <http://aidsinfo.unaids.org/> (2017, accessed 6 June 2018).
- [16] Soares EA. Mortalidade por criptococose no Brasil (2000 a 2012). Fundação Oswaldo Cruz, 2015.
- [17] Moreira TA, Ferreira MS, Ribas RM, et al. Criptococose: estudo clínico-epidemiológico, laboratorial e das variedades do fungo em 96 pacientes. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006; 39: 255–258.
- [18] Nunes JO, Tsujisaki RAS, Nunes MO, et al. Cryptococcal meningitis epidemiology: 17 years of experience in a State of the Brazilian Pantanal. *Rev Soc Bras Med Trop* 2018; 51: 485–492.
- [19] Vidal JE, Gerhardt J, Peixoto de Miranda ÉJ, et al. Role of quantitative CSF microscopy to predict culture status and outcome in HIV-associated cryptococcal meningitis in a Brazilian cohort. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012; 73: 68–73.
- [20] Rajasingham R, Meya DB, Boulware DR. Integrating cryptococcal antigen screening and pre-emptive treatment into routine HIV care. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2012; 59: 85–91.

- [21] WHO. Rapid advice: diagnosis, prevention and management of cryptococcal disease in HIV-infected adults, adolescents and children. Geneva: World Health Organization <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK299520/> (2011).
- [22] French N, Gray K, Watera C, et al. Cryptococcal infection in a cohort of HIV-1-infected Ugandan adults . *AIDS* 2002; 16: 1031–1038.
- [23] Jarvis JN, Lawn SD, Vogt M, et al. Screening for cryptococcal antigenemia in patients accessing an antiretroviral treatment program in South Africa. *Clin Infect Dis* 2009; 48: 856–862.
- [24] Liechty CA, Solberg P, Were W, et al. Asymptomatic serum cryptococcal antigenemia and early mortality during antiretroviral therapy in rural Uganda. *Trop Med Int Heal* 2007; 12: 929–935.
- [25] Alemu AS, Kempker RR, Tenna A, et al. High prevalence of Cryptococcal antigenemia among HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy in Ethiopia. *PLoS One* 2013; 8: e58377.
- [26] Chipungu C, Veltman JA, Jansen P, et al. Feasibility and acceptability of cryptococcal antigen screening and prevalence of cryptocococemia in patients attending a resource-limited HIV/AIDS clinic in Malawi. *J Int Assoc Provid AIDS Care* 2015; 14: 387–390.
- [27] Huang HR, Fan LC, Rajbanshi B, et al. Evaluation of a new cryptococcal antigen lateral flow immunoassay in serum, cerebrospinal fluid and urine for the diagnosis of cryptococcosis: a meta-analysis and systematic review. *PLoS One* 2015; 10: e0127117.

- [28] Kaplan JE, Vallabhaneni S, Smith RM, et al. Cryptococcal antigen screening and early antifungal treatment to prevent cryptococcal meningitis: a review of the literature. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2015; 68 Suppl 3: S331-9.
- [29] Larson BA, Rockers PC, Bonawitz R, et al. Screening HIV-infected patients with low CD4 counts for cryptococcal antigenemia prior to initiation of antiretroviral therapy: cost effectiveness of alternative screening strategies in South Africa. *PLoS One* 2016; 11: e0158986.
- [30] Mfinanga S, Chanda D, Kivuyo SL, et al. Cryptococcal meningitis screening and community-based early adherence support in people with advanced HIV infection starting antiretroviral therapy in Tanzania and Zambia: an open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 2015; 385: 2173–2182.
- [31] Oyella J, Meya D, Bajunirwe F, et al. Prevalence and factors associated with cryptococcal antigenemia among severely immunosuppressed HIV-infected adults in Uganda: a cross-sectional study. *J Int AIDS Soc* 2012; 15: 15.
- [32] Pongsai P, Atamasirikul K, Sungkanuparph S. The role of serum cryptococcal antigen screening for the early diagnosis of cryptococcosis in HIV-infected patients with different ranges of CD4 cell counts. *J Infect* 2010; 60: 474–477.
- [33] Rugemalila J, Maro VP, Kapanda G, et al. Cryptococcal antigen prevalence in HIV-infected Tanzanians: a cross-sectional study and evaluation of a point-of-care Lateral Flow Assay. *Trop Med Int Heal* 2013; 18: 1075–1079.
- [34] Jarvis JN, Percival A, Bauman S, et al. Evaluation of a novel point-of-care cryptococcal antigen test on serum, plasma, and urine from patients with HIV-associated cryptococcal meningitis. *Clin Infect Dis* 2011; 53: 1019–1023.

- [35] Jarvis JN, Harrison TS, Lawn SD, et al. Cost effectiveness of cryptococcal antigen screening as a strategy to prevent HIV-associated cryptococcal meningitis in South Africa. *PLoS One* 2013; 8: e69288.
- [36] Brasil. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em adultos. Brasília: Ministério da Saúde. <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2013/protocolo-clinico-e-diretrizes-terapeuticas-para-manejo-da-infeccao-pelo-hiv-em-adultos> (2018).
- [37] Costa MM da, Madeira L di P, Feitosa RNM, et al. Detection of *Cryptococcus neoformans* capsular antigen in HIV-infected patients in the state of Para in the North of Brazil. *Curr HIV Res* 2013; 11: 647–51.
- [38] Ferreira MF, Brito-Santos F, Veloso V, et al. Cryptococcal antigenemia prevalence in HIV infected patients in a Southeast Brazil Center. 10th International Conference on *Cryptococcus* and Cryptococcosis (ICCC).
- [39] Vidal JE, Toniolo C, Paulino A, et al. Asymptomatic cryptococcal antigen prevalence detected by lateral flow assay in hospitalised HIV-infected patients in Sao Paulo, Brazil. *Trop Med Int Heal* 2016; 21: 1539–1544.
- [40] Ford N, Shubber Z, Jarvis JN, et al. CD4 cell count threshold for cryptococcal antigen screening of HIV-infected individuals: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2018; 66: S152–S159.
- [41] Lawrence DS, Boyer-Chammard T, Jarvis JN. Emerging concepts in HIV-associated cryptococcal meningitis. *Curr Opin Infect Dis* 2019; 32: 16–23.
- [42] Beyene T, Woldeamanuel Y, Asrat D, et al. Comparison of cryptococcal antigenemia between antiretroviral naive and antiretroviral experienced HIV-positive patients at two hospitals in Ethiopia. *PLoS One* 2013; 8: e75585.

- [43] Temfack E, Bigna JJ, Luma HN, et al. Impact of routine cryptococcal antigen screening and targeted preemptive fluconazole therapy in antiretroviral-naive human immunodeficiency virus–infected adults with CD4 cell counts <100/mL: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2019; 68: 688–698.
- [44] Dubbels M, Granger D, Theel ES. Low *Cryptococcus* antigen titers as determined by Lateral Flow Assay should be interpreted cautiously in patients without prior diagnosis of cryptococcal infection. *J Clin Microbiol* 2017; 55: 2472–2479.

4.2 Artigo 2 – False-negative result of serum cryptococcal antigen lateral flow assay in an HIV-infected patient with culture-proven cryptococemia

Revista: Manuscrito a ser submetido para publicação no periódico Mycopathologia.

Title: False-negative result of serum cryptococcal antigen lateral flow assay in an HIV-infected patient with culture-proven cryptococemia

Short title: False-negative of serum CrAg LFA

Moara Alves Santa Barbara Borges^{1,2}; João Alves de Araújo Filho^{1,4}; Renata de Bastos Ascenço Soares^{3,4}; José Ernesto Vidal; ^{5,6} Marília Dalva Turchi^{1,4}

¹Institute of Tropical Pathology and Public Health of Federal University of Goiás – Goiânia, Goiás, Brazil

²Infectious Disease Service, Clinical Hospital of Federal University of Goiás – Goiânia, Goiás, Brazil

³Catholic University of Goiás – Goiânia, Goiás, Brazil

⁴Tropical Diseases State Hospital “Dr. Anuar Auad” – Goiânia, Goiás, Brazil

⁵ Infectious Diseases Institute Emílio Ribas – São Paulo, São Paulo, Brasil.

⁶ Infectious Disease Division, Clinical Hospital of College Medicine of University of São Paulo

Corresponding author: Moara Alves Santa Barbara Borges, Institute of Tropical Pathology and Public Health of Federal University of Goiás; Rua 235, s/nº, Setor Universitário, Goiânia, Goiás, Brazil. E-mail: moarasb@gmail.com.

<https://orcid.org/0000-0003-2461-2063>

Abstract

Cryptococcosis is a severe opportunistic fungal infection with high morbidity and mortality and affects particularly people living with HIV/AIDS and advanced disease. The detection of cryptococcal capsular antigen is very sensitive and specific, however false-negative results have been reported in the literature, mostly in cerebrospinal fluid. We report the case of an HIV-infected patient with CD4 count of 42 cells/mL, who presented only generalized weakness, but had a blood culture with growth of

Cryptococcus spp. and a paired serum cryptococcal antigenemia (CrAg) lateral flow assay (LFA) was negative. This patient had a spontaneous and unexpected resolution of cryptococcaemia, possibly secondary to a transient subclinical episode. The regular use of highly active antiretroviral therapy and effective immune restoration may have contributed to the benign outcome. In addition, the concomitant negative serum CrAg LFA may be explained more probably due to a prozone effect. Despite the high accuracy of LFA, careful clinical evaluation, culture assessment, and close follow-up are relevant.

Key words: Cryptococcosis; AIDS; Fungal Antigens; False Negative Reaction.

INTRODUCTION

Cryptococcosis is a severe opportunistic fungal infection with high morbidity and mortality, caused predominantly by species of *Cryptococcus* complexes (*C. neoformans* and *C. gatti*). This fungi particularly affects people living with HIV/AIDS (PLWHA) with advanced disease (CD4 count < 100 cells/mL) [1–3].

The presentations of cryptococcosis is broad, ranging from respiratory tract colonization and the presence of serum cryptococcal antigen with no clinical repercussion, to cryptococemia and cryptococcal meningitis [4, 5].

The cryptococcal antigen (CrAg) lateral flow assay (LFA) is a key advance in the diagnosis of cryptococcosis in (PLWHA). The LFA is in excellent agreement with cultures, latex agglutination, immunoenzymatic assay (ELISA) in serum and cerebrospinal fluid (CSF) [6-8]. It has 100% (97.6%-100%) serum sensitivity, 96.8% (93.7%-98.6%) specificity and 100% (98.1%-100%) negative predictive value compared with culture and latex agglutination [6, 8, 9]. Serum lateral flow assay had a pooled sensitivity of 100% when compared with blood culture and of 95.6% when compared to serum enzyme immunoassay [9, 10] Cryptococcosis with a false-negative antigenic test has been reported in the literature [11–16]. The CrAg LFA has some advantages over conventional diagnostic methods: results are available in less than 10 minutes, little training is required for use and interpretation, minimal laboratory infrastructure is required and refrigerated storage is not necessary [17,18].

This case report presents an episode of false-negative cryptococcal antigenemia by LFA, demonstrated by a positive blood culture for *Cryptococcus* spp of a matched

sample, highlighting the need for knowledge of this situation and discussion about its possible causes.

CASE REPORT

A 57-year-old man from Goiânia (State of Goiás, Brazil) was diagnosed with HIV 13 years before, without any follow-up since then. He had a recent hospitalization for consumptive syndrome, chronic diarrhoea and liver microabscesses. On that occasion, he received antibacterial systemic treatment, was started on antiretroviral therapy (ART; tenofovir disoproxil fumarate + lamivudine + dolutegravir) and primary prophylaxis with sulfamethoxazole-trimethoprim and azithromycin.

At the time of hospital stay (T0), his test results were as follows: CD4 count, 42 cells/mL (5%); viral load, 805,439 copies/mL (log 5.9); negative cryptococcal antigen by latex agglutination; and negative bacterial and fungal blood culture. One month later (T1), during outpatient follow-up and as part of a study recruitment, he complained solely of weakness, without systemic or neurological symptoms. In addition, a blood sample was collected for LFA serum cryptococcal antigenemia, blood culture and biochemical examinations. His results were as follows: haemoglobin (Hb), 11 g/dL; haematocrit (Ht), 35%; white blood cell count (WBC), 4,590 cells/mm³; platelets, 233 x 10⁹ cells/L; urea, 36 mg/dL; creatinine, 0.85 mg/dL; albumin, 2.79 g/dL; globulins, 3.8 g/dL. The LFA cryptococcal antigenemia was negative, and the patient was advised to maintain clinical follow-up and adherence to ART. However, the patient was lost to follow-up and we received the CrAg-matched blood culture with growth of *Cryptococcus* spp. A new outpatient visit (T2) was performed only after 4 months of T1. Between T1 and T2, the patient presented progressive clinical improvement of the nonspecific complaint of weakness and received no antifungal systemic therapy in this period. At T2, the patient was asymptomatic with a 30 kg weight gain and on regular use of medications. A new sample for fungal blood culture and CrAg was obtained and the source of cryptococcaemia was investigated. The serum antigenic tests performed at this time (T2) were positive by LFA (Fig. 1) and by latex agglutination, with a titration of 1:64 for the latter method. Blood and urine cultures were negative for fungi. His recent CD4 count was 223 cells/mL (11%) and the viral load was undetectable. He underwent a lumbar puncture and the results for his CSF were as follows: leukocytes, 5/mm³; red blood cells, 23/mm³; serum glucose, 115 mg/dL; CSF glucose, 62 mg/dL, protein, 53 mg/dL, negative on India ink staining; negative on CrAg LFA; and negative cultures.

His general laboratory results were substantially improved: Hb, 16.3 g/dL; Ht, 48%; WBC, 3,630 cells/mm³; platelets, 151 x 10⁹ cells/L; albumin 3.72, g/dL; globulins, 3.8 g/dL. A computed tomography (CT) scan of the chest revealed a single nodule with soft-tissue density and regular contour in the anterior segment of the upper lobe of the right lung, measuring 2.2 × 1.2 cm (Fig. 2). We decided on treatment of pulmonary cryptococcosis with fluconazol 800 mg for 2 weeks, followed by fluconazole 400 mg for a total of 6 months. The patient maintained follow-up, adherence to ART, without any symptoms suggestive of cryptococcosis after one year of follow-up.

DISCUSSION

Here, we report an unusual case of an HIV-infected patient with cryptococemia and a negative CrAg LFA in a paired sample of serum.

In general, a false-negative CrAg test may be the result of: low fungal load; prozone reaction due to high antigen titres; presence of immunocomplexes preventing release of GMX; samples transported in inappropriate vials; or hypocapsular or acapsular strains of *Cryptococcus* spp [11]. Human infections caused by acapsular *Cryptococcus* or poorly encapsulated strains can be identified only after tissue biopsy or tissue culture [11–13].

In cases where there is a very high antigenic concentration, the antigen-antibody reaction may not occur and the test may present as false-negative, the so-called prozone (“Hook”) effect or postzone effect [12, 16]. Most reports refer to false-negative tests on CSF sample [11, 14, 18, 19], with limited data resembling serum samples [15].

It is reported an increase in LFA sensitivity for the diagnosis of cryptococcal meningitis when samples suspected of having a high organism load were diluted before the assay was performed [15]. One study described a patient from Malawi who had a positive India ink stain in CSF, with a negative initial CrAg LFA test. They reached positivity after a semi-quantitative [16] procedure on the CSF, demonstrating different results at progressive titres: 1:5, negative; 1:10, weakly positive; 1:20, positive; 1:40, weakly positive; and 1:80, negative [12].

Another case report described a patient with slow clinical progression of untreated cryptococcosis from leptomeningitis to a parenchymal form of the disease, with all CrAg LFA tests negative. It was explained by a capsule-deficient strain of *Cryptococcus* with reduced virulence, delaying the right diagnosis [11].

In the present case, the HIV-infected patient with advanced disease presented cryptococemia and a negative serum CrAg LFA and, interestingly, he had only unspecific complaints and good outcome, despite of no receive antifungals. Cryptococcaemia is classically associated with increased odds of mortality (odds ratio, 5.09; 95% confidence interval, 2.54–10) in retrospective studies [20]. The cause of spontaneous and unexpected resolution of cryptococcaemia is unknown, but it is possible that a transient subclinical episode may have occurred. Subclinical or asymptomatic cryptococcal meningitis is well described [21] and theoretically subclinical cryptococemia can be possible in a subset of cases as suggested with temporal sequence of CrAg concentration in blood during progression of disease from pulmonary infection to meningitis [17]. The regular use of HAART and effective immune restoration may have contributed to the benign outcome. In addition, the concomitant negative serum CrAg LFA may be explained due to; (i) more probably, a prozone effect; or (ii) either acapsular or hypocapsular specimens [11–13]. Unfortunately, we had no access to individual culture or titration of CrAg LFA to evaluate these hypotheses.

The most likely source was an isolated pulmonary nodule, without symptoms, that progressed to cryptococemia, but without meningeal involvement and self-limited. Four months after the positive blood culture, the antigenic tests were both positive, with relatively high latex titre (1:64) and negative paired haemoculture.

Despite the high accuracy of the antigenic test by LFA, careful clinical evaluation, culture assessment, and close follow-up are relevant. Better tracking of patients who have been screened for CrAg is needed, because false-negative cases may occur and should be considered in immunocompromised patients.

Compliance with Ethical Standards: This study was approved by the institutional review board of Tropical Diseases State Hospital “Dr. Anuar Auad” (CAAE: 42429715.5.1001.0034). The patient gave written informed consent for publication and the data collected were considered confidential. All data are available in a repository [21].

Authors’ contribution: All authors make substantial contributions to conception and study design and participate in drafting the article and revising it critically for important intellectual content. All give final approval of the version to be submitted and MDT and JEV give final approval for the manuscript.

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest. JAAF received financial support from the Foundation for Research Support of the State of Goiás (www.fapeg.go.gov.br), Digital number 17809. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

References

- [1] Hagen F, Khayhan K, Theelen B, et al. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. *Fungal Genet Biol* 2015; 78: 16–48.
- [2] Perfect JR. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. In: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ (eds) *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2015, pp. 934–948.
- [3] Kwon-Chung KJ, Bennett JE, Wickes BL, et al. The case for adopting the 'Species Complex' nomenclature for the etiologic agents of cryptococcosis. *mSphere* 2017; 2: e00357-16.
- [4] Mitchell TG, Perfect JR. Cryptococcosis in the era of AIDS-100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8: 515–548.
- [5] CDC, NIH, HIV Medicine Association. Guidelines for the prevention and treatment of opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents http://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/lvguidelines/adult_oi.pdf (2018, accessed 10 April 2018).
- [6] Boulware DR, Rolfes MA, Rajasingham R, et al. Multisite validation of cryptococcal antigen lateral flow assay and quantification by laser thermal contrast. *Emerg Infect Dis* 2014; 20: 45–53.
- [7] Cáceres DH, Zuluaga A, Tabares ÁM, et al. Evaluation of a cryptococcal antigen Lateral Flow Assay in serum and cerebrospinal fluid for rapid diagnosis of cryptococcosis in Colombia. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2017; 59: e76.
- [8] Jarvis JN, Percival A, Bauman S, et al. Evaluation of a novel point-of-care cryptococcal antigen test on serum, plasma, and urine from patients with HIV-associated cryptococcal meningitis. *Clin Infect Dis* 2011; 53: 1019–1023.
- [9] WHO. *Guidelines for the diagnosis, prevention, and management of cryptococcal disease in HIV-infected adults, adolescents and children, March 2018: supplement to the 2016 consolidated guidelines of the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HI*. Geneva: World Health Organization <https://apps.who.int/iris/handle/10665/260399> (2018).
- [10] Lindsley MD, Mekha N, Baggett HC, et al. Evaluation of a newly developed Lateral Flow Immunoassay for the diagnosis of cryptococcosis. *Clin Infect Dis* 2011; 53: 321–325.
- [11] Chastain DB, Guarner J, Franco-Paredes C. Cryptococcal antigen negative meningoencephalitis in HIV/AIDS. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2017; 89: 143–145.

- [12] Kojima N, Chimombo M, Kahn DG. False-negative cryptococcal antigen test due to the postzone phenomenon. *AIDS* 2018; 32: 1201–1202.
- [13] Mahajan KR, Roberts AL, Curtis MT, et al. Diagnostic challenges of *Cryptococcus neoformans* in an immunocompetent individual masquerading as chronic hydrocephalus. *Case Rep Neurol Med* 2016; 2016: 1–7.
- [14] Opota O, Desgraz B, Kenfak A, et al. *Cryptococcus neoformans* meningitis with negative cryptococcal antigen: Evaluation of a new immunochromatographic detection assay. *New Microbes New Infect* 2015; 4: 1–4.
- [15] Navabi N, Montebatsi M, Scott M, et al. Case report: false negative serum cryptococcal latex agglutination test in a patient with disseminated cryptococcal disease. *J Int Assoc Provid AIDS Care* 2015; 14: 123–126.
- [16] Lourens A, Jarvis JN, Meintjes G, et al. Rapid diagnosis of cryptococcal meningitis by use of Lateral Flow Assay on cerebrospinal fluid samples: influence of the high-dose ‘hook’ effect. *J Clin Microbiol* 2014; 52: 4172–4175.
- [17] Kozel TR, Bauman SK. CrAg lateral flow assay for cryptococcosis. *Expert Opin Med Diagn* 2012; 6: 245–251.
- [18] Vidal JE, Boulware DR. 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* 2015; 57: 38–45.
- [19] Williams DA, Kiiza T, Kwizera R, et al. Evaluation of fingerstick cryptococcal antigen Lateral Flow Assay in HIV-infected persons: a diagnostic accuracy study: figure 1. *Clin Infect Dis* 2015; 61: 464–467.
- [20] Brizendine KD, Baddley JW, Pappas PG. Predictors of mortality and differences in clinical features among patients with cryptococcosis according to immune status. *PLoS One* 2013; 8: e60431.
- [21] Case Report Data. DOI: 10.6084/m9.figshare.7695545

Figures



Fig. 1: LFA test showing a positive reaction.

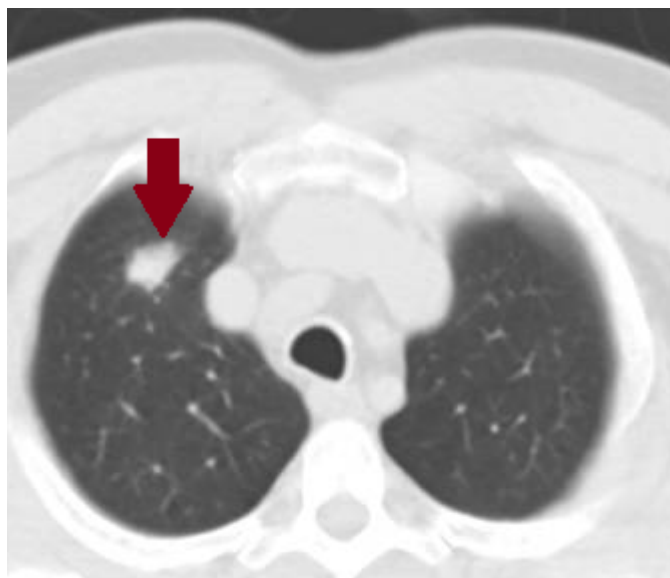


Fig. 2: Chest computed tomography image showing a 2.2 × 1.2 cm nodule.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo a prevalência de antígeno criptocócico em soro de indivíduos infectados pelo HIV, em fase avançada de imunossupressão, foi alta, não havendo associação com a presença de manifestações sistêmicas ou neurológicas. Demonstramos que 7,9% (IC95% 4,9-2,2) dos indivíduos com níveis de LT CD4 <200 céls/mL, tinham CrAg reagente no soro. De acordo com as recomendações da OMS, regiões com prevalências de CrAg superiores a 3% devem oferecer o rastreamento para criptococose, de forma abrangente e precoce (WHO, 2018). Ainda de acordo com a OMS, em regiões com alta prevalência de criptococose a triagem com CrAg é custo-efetiva, para a redução da morbidade e da mortalidade relacionadas com essa infecção. Cabe dizer que desta forma, a triagem com CrAg é custo-efetiva em nosso meio.

Destaca-se que o estudo foi conduzido em um centro de referência em doenças infecciosas, que assiste a maioria das pessoas vivendo com HIV, residentes em Goiás e, também de alguns estados vizinhos, o que contribuiu para a representatividade da amostra, na região Centro-Oeste do Brasil. Se considerarmos dados de aids notificados pelo HDT, em Goiânia, de 2011 a 2014 (n=2.333) e os casos avaliados em um estudo observacional durante o mesmo período (n=130) (BASTOS, 2017), a incidência aproximada de criptococose poderia ser estimada em 5,6%.

Dados sobre a prevalência de CrAg no Brasil variam de 2,6% na Região Norte – Pará (COSTA et al., 2013), 3,1% a 11,23% na Região Sudeste – São Paulo e Rio de Janeiro (FERREIRA, 2016; VIDAL et al., 2016), 8,2% na Região Nordeste - Piauí (MACHADO, 2015) e 13,9% no Centro-Oeste - Mato Grosso do Sul (NEGRI et al., 2017).

A única prevalência de CrAg encontrada até o momento na Região Centro-Oeste (Mato Grosso do Sul - 13,9%) foi igualmente alta e obtida na mesma população do nosso estudo (LT CD4 < 200 céls/mL). Entretanto, as comparações entre as regiões do país devem ser feitas com cuidado, levando em consideração o perfil de imunossupressão dos indivíduos recrutados, a presença ou não de sintomas sugestivos de criptococose e a utilização de antirretrovirais. Por exemplo, no estudo de Costa et al. (2013), se considerados apenas participantes com LT CD4 < 200, a

prevalência de CrAg seria 8,3%. No estudo de Vidal et al. (2016), se agrupados os pacientes sintomáticos e assintomáticos, a prevalência seria de 11,4%.

Não evidenciamos associação entre positividade ao CrAg e a presença ou ausência de sintomas neurológicos, possivelmente pelo reduzido número de participantes positivos em cada grupo. Vale ressaltar que, em se tratando de predominância de amostra ambulatorial, em geral, os recrutados não apresentavam suspeita clínica de neurocriptococose, excetuando-se o único caso em que foi diagnosticada meningoencefalite criptocócica, o qual queixava cefaleia, sonolência, vômitos e alteração visual.

No presente estudo a maioria dos indivíduos tinham antecedentes de uso de TARV e sinais ou sintomas compatíveis com aids. Esse perfil de morbidade também foi descrito em outros estudos conduzidos no Brasil e na Argentina (FERREIRA, 2016; VIDAL et al., 2016; FROLA et al., 2017; NEGRI et al., 2017). O antecedente de abandono de TARV e consequente baixa adesão é um importante fator que justifica a imunodepressão grave no momento da avaliação. Mesmo neste perfil de indivíduos, a estratégia de rastreamento com CrAg ainda é justificável, uma vez que a reativação de doença criptocócica tem como fator de risco a imunodepressão em si e o fator protetor relacionado à TARV somente seria relevante em contexto de boa adesão e supressão viral sustentada (BEYENE et al., 2013; FORD et al., 2018). A OMS, em seu guia, sugere a inclusão desta população na rotina de rastreamento com CrAg (WHO, 2018).

Em relação aos valores de CD4, não verificamos diferença entre os grupos ≤ 100 e maior que 100 até 200, o que fortalece a indicação de triagem de PVHA com um nível de LT CD4 maior (FORD et al., 2018; TEMFACK et al., 2019). Também não evidenciamos diferenças na positividade do CrAg em relação ao local de atendimento dos pacientes. Poderíamos supor que indivíduos atendidos ambulatoriamente estivessem em melhores condições clínicas e imunológicas e, portanto, tivessem menor prevalência de CrAg. Esses achados reforçam a indicação de triagem baseada em níveis de CD4, sem considerar manifestações clínicas.

Este é o primeiro estudo que documentou a prevalência de antigenemia criptocócica no Estado de Goiás, encontrando um valor alto e muito acima dos níveis esperados para que se justifique uma rotina de rastreamento antigênico. Fatores sócio demográficos, nível de imunodepressão, características clínicas e laboratoriais foram incapazes de prever a antigenemia criptocócica.

Apesar da alta acurácia do teste antigênico por LFA, a avaliação clínica criteriosa, a realização de culturas e o seguimento adequado são relevantes para uma melhor condução de indivíduos que foram rastreados pelo CrAg, visto que casos falso-negativos podem ocorrer e devem ser lembrados por quem assiste pacientes imunodeprimidos.

Até o momento, esta estratégia não se encontra uniformemente disponível na rotina do Sistema Único de Saúde brasileiro, incluindo as unidades de referência do estado de Goiás. Evidenciam-se necessárias, portanto, as programações de políticas de saúde que incorporem metodologias diagnósticas antigênicas, como o LFA ou a aglutinação em látex, para a identificação precoce de doença criptocócica e seu tratamento preemptivo. A alta mortalidade global, associada ao alto custo de internações por criptococose reforçam a relação de custo-efetividade do uso de metodologias antigênicas rápidas, de fácil acesso e sua implementação como rotina de rastreamento em pessoas vivendo com HIV e baixa contagem de LT CD4 em nosso meio.

Em conclusão, o rastreamento global de indivíduos vivendo com HIV e CD4 <200 céls/mL deve ser implementado na rotina de atendimento desta população. Desta forma, o rastreamento possibilitará o diagnóstico e o tratamento precoces da doença criptocócica, com redução das sequelas, da letalidade e dos custos associados à essa grave doença.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, P. A. D. F. et al. The epidemiology of cryptococcosis and the characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated in a Brazilian University Hospital. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 59, p. e13, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28423088>>.
- ALEMU, A. S. et al. High prevalence of Cryptococcal antigenemia among HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy in Ethiopia. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. e58377, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23469276>>.
- ANTINORI, S. New Insights into HIV/AIDS-Associated Cryptococcosis. **ISRN AIDS**, v. 2013, p. 471363, 2013.
- BAMBA, S. et al. Decreasing incidence of cryptococcal meningitis in West Africa in the era of highly active antiretroviral therapy. **AIDS**, v. 26, n. 8, p. 1039–1041, maio 2012. Disponível em: <<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00002030-201205150-00018>>.
- BARANDIARAN, L. L.; PAZ, J.; BUSTAMANTE, B. Cryptococcal antigenemia in Peruvian HIV-infected patients with a CD4 cell count < 100 cell/mm³. In: 18th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology 2012 (ISHAM2012), Berlim, Germany. **Anais...** Berlim, Germany: 2012.
- BARRETO DE OLIVEIRA, M. T. et al. *Cryptococcus neoformans* shows a remarkable genotypic diversity in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 1356–1359, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC356826/>>.
- BASTOS, A. L. de. **Aspectos clínicos-epidemiológicos da criptococose no estado de Goiás**. 2017. Universidade Federal de Goiás, 2017.
- BEARDSLEY, J. et al. Adjunctive Dexamethasone in HIV-Associated Cryptococcal Meningitis. **The New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 6, p. 542–554, 2016.
- BEYENE, T. et al. Comparison of cryptococcal antigenemia between antiretroviral naive and antiretroviral experienced HIV-positive patients at two hospitals in Ethiopia. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. e75585, 2013.
- BOEKHOUT, T. et al. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology**, v. 147, n. 4, p. 891–907, 2001. Disponível em: <<http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-147-4-891>>.
- BOULWARE, D. R. et al. Multisite validation of cryptococcal antigen lateral flow assay and quantification by laser thermal contrast. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 1, p. 45–53, 2014a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24378231>>.

BOULWARE, D. R. et al. Timing of antiretroviral therapy after diagnosis of cryptococcal meningitis. **The New England Journal of Medicine**, v. 370, n. 26, p. 2487–2498, 2014b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24963568>>.

BOWEN, L. N. et al. HIV-associated opportunistic CNS infections: pathophysiology, diagnosis and treatment. **Nature Reviews. Neurology**, v. 12, n. 11, p. 662–674, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27786246>>.

BRASIL. **Manual técnico para diagnóstico da infecção pelo HIV em adultos e crianças**. Brasília: Ministério da Saúde, 2016.

BRASIL. **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em adultos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2018.

BRIZENDINE, K. D.; BADDLEY, J. W.; PAPPAS, P. G. Predictors of mortality and differences in clinical features among patients with cryptococcosis according to immune status. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. e60431, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060431>>.

CDC; NIH; HIV MEDICINE ASSOCIATION. **Guidelines for the prevention and treatment of opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents**. Disponível em: <http://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/lvguidelines/adult_o.pdf>. Acesso em: 10 abr. 2018.

CHAMMARD, T. B. et al. Diagnostic and therapeutic strategies in cryptococcosis: impact on outcome. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 7, p. e180050, 2018. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762018000700207&nrm=iso>.

CHANG, C. C. et al. Clinical and mycological predictors of cryptococcosis-associated immune reconstitution inflammatory syndrome. **AIDS**, v. 27, n. 13, p. 2089–2099, ago. 2013. Disponível em: <<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00002030-201308240-00009>>.

CHAYAKULKEEREE, M.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 20, n. 3, p. 507–544, set. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16984867>>.

CHIPUNGU, C. et al. Feasibility and acceptability of cryptococcal antigen screening and prevalence of cryptocococemia in patients attending a resource-limited HIV/AIDS clinic in Malawi. **Journal of the International Association of Providers of AIDS Care**, v. 14, n. 5, p. 387–390, 2 set. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26139095>>.

COLOMBO, A. C.; RODRIGUES, M. L. Fungal colonization of the brain: anatomopathological aspects of neurological cryptococcosis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, n. 2 suppl, p. 1293–1309, 4 ago. 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-37652015000301293&lng=en&tlng=en>.

COSTA, M. M. da et al. Detection of *Cryptococcus neoformans* capsular antigen in HIV-infected patients in the state of Para in the North of Brazil. **Current HIV Research**, v. 11, n. 8, p. 647–51, dez. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24611754>>.

DROMER, F. et al. Epidemiology of HIV-associated cryptococcosis in France (1985–2001): comparison of the pre- and post-HAART eras. **AIDS**, v. 18, n. 3, p. 555–562, 2004. Disponível em: <https://journals.lww.com/aidsonline/Fulltext/2004/02200/Epidemiology_of_HIV_associated_cryptococcosis_in.24.aspx>.

DZOYEM, J. et al. Prevalence of cryptococcosis among HIV-infected patients in Yaounde, Cameroon. **African Health Sciences**, v. 12, n. 2, p. 129–133, 24 jul. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23056017>>.

ESHUN-WILSON, I. et al. Early versus delayed antiretroviral treatment in HIV-positive people with cryptococcal meningitis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 7, p. CD009012, 24 jul. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/14651858.CD009012.pub3>>.

FERREIRA, M. de F. **Prevalência de antigenemia criptocócica em pacientes HIV positivos com imunossupressão avançada acompanhados no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas**. 2016. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2016.

FIGUEIREDO, T. P. et al. ANTIFUNGAL SUSCEPTIBILITY TESTING AND GENOTYPING CHARACTERIZATION OF *Cryptococcus neoformans* AND *gattii* ISOLATES FROM HIV-INFECTED PATIENTS OF RIBEIRÃO PRETO, SÃO PAULO, BRAZIL. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 58, p. 69, 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652016005000253&lng=en&tng=en>.

FORD, N. et al. CD4 cell count threshold for cryptococcal antigen screening of HIV-infected individuals: a systematic review and meta-analysis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 66, n. suppl_2, p. S152–S159, 4 mar. 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29514236>>.

FRANCO-PAREDES, C. et al. Management of *Cryptococcus gattii* meningoencephalitis. **The Lancet. Infectious Diseases**, v. 15, n. 3, p. 348–355, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4481715/>>.

FRENCH, N. et al. Cryptococcal infection in a cohort of HIV-1-infected Ugandan adults. **AIDS**, v. 16, n. 7, p. 1031–1038, 2002.

FROLA, C. et al. Prevalence of cryptococcal infection among advanced HIV patients in Argentina using lateral flow immunoassay. **PLoS ONE**, v. 12, n. 6, p. e0178721, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28617817>>.

GALANIS, E. et al. Epidemiology of *Cryptococcus gattii*, British Columbia, Canada, 1999–2007. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 251–257, fev. 2010. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/eid/content/16/2/251.htm>>.

GRUPO DO CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE. Consenso em criptococose: 2008. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 5, p. 524–544, out. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822008000500022&lng=pt&tlng=pt>.

HAGEN, F. et al. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. **Fungal Genetics and Biology**, v. 78, p. 16–48, maio 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1087184515000328>>.

HAIJEH, R. A. et al. Cryptococcosis: population-based multistate active surveillance and risk factors in human immunodeficiency virus—infected persons. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 179, n. 2, p. 449–454, 1999. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1086/314606>>.

HORTA, J. A. et al. Epidemiological aspects of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. **Medical Mycology**, v. 40, n. 6, p. 565–571, jan. 2002. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/mmy.40.6.565.571>>.

HUANG, H. R. et al. Evaluation of a new cryptococcal antigen lateral flow immunoassay in serum, cerebrospinal fluid and urine for the diagnosis of cryptococcosis: a meta-analysis and systematic review. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, p. e0127117, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25974018>>.

IGREJA, R. P. et al. Molecular Epidemiology of *Cryptococcus Neoformans* Isolates from AIDS Patients of the Brazilian City, Rio de Janeiro. **Medical Mycology**, v. 42, n. 3, p. 229–238, jan. 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/13693780310001644743>>.

IMMY. **CrAg Lateral Flow Assay for the detection of cryptococcal antigen**. Disponível em: <<http://www.immy.com/products/cryptococcal-antigen-lateral-flow-assay-lfa/>>. Acesso em: 10 jan. 2018.

JARVIS, J. N. et al. Screening for cryptococcal antigenemia in patients accessing an antiretroviral treatment program in South Africa. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, n. 7, p. 856–862, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1086/597262>>.

JARVIS, J. N. et al. Evaluation of a novel point-of-care cryptococcal antigen test on serum, plasma, and urine from patients with HIV-associated cryptococcal meningitis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 53, n. 10, p. 1019–1023, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/cid/cir613>>.

JARVIS, J. N. et al. Cost effectiveness of cryptococcal antigen screening as a strategy to prevent HIV-associated cryptococcal meningitis in South Africa. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. e69288, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23894442>>.

JARVIS, J. N. et al. Determinants of mortality in a combined cohort of 501 patients with HIV-associated cryptococcal meningitis: implications for improving outcomes. **Clinical Infectious Diseases**, v. 58, n. 5, p. 736–745, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/cid/cit794>>.

JARVIS, J. N.; HARRISON, T. S. Forgotten but not gone: HIV-associated cryptococcal meningitis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 7, p. 756–758, 2016.

KAPLAN, J. E. et al. Cryptococcal antigen screening and early antifungal treatment to prevent cryptococcal meningitis: a review of the literature. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 68 Suppl 3, p. S331-9, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25768872>>.

KLAUSNER, J. D.; VIJAYAN, T.; CHILLER, T. Sensitivity and specificity of a new cryptococcal antigen lateral flow assay in serum and cerebrospinal fluid. **Medical Laboratory Observer**, v. 45, n. 3, p. 16–20, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4119400/>>.

KOZEL, T. R.; BAUMAN, S. K. CrAg lateral flow assay for cryptococcosis. **Expert Opinion on Medical Diagnostics**, v. 6, n. 3, p. 245–251, 19 maio 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1517/17530059.2012.681300>>. Acesso em: 15 ago. 2018.

KWON-CHUNG, K. J. A new species of *Filobasidiella*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans* B and C serotypes. **Mycologia**, v. 68, n. 4, p. 943–946, 1976.

KWON-CHUNG, K. J. et al. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. **Cold Spring Harb Perspectives in Medicine**, v. 4, n. 7, p. a019760, 2014.

KWON-CHUNG, K. J. et al. The case for adopting the “Species Complex” nomenclature for the etiologic agents of cryptococcosis. **mSphere**, v. 2, n. 1, p. e00357-16, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28101535>>.

LACAZ, C. S.; RODRIGUES, M. C. Sorotipagem do *Cryptococcus neoformans*. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 40, p. 297–300, 1983.

LARSON, B. A. et al. Screening HIV-infected patients with low CD4 counts for cryptococcal antigenemia prior to initiation of antiretroviral therapy: cost effectiveness of alternative screening strategies in South Africa. **PLoS ONE**, v. 11, n. 7, p. e0158986, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27390864>>.

LAZÉRA, M. S. et al. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in decaying wood forming hollows in living trees. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 34, n. 2, p. 127–131, 1996. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/02681219680000191>>.

LEAL, A. L. et al. Epidemiological profile of cryptococcal meningitis patients in Rio Grande do Sul, Brazil. **Mycopathologia**, v. 166, n. 2, p. 71–75, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18443922>>.

LIECHTY, C. A. et al. Asymptomatic Serum Cryptococcal Antigenemia and Early Mortality during Antiretroviral Therapy in Rural Uganda. **Tropical Medicine & International Health**, v. 12, n. 8, p. 929–935, 30 jun. 2007. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3156.2007.01874.x>>.

LIN, X.; HEITMAN, J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. **Annual Review of Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 69–105, 2006. Disponível em: <<https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.micro.60.080805.142102>>.

LINDENBERG, A. D. S. C. et al. Clinical and epidemiological features of 123 cases of cryptococcosis in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 50, n. 2, p. 75–78, abr. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652008000200002&nrm=iso>.

LOFGREN, S. et al. Recent advances in AIDS-related cryptococcal meningitis treatment with an emphasis on resource limited settings. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 15, n. 4, p. 331–340, 3 abr. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28111998>>.

MACHADO, H. A. da S. **Prevalência do antígeno criptocócico utilizando Lateral Flow Assay (LFA) no screening de pacientes com HIV/AIDS**. 2015. Rio de Janeiro, 2015.

MARTINS, M. A. et al. Molecular diversity of serial *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients in the city of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 7, p. 777–784, nov. 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762007000700001&nrm=iso>.

MAY, R. C. et al. *Cryptococcus*: From Environmental Saprophyte to Global Pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 2, p. 106–117, 21 fev. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26685750>>.

MAZIARZ, E. K.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 1, p. 179–206, mar. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5808417/>>.

MEYA, D. et al. Preventing cryptococcosis-shifting the paradigm in the era of highly active antiretroviral therapy. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 2, n. 2, p. 81–89, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25960942>>.

MEYA, D. B. et al. Cost-effectiveness of serum cryptococcal antigen screening to prevent deaths among HIV-infected persons with a CD4+ cell count < or = 100 cells/microL who start HIV therapy in resource-limited settings. **Clinical Infectious Diseases**, v. 51, n. 4, p. 448–455, 15 ago. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20597693>>.

MFINANGA, S. et al. Cryptococcal meningitis screening and community-based early adherence support in people with advanced HIV infection starting antiretroviral therapy in Tanzania and Zambia: an open-label, randomised controlled trial. **The Lancet**, v. 385, n. 9983, p. 2173–2182, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673615601647>>.

MICOL, R. et al. Cost-effectiveness of primary prophylaxis of AIDS associated cryptococcosis in Cambodia. **PLoS One**, v. 5, n. 11, p. e13856, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21085478>>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Sinan - Sistema de Informação de Agravos de Notificação**. Disponível em: <http://portalweb04.saude.gov.br/sinan_net/default.asp>. Acesso em: 15 mar. 2018.

MITCHELL, T. G.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis in the era of AIDS-100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, n. 4, p. 515–548, 1995.

MOLLOY, S. F. et al. Antifungal combinations for treatment of cryptococcal meningitis in Africa. **New England Journal of Medicine**, v. 378, n. 11, p. 1004–1017, 15 mar. 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29539274>>.

MORALES, B. P. **In vitro susceptibility of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* against antifungal drugs by flow cytometry**. 2009. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2009.

NEGRI, A. C. G. et al. Lateral Flow Assay in the early diagnosis of cryptococcosis in severely immunosuppressed AIDS-patients from the Midwest Region of Brazil. In: 10th International Conference on Cryptococcus and Cryptococcosis (ICCC), Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: ICC, 2017.

NUNES, J. O. et al. Cryptococcal Meningitis Epidemiology: 17 Years of Experience in a State of the Brazilian Pantanal. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, n. 4, p. 485–492, 2018.

OHKUSU, M. et al. 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, n. 6, p. 299–302, dez. 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652002000600001&nrm=iso>.

OYELLA, J. et al. Prevalence and factors associated with cryptococcal antigenemia among severely immunosuppressed HIV-infected adults in Uganda: a cross-sectional study. **Journal of the International AIDS Society**, v. 15, n. 1, p. 15, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22417404>>.

PAPPALARDO, M. C. S. M. ; PASCHOAL, R. C. ; MELHEM, M. S. C. AIDS-associated central nervous system cryptococcosis: a Brazilian case study. **AIDS**, v. 21, n. 14, p. 1971–1972, 2007.

PAPPALARDO, M. C. S. M.; MELHEM, M. S. C. Cryptococcosis: a review of the brazilian experience for the disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, n. 6, p. 299–305, dez. 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652003000600001&nrm=iso>.

PARK, B. J. et al. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. **AIDS**, v. 23, n. 4, p. 525–530, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19182676>>.

PELFREY, J.; BAUMAN, S. **CrAg LFA: the new gold standard for diagnosis and prevention of cryptococcal disease**. Disponível em: <<http://www.immy.com>>. Acesso em: 15 jul. 2018.

PERFECT, J. R. et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, n. 3, p. 291–322, fev. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20047480>>.

PERFECT, J. R. Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii. In: BENNETT, J. E.; DOLIN, R.; BLASER, M. J. (Ed.). **Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases**. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2015. p. 934–948.

PERFECT, J. R.; CASADEVALL, A. Cryptococcosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 16, n. 4, p. 837–74, v–vi, dez. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12512184>>.

PETER, G. P. Managing cryptococcal meningitis is about handling the pressure. **Clinical Infectious Diseases**, v. 40, n. 3, p. 480–482, 1 fev. 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1086/427222>>.

PONGSAI, P.; ATAMASIRIKUL, K.; SUNGKANUPARPH, S. The role of serum cryptococcal antigen screening for the early diagnosis of cryptococcosis in HIV-infected patients with different ranges of CD4 cell counts. **Journal of Infection**, v. 60, n. 6, p. 474–477, jun. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20347868>>.

RAJASINGHAM, R. et al. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 8, p. 873–881, 2017.

RAJASINGHAM, R.; MEYA, D. B.; BOULWARE, D. R. Integrating cryptococcal antigen screening and pre-emptive treatment into routine HIV care. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 59, n. 5, p. 85–91, abr. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22410867>>.

RAKSHA, G.; SINGH, G. Cryptococcal meningitis: epidemiology and laboratory diagnosis. **International Journal of Universal Pharmacy and Bio Sciences**, v. 2, n. 5, p. 234–241, 2013. Disponível em: <https://www.researchgate.net/figure/Mode-of-transmission-of-C-neoformans_fig1_301357731>.

RAMÍREZ, B. C. et al. Outcomes of HIV-positive patients with cryptococcal meningitis in the Americas. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 63, p. 57–63, out. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28807740>>.

REIS-FILHO, J. B. et al. O líquido cefalorraquiano inicial nas meningoencefalites por *Cryptococcus neoformans*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 27, p. 173–178, 1985.

RHEIN, J. et al. Efficacy of adjunctive sertraline for the treatment of HIV-associated cryptococcal meningitis: an open-label dose-ranging study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 7, p. 809–818, 2016.

ROLFES, M. A. et al. The Effect of Therapeutic Lumbar Punctures on Acute Mortality from Cryptococcal Meningitis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 59, n. 11, p. 1607–1614, 1 dez. 2014. Disponível em: <<https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1093/cid/ciu596>>.

RUGEMALILA, J. et al. Cryptococcal antigen prevalence in HIV-infected Tanzanians: a cross-sectional study and evaluation of a point-of-care Lateral Flow Assay. **Tropical Medicine & International Health**, v. 18, n. 9, p. 1075–1079, set. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23937699>>.

SABITI, W.; MAY, R. C. Mechanisms of infection by the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Future Microbiology**, v. 7, n. 11, p. 1297–1313, nov. 2012. Disponível em: <<https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/fmb.12.102>>.

SCRIVEN, J. E.; LALLOO, D. G.; MEINTJES, G. Changing epidemiology of HIV-associated cryptococcosis in sub-Saharan Africa. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 8, p. 891–892, 2016.

SLOAN, D.; PARRIS, V. Cryptococcal meningitis: epidemiology and therapeutic options. **Clinical Epidemiology**, v. 6, p. 169–182, maio 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24872723>>.

SOARES, E. A. **Mortalidade por criptococose no Brasil (2000 a 2012)**. 2015. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2015.

SOUZA, L. K. H. et al. Antifungal susceptibilities of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* in Goiânia city, Goiás, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 47, n. 5, p. 253–256, out. 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652005000500003&nrm=iso>.

SOUZA, L. K. H. e et al. Clinical and microbiological features of cryptococcal meningitis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, p. 343–347, 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822013000300343&nrm=iso>.

SRICHATRAPIMUK, S.; SUNGKANUPARPH, S. Integrated therapy for HIV and cryptococcosis. **AIDS Research and Therapy**, v. 13, n. 1, p. 42, 29 dez. 2016. Disponível em: <<http://aidsrestherapy.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12981-016-0126-7>>.

SSEBAMBULIDDE, K. et al. Symptomatic cryptococcal antigenemia presenting as early cryptococcal meningitis with negative cerebral spinal fluid analysis. **Clinical Infectious Diseases**, p. ciy817, 25 set. 2018. Disponível em: <<https://academic.oup.com/cid/advance-article/doi/10.1093/cid/ciy817/5106758>>.

TEMFACK, E. et al. Impact of Routine Cryptococcal Antigen Screening and Targeted Preemptive Fluconazole Therapy in Antiretroviral-Naive Human Immunodeficiency Virus-infected Adults with CD4 Cell Counts <100/ML: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 68, n. 4, p. 688–698, 1 fev. 2019. Disponível em: <<https://academic.oup.com/cid/article/68/4/688/5055339>>.

TENFORDE, M. W. et al. HIV-Associated Cryptococcal Meningitis: Bridging the Gap Between Developed and Resource-Limited Settings. **Curr Clin Microbiol Rep**, v. 3, p. 92–102, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27257597>>.

TENFORDE, M. W. et al. Treatment for HIV-associated cryptococcal meningitis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 7, 25 jul. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/14651858.CD005647.pub3>>.

TRILLES, L. et al. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 5, p. 455–462, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762008000500008&nrm=iso>.

UNAIDS. **Data Sheet 2017**. Disponível em: <<http://aidsinfo.unaids.org/>>. Acesso em: 6 jun. 2018.

UNICAMP. **Pesquisa de *Cryptococcus neoformans* no líquido com tinta da China**. Disponível em: <<http://anatpat.unicamp.br/bineucryptococose.html>>. Acesso em: 4 nov. 2018.

VIDA, J. E.; BOULWARE, D. R. Lateral Flow Assay for cryptococcal antigen: an important advance to improve the continuum of HIV care and reduce cryptococcal meningitis-related mortality. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. suppl 19, p. 38–45, set. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26465368>>.

VIDAL, J. E. et al. Role of Quantitative CSF Microscopy to Predict Culture Status and Outcome in HIV-Associated Cryptococcal Meningitis in a Brazilian Cohort. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 73, n. 1, p. 68–73, maio 2012. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0732889312000363>>.

VIDAL, J. E. et al. Strategies to reduce mortality and morbidity due to AIDS-related cryptococcal meningitis in Latin America. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 3, p. 353–362, maio 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23665012>>.

VIDAL, J. E. et al. Asymptomatic cryptococcal antigen prevalence detected by lateral flow assay in hospitalised HIV-infected patients in Sao Paulo, Brazil. **Trop Med Int Health**, v. 21, n. 12, p. 1539–1544, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27699970>>.

WHO. **Rapid advice: diagnosis, prevention and management of cryptococcal disease in HIV-infected adults, adolescents and children**. Geneva: World Health Organization, 2011.

WHO. **Guidelines for the diagnosis, prevention, and management of cryptococcal disease in HIV-infected adults, adolescents and children, March 2018: supplement to the 2016 consolidated guidelines of the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HI**. Geneva: World Health Organization, 2018.

WILLIAMS, D. A. et al. Evaluation of fingerstick cryptococcal antigen Lateral Flow Assay in HIV-infected persons: a diagnostic accuracy study: figure 1. **Clinical Infectious Diseases**, v. 61, n. 3, p. 464–467, 1 ago. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25838287>>.

WILLIAMSON, P. R. et al. Cryptococcal meningitis: epidemiology, immunology, diagnosis and therapy. **Nature Reviews Neurology**, v. 13, n. 1, p. 13–24, 25 jan. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27886201>>.

APÊNDICES

Apêndice A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prevalência de Detecção do Antígeno Criptocócico em Soro de Pacientes Infectados pelo HIV com Imunodepressão Grave

Nome do pesquisador responsável: Dra. Moara Alves Santa Bárbara Borges

Nome do Participante: _____
Nome do Responsável: _____
RG: nº _____ CD4: _____ / data _____ Idade: _____
Prontuário HDT: _____ DN: _____
Telefones para contato: _____

O(a) Sr. (a), está sendo convidado(a) a participar do estudo “Prevalência de Detecção do Antígeno Criptocócico em Soro de Pacientes Infectados pelo HIV com Imunodepressão Grave em um hospital de referência em Goiânia”, aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa sob o nº 1.016.288 e de responsabilidade dos pesquisadores Moara Alves Santa Bárbara Borges, Cassia Miranda De Godoy, Renata De Bastos Ascenço Soares, Angélica Lima de Bastos Chagas, João Alves Araújo Filho, Marília Turchi.

Por favor, leia este documento com bastante atenção antes de assiná-lo. Caso haja alguma palavra ou frase que o (a) senhor (a) não consiga entender, converse com o pesquisador responsável pelo estudo ou com um membro da equipe desta pesquisa para esclarecê-lo. Caso o paciente não tenha condições de ler e/ou compreender este TCLE, o mesmo poderá ser assinado e datado por um membro da família ou responsável legal pelo paciente.

Este estudo será realizado no Hospital de Doenças Tropicais - Anuar Auad (HDT/HAA), com a aprovação da sua Diretoria e da Secretaria Estadual de Saúde e segue as recomendações da resolução 466/12, do Conselho Nacional de Saúde (CNS), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição antes de sua aplicação.

O (a) Senhor (a) foi convidado (a) a participar do estudo porque teve diagnóstico de HIV e tem provavelmente uma deficiência grave do sistema de defesa, medido pela quantidade de células CD4. Estando seu CD4 menor que 200, há uma maior chance de adoecer por doenças graves, entre elas uma infecção causada por fungos, como o *Cryptococcus*. 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. Mas quando chega ao sistema nervoso central (cérebro), causa uma meningite grave, com óbitos em 30%-60% dos casos. Descobrir quando ainda não há sintomas é muito importante para que o tratamento comece logo, diminuindo assim a chance de complicações, inclusive morte.

O Objetivo do estudo é verificar quantas pessoas com hiv e deficiência grave de imunidade apresentam exame de teste rápido positivo no sangue para partes do fungo *Cryptococcus* (Teste CRAG – Antígeno Criptocócico) a fim de viabilizar o tratamento mais precoce.

Após entender e concordar em participar, serão realizados: - a entrevista para coleta de dados; - coleta de 2ml de sangue através de punção venosa periférica (tirar sangue do braço) durante a coleta de demais exames pedidos por seu médico; - o sangue será usado para fazer o teste rápido (antigenemia criptocócica – CRAG); - caso seja positivo, serão necessários exames mais detalhados para diagnosticar a doença, entre eles, a realização de punção lombar para coleta de líquido (o líquido que passa dentro da coluna e que envolve o cérebro e a medula), para assim procurar pelo fungo causador da doença; - caso seja julgado necessário, previamente à punção lombar, será realizada uma tomografia de crânio; - se confirmada a doença, será proposto por seu médico assistente o tratamento, conforme rotina do HDT.

- punção de líquido: você estará deitado em uma maca, de lado, com as pernas e a cabeça o mais próximo possível do tórax/peito (posição fetal, como o bebê dentro da barriga). Será administrada anestesia na pele e inserida uma agulha na região da coluna lombar para a coleta do líquido. Você permanecerá em repouso por 20-40 minutos, deitado. Deverá ingerir grande quantidade de líquidos, entre eles os que tem cafeína (café, chá).

Os resultados de exames serão disponibilizados ao seu médico assistente e a você, caso queira uma cópia, para ajudar na decisão sobre o tratamento, que deverá ser feito internado.

Riscos associados à coleta de sangue incluem: dor, equimoses, hematoma (roxos na pele) ou outro desconforto no local da coleta. Raramente desmaio ou infecções no local de punção podem ocorrer. Cuidados serão tomados para minimizar esses riscos como: limpeza no local antes da punção; pressionar o local por 3-5 minutos; evitar pegar peso neste braço.

Riscos associados à punção lombar para coleta de líquido: realizada corretamente, a punção lombar quase não apresenta riscos. Como a quantidade de líquido retirado é muito pequena (alguns mililitros), isso não chega a causar repercussões no cérebro ou na medula. Mesmo realizada da forma correta, pode ocorrer uma dor no local da punção ou uma dor de cabeça, ambas temporárias. Sangramento é a complicação imediata mais frequente das punções. Em geral, estes sangramentos são discretos e não exigem cuidados especiais.

O benefício para os participantes é que, utilizando um teste rápido para Antígeno criptocócico (como o LFA CrAg), a doença pode ser detectada na fase inicial, quando não há sintomas, permitindo o tratamento precoce efetivo, reduzindo assim os riscos de doença e morte.

Você não receberá compensação de nenhuma forma, incluindo financeira, para participar desta pesquisa e também não terá nenhuma despesa adicional. O transporte às consultas seguirá rotina das demais consultas ambulatoriais (próprio ou via unidade de origem).

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.

Todas as informações referentes aos participantes do estudo são confidenciais, isto é, não podem ser divulgadas com os nomes das pessoas. 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. As informações obtidas através da ficha de coleta de dados e TCLE permanecerão sobre responsabilidade dos pesquisadores por um período de até 5 anos, podendo ser utilizadas em projetos secundários vinculados à Rede Criptococose Brasil, em subprojeto de Mestrado da pesquisadora Moara Alves Santa Bárbara Borges e publicações científicas realizadas pelo grupo de pesquisadores. As amostras de sangue obtidas serão usadas exclusivamente para os intuítos previstos neste protocolo, sendo descartadas após realização do teste CRAG (antígeno criptocócico).

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 tratamentos.

Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), não relacionados dentre os esperados em vigência da doença, o participante tem direito a tratamento médico na Instituição.

Quaisquer dúvidas podem ser tiradas com os pesquisadores responsáveis pela pesquisa nos telefones fornecidos neste termo. Em qualquer etapa do estudo você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os responsáveis pelo estudo nesta instituição são

- **Moara Alves Santa Bárbara Borges: celular(62)8628-6606/ trabalho: 3201-3666**

- João Alves Araújo Filho: celular(62)8161-6999

- Cassia de Miranda Godoy: celular (62)96873001

Comitê de Ética em Pesquisa HDT: Telefone (62) 3201-3621

Recebi uma cópia deste termo de consentimento e concordo em participar:

Nome do participante (letra legível)

Data ____/____/____

Assinatura do responsável

Nome do Pesquisador (letra legível)

____/____/____
Data

Nome de quem coletou o TCLE - se não o pesquisador (letra legível)

____/____/____
Data

Apêndice B - Ficha Clínica

FICHA DE COLETA DE DADOS PROJETO CRAG									
NOME									
DN	__/__/__	IDADE (ANOS)	SEXO		1. M		2. F		
PRONTUÁRIO		RG OU CPF							
NATURALIDADE		ESTADO		NACIONALIDADE		1. BRA		2. OUTRO	
DATA ENTRADA NO ESTUDO		__/__/__							
LOCAL DE ENTRADA NO ESTUDO		1. AMBULATÓRIO		2. ENFERMARIA		3. PS/EMERGÊNCIA		4. OUTRO	
SINTOMAS SISTÊMICOS (PODE MAIS DE 1)		1. SIM		2. NÃO					
		1. FEBRE		2. PERDA DE PESO					
		3. DIARRÉIA		4. SINTOMAS PULMONARES					
		5. LESÕES DE PELE		6. FRAQUEZA/ASTENIA					
		7. MONILÍASE ORAL		8. OUTROS					
SINTOMAS NEUROLÓGICOS (NO MOMENTO DA PESQUISA, PODE MAIS DE 1)		1. SIM		2. NÃO					
QUAIS	1. CEFALÉIA		2. CONVULSÕES		3. SONOLÊNCIA				
	4. CONFUSÃO MENTAL		5. HEMIPARESIA		6. PARAPARESIA				
	7. ALTERAÇÃO ESFINCTERIANA		8. PARESTESIAS		9. DISESTESIAS				
	10. ALTERAÇÃO VISUAL		11. ALTERAÇÃO AUDITIVA		12. ALTERAÇÃO DE MEMÓRIA				
	13. DISARTRIA		14. TONTURA/VERTIGEM		15. OUTROS				
ANTECEDENTES OUTROS		1. SIM		2. NÃO		3. NÃO SABE INFORMAR/IGNORADO			
DIAGNÓSTICO PRÉVIO DE HIV		DATA OU HÁ QUANTO TEMPO		__/__/__					
JÁ TEVE DOENÇA OPORTUNISTA ASSOCIADA AO HIV?		1. SIM		2. NÃO					
PODE MAIS DE 1		DATA		DATA 3. NÃO SABE INFORMAR/IGNORADO		DATA			
1. TB DISSEMINADA		2. CANDIDÍASE ORAL/ LEUCOPLASIA		3. PNEUMOCISTOSE					
4. HISTOPLASMOSE		5. TB PULMONAR		6. HERPES ZOSTER					
7. TOXOPLASMOSE SNC		8. CMV		9. DISFUNÇÃO DO SNC					
10. DIARRÉIA POR MAIS DE 1 Mês		11. PERDA DE PESO/CAQUEXIA		12. ASTENIA > 1 Mês					
13. DERMATITE PERSISTENTE		14. ANEMIA/LINFOPENIA/PLAQUETOPENIA		15. TOSSE PERSISTENTE OU PNM					
16. LINFADENOPATIA > 1CM		17. SARCOMA DE KAPOSÍ							
OUTRAS:									
CD4+ MAIS PRÓXIMO DA COLETA		ABSOLUTO		PORCENTAGEM		DATA			
CARGA VIRAL		ABSOLUTO		LOG		DATA			
NADIR DE CD4+		ABSOLUTO		PORCENTAGEM		DATA			
INICIOU TARV		1. SIM		2. NÃO		DATA DO 1º ARV NO CICLO		RETIROU NOS ÚLTIMOS 3 M?	
ESTÁ EM ABANDONO?		1. SIM		2. NÃO		REINICIOU QUANDO?		1. SIM 2. NÃO	
USO REGULAR		1. SIM		2. NÃO		DATA DA ÚLTIMA RETIRADA		DATA:	
EXAMES LABORATORIAS (DATA MAIS PRÓXIMA À ENTRADA)									
HB		HT		LEUCO		PLAQUETAS			
URÉIA		CREAT		NA		K			
PROT T		ALBUMINA		GLOBULINA					
RESULTADO DO ANTÍGENO CRIPTOCÓCICO SÉRICO		1. REAGENTE		2. NÃO REAGENTE		3. INDETERMINADO			
Se positivo, coletar LCR e fazer CrAg – preencher próxima ficha									
HEMOCULTURA PARA FUNGOS COLETADA						DATA			
1. NEGATIVA		2. POSITIVA PARA CRYPTOCOCCUS		3. POSITIVA PARA HISTOPLASMA					
		4. POSITIVA PARA CANDIDA		5. POSITIVA PARA BACTÉRIA					
OUTROS EXAMES RELEVANTES									
DESFECHO		1. em seguimento		2. abandono, perda de seguimento, ignorado		3. óbito no HDT			

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

Resultados de punção lombar	LCR 1 (primeiro)	LCR 2	LCR 3	LCR 4	LCR 5	LCR 6	LCR 7 (último)
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: ____/____/____

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

Neurológicos: Meningite criptocócica () outro/s: _____
 Não Neurológicos: Fungemia criptocócica() outros: _____

d- Tratamento recebido: Indução: Anfotericina: dose/dia: _____, Dias: _____, Dose Acumulada

Fluconazol: dose/dia: _____, Dias/semanas: _____,

Consolidação: dose/dia: _____, Dias/semanas: _____,

Manutenção: dose/dia: _____, Dias/semanas: _____,

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):

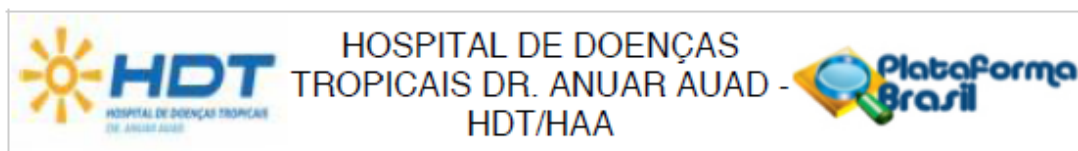
(melhor) (igual) (pior) (seqüela).

Especificar: _____

f-Desfecho: (alta) (perda de seguimento) (óbito). Causa direta do óbito: _____ Data: ____/____/____

ANEXOS

Anexo A – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: PROJETO CRAG/RBC GOIÂNIA - Antigenemia Criptocócica em Pacientes Infectados por HIV com Imunossupressão Grave em um hospital de referência em Goiânia.

Pesquisador: MOARA ALVES SANTA BARBARA BORGES

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 42429715.5.0000.0034

Instituição Proponente: Hospital Dr. Anuar Auad / HDT

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE GOIÁS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.413.098

Apresentação do Projeto:

Antigenemia Criptocócica em Pacientes Infectados por HIV com Imunossupressão Grave em um hospital de referência em Goiânia.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo é determinar a prevalência de antigenemia criptocócica em pacientes HIV positivos com CD4 menor que 200 células/mm³, em um Centro de Referência em Goiânia.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos associados à coleta de sangue. Cuidados serão tomados para minimizar esses riscos.

Riscos associados à punção lombar para coleta de líquido: realizada corretamente, a punção lombar quase não apresenta riscos. Como a quantidade de líquido retirado é muito pequena (alguns mililitros), isso não chega a causar repercussões no cérebro ou na medula. Mesmo com uma técnica perfeita, pode ocorrer uma dor no local da punção ou uma dor de cabeça, ambas temporárias. Sangramento é a complicação imediata mais frequente das punções. Em geral, estes sangramentos são discretos e não exigem cuidados especiais.

Benefícios:

Considerando-se a gravidade da doença criptocócica, com mortalidade que pode atingir 30-60% dos casos quando a meningoencefalite está presente, a utilização do teste rápido para Antígeno criptocócico (LFA CrAg) pode contribuir para a detecção na fase inicial, subclínica, permitindo

Endereço: Av. Contorno 3556
Bairro: Jardim Bela Vista **CEP:** 74.853-120
UF: GO **Município:** GOIANIA
Telefone: (62)3201-3621 **Fax:** (62)3201-3620 **E-mail:** cep.hdt@isgsaude.org



Continuação do Parecer: 2.413.098

investigação e tratamento precoces, com redução de morbimortalidade.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Emenda que solicitou inclusão de fomento público, alteração em equipe executora, atualização de cronograma, cálculo amostral, atualização de critérios de inclusão e exclusão, alterações na metodologia de coleta de dados e convocação dos pacientes elegíveis ao estudo, atualização de apêndices e inclusão do exame de LFA da Immuno-Mycologics Inc, Norman, Oklahoma, adquirido pelo pesquisador, com financiamento de pesquisa. (FAPEG PPP-2016)

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os documentos de apresentação obrigatória estão de acordo com a Res 466/12 e Norma Operacional 001/13.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A pendência foi devidamente esclarecida: ao concordar em participar da pesquisa o paciente será esclarecido sobre a ligação telefônica caso o CD4 <200 células.

Projeto sem inadequações ou pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Após avaliação do protocolo acima descrito, o presente comitê não encontrou óbices quanto ao desenvolvimento do estudo em nossa Instituição e poderá ser iniciado a partir da data deste parecer.

Obs.: 1 - O pesquisador responsável deve encaminhar à este CEP, Relatórios de Andamento dos Projetos desenvolvidos no HDT/HAA. Relatórios Parciais (pesquisas com duração superior à 6 meses), Relatórios Finais (ao término da pesquisa) e os Resultados Obtidos (cópia da publicação).

2 - Para o início do projeto de pesquisa, o investigador deverá apresentar a chefia do serviço (onde será realizada a pesquisa), o Parecer Consubstanciado de aprovação do protocolo pelo Comitê de Ética local.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_874967	25/10/2017		Aceito

Endereço: Av. Contorno 3556

Bairro: Jardim Bela Vista

CEP: 74.853-120

UF: GO

Município: GOIANIA

Telefone: (62)3201-3621

Fax: (62)3201-3620

E-mail: cep.hdt@isgsaude.org

Continuação do Parecer: 2.413.098

Básicas do Projeto	E1.pdf	10:44:07		Aceito
Outros	adendoRespostaEmenda181017.pdf	25/10/2017 10:42:39	MOARA ALVES SANTA BARBARA BORGES	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETOCRAG2017.pdf	20/07/2017 13:16:46	MOARA ALVES SANTA BARBARA BORGES	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	EmendaProjetoCRAG.pdf	20/07/2017 13:00:16	MOARA ALVES SANTA BARBARA BORGES	Aceito
Outros	LattesRenataSoares.pdf	20/07/2017 12:57:50	MOARA ALVES SANTA BARBARA BORGES	Aceito
Outros	LattesBruno.pdf	20/07/2017 12:57:09	MOARA ALVES SANTA BARBARA BORGES	Aceito
Outros	LattesMTurchi.pdf	20/07/2017 12:56:45	MOARA ALVES SANTA BARBARA BORGES	Aceito
Outros	autorização laboratório.pdf	03/04/2015 11:53:50		Aceito
Outros	autorização ambulatorio.pdf	03/04/2015 11:53:14		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	autorização DEAM.pdf	03/04/2015 11:50:30		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE final.pdf	03/04/2015 11:43:21		Aceito
Declaração de Pesquisadores	documentos projeto.pdf	03/04/2015 11:43:00		Aceito
Folha de Rosto	folha de rosto crag2015.pdf	25/02/2015 16:14:11		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

GOIANIA, 04 de Dezembro de 2017

Assinado por:

 Patricia Moreira de Araújo Lisbôa
(Coordenador)

Endereço: Av. Contorno 3556

Bairro: Jardim Bela Vista

CEP: 74.853-120

UF: GO

Município: GOIANIA

Telefone: (62)3201-3621

Fax: (62)3201-3620

E-mail: cep.hdt@isgsaude.org