

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE CRIPTOCOCOSE EM INDIVÍDUOS IMUNODEPRIMIDOS

Murilo Barros Silveira¹
Aldenira Matias de Moura¹
Iohanne Carvalho de Sousa²
Hânstter Hallison Alves Rezende³

RESUMO: A criptococose é uma micose sistêmica de caráter oportunista, ocasionada pelo fungo do gênero *Cryptococcus spp.* Com o surgimento da AIDS, a criptococose tornou-se uma das infecções sistêmicas mais comuns entre os indivíduos HIV positivos, devido a queda da imunidade desses pacientes. Assim, o objetivo do presente estudo foi descrever os métodos de diagnóstico laboratorial de criptococose em indivíduos imunodeprimidos. A pesquisa enquadra-se em um estudo de levantamento bibliográfico descritivo. A coleta de dados foi realizada a partir das bases de dados SCIELO, PUBMED e MINISTÉRIO DA SAÚDE. A busca foi conduzida utilizando-se as palavras-chaves e descritores: criptococose; pacientes HIV-positivos; diagnóstico; epidemiologia. O diagnóstico laboratorial é realizado através do exame direto que consiste na identificação das cápsulas da leveduras no microscópio óptico. Pode-se realizar cultura do microrganismo em Ágar Sabouraud e Mycosel. A sorologia é realizada através da pesquisa do antígeno como: teste de aglutinação de latex e o imunoensaio ligado à enzima (ELISA). Exames histopatológicos pode ser útil devido a formação de lesões diferentes, testes bioquímicos também pode ser utilizados como o meio L-canavanina-glicina-azul de bromotimol. A PCR é uma das técnicas mais utilizadas devido a maior sensibilidade e especificidade superiores à cultura e ao exame direto. As características morfológicas do microrganismo no espécime clínico ou na cultura, quando observadas atentamente, podem direcionar a identificação do microrganismo o mais rápido possível, fazendo que ocorra uma administração dos medicamentos para o tratamento da infecção. A suspeita clínica e os dados clínicos do paciente permitem agilizar os procedimentos laboratoriais, permitindo a utilização de meios de cultura seletivos e/ou diferenciais, incubação em temperatura adequada e realização de provas de identificação direcionadas.

Palavras chave: Criptococose. Imunodeprimidos. Diagnóstico Laboratorial.

ABSTRACT: Cryptococcosis is an opportunistic systemic mycosis, caused by the fungus of the genus *Cryptococcus spp.* With the onset of AIDS, cryptococcosis has become one of the most common systemic infections among those available. HIV-positive patients due to a drop in patients' immunity. The research fits into a descriptive bibliographic survey. A data collection was performed in the databases SCIELO, PUBMED and MINISTRY OF HEALTH. The search was conducted using keywords and descriptors: cryptococcosis; HIV-positive; diagnosis; epidemiology. The laboratory diagnosis is made through the direct examination consisting of the identification of the yeast capsules in the optical microscope. The culture of the microorganism can be carried out in Sabouraud and Mycosel Agar. An analysis by means of antigen search: latex agglutination test and enzyme linked immunoassay (ELISA). Histopathological examinations may be useful due to the formation of different lesions, biochemical testes can also be used as the B-canavanine-glycine

¹ Universidade Federal de Goiás – UFG- Goiânia – GO - Rua 235, S/N, Setor Leste Universitário. CEP: 74605050. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública. Endereço para Correspondência: Murilo_bsilveira@hotmail.com

² Pontifícia Universidade Católica de Goiás – PUC-GOÍÁS- Goiânia-GO, Av. Universitária, 1.440, Setor Leste Universitário. CEP: 74175-120

³ Universidade Federal de Goiás – UFG- Jataí – GO - R. Riachuelo, 1530 - Setor Samuel Graham. CEP: 75804-020.

blue-bromothymol medium. PCR is one of the most sought after techniques for greater sensitivity and specificity than culture and direct examination. As morphological features of the non-specific clinical or cultured microorganism, when observed closely, they may direct the identification of the microorganism as soon as possible, causing administration of the drugs to treat the infection. A clinical suspicion and clinical data of the patient, in addition to streamlining laboratory procedures, allow the use of selective and / or differential culture media, incubation at adequate temperature and conducting targeted identification tests.

Key words: Cryptococcosis; Immunodepressed; Laboratory Diagnosis.

1 INTRODUÇÃO

A criptococose é uma micose sistêmica de caráter oportunista, ocasionada pelo fungo do gênero *Cryptococcus spp.*, a infecção ocorre através da inalação de propágulos e leveduras desidratadas (SILVA, 2009), podendo manifestar-se através da colonização assintomática, porém pode ocorrer infecção pulmonar e até casos de meningite fatal (MINISTÉRIO, 2012).

O gênero deste fungo consiste em duas espécies patogênicas ao ser humano: *C. neoformans* que no meio ambiente são encontradas leveduras em dejetos de aves como os pombos e o *C. gattii*, associados principalmente com florestas de eucaliptos. (QUEIROZ et al., 2008; BARBOSA et al., 2013). Com o surgimento da AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Humana), ocasionada pelo HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana), a criptococose tornou-se uma das infecções sistêmicas mais comuns entre os indivíduos HIV positivos, devido a queda da imunidade desses pacientes. (BRASIL, 2013; QUIAN et al., 2012).

A infecção ocorre como uma pandemia, sendo presente na maioria dos casos que ocorrem na Ásia e África do Sul, seguidas pela América Central e do Sul, sendo o Brasil o 4º país com maior número de casos (COGLIATI et al., 2013). Não há estimativas de prevalência da infecção, mas já existem evidências, através da pesquisa de anticorpos, que a infecção possa ocorrer desde a infância do indivíduo, porém tornando-se sintomática quando ocorre a queda da imunidade (GOLDMAN et al., 2001).

O *C. neoformans* e *C. gattii* correspondem à forma assexuada de basidiomicetos. Apresentam-se como leveduras globosas ou ovaladas, com 3 a 8 um de diâmetro, com brotamento único ou múltiplo, envolvidas por uma cápsula característica de mucopolissacárideos. Em cultivo *in vitro* as duas espécies apresentam colônia de cor branca a creme, brilhante, de textura mucóide, margem lisa e inteira em ágar sabouraud, em ágar niger, devido a produção de melanina, há

formação de colônias marrons, sendo característica do *C. neoformans* e *C.gatti*, não ocorrendo em outras espécies do gênero, nem outras leveduras de interesse médico, com raras exceções. (CONSENSO, 2008).

A interação do patógeno-hospedeiro se dá pelos principais fatores de virulência do *C. neoformans* como a termotolerância, os componentes da parede celular e da cápsula, a capacidade de adesão, os receptores de hormônios e a produção de enzimas (KUROKAWA et al.,1998). Entre os mecanismos imunossupressores induzidos pela presença da cápsula incluem-se: inibição da fagocitose, inibição da ligação de IgG, bloqueio da fixação de C3 e da via da ativação de complemento pela via clássica, supressão da proliferação da expressão das moléculas de adesão (MAGLIANI et al., 2005; SHOHAM et al., 2005).

Tanto a parede celular como a cápsula são sintetizada pelos fungos, estruturas que protegem os microrganismos contra células de defesa do hospedeiro. A produção de melanina que se deposita na parede do fungo é proveniente de substratos contendo dopamina e da ação de enzimas catalizadoras como a fenoloxidase. O cérebro é rico em substratos para a fenoloxidase tais como a dopamina e poderia ser responsável pela propensão destes organismos em infectarem o sistema nervoso. No organismo do hospedeiro, os fungos encontram uma série de mecanismos relacionados a imunidade inata e adquirida no qual tentam eliminá-los, através da liberação de citocinas por estímulos de macrófagos (RODRIGUES et al., 1999).

Alguns autores relatam o comprometimento da imunidade em pacientes com criptococose, seria importante levar em consideração não apenas o comprometimento sistêmico do indivíduo, mas também a eficácia dessa resposta em diferentes órgãos. Estudos destacam que o linfócito T possui eficácia reduzida no tecido cerebral, em comparação ao que se observa em outros órgãos como o pulmão, além disso há um atraso no desenvolvimento da resposta inflamatória no tecido cerebral em comparação com outros órgãos, com isto indivíduos imunodeprimidos são susceptíveis a infecção (CONSENSO, 2008).

Portanto, o objetivo do presente estudo foi descrever os métodos de diagnóstico laboratorial de criptococose em indivíduos imunodeprimidos.

2 MÉTODOS

O estudo tratou-se de um levantamento bibliográfico descritivo, no qual foi abordado a criptococose desde sua definição, epidemiologia, etiopatogenia, manifestações clínicas, até o seu diagnóstico e tratamento. O levantamento de dados foi realizado através das bases de dados SCIELO, PUBMED e MINISTÉRIO DA SAÚDE. Os idiomas estabelecidos foram português, espanhol e inglês. A busca foi conduzida utilizando as seguintes palavras-chaves e descritores: criptococose; pacientes HIV-positivos; diagnóstico; epidemiologia. Os critérios de inclusão adotados foram artigos, periódicos de revisão de literatura e ensaios clínicos que apresentaram como temas principais a criptococose em pacientes portadores do HIV/SIDA. Estudos que não estavam em conformidade com o assunto foram excluídos.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Manifestações Clínicas

As manifestações clínicas geralmente são relacionadas ao sistema nervoso central, com quadro de meningoencefalite subaguda ou crônica. Os sintomas normalmente são febre e cefaleia, e em alguns casos pode ocorrer alteração do nível de consciência. A infecção pulmonar pode apresentar-se assintomática, ou apresentar manifestações compatíveis com quadro gripal, o que dificulta a suspeita, devido que o quadro gripal é característico de diversas doenças (MITCHELL et al., 1995).

Em imunodeprimidos pode ocorrer disseminação sistêmica, como o acometimento geniturinário, gerando pielonefrite, sendo que a cultura de urina específica pode ser importante nesse caso, inclusive em casos de criptococemia. A próstata também pode ser atingida, sendo uma possível fonte de recidivas em pacientes imunodeprimidos (HERNÁNDEZ et al., 1999; PINTO-JÚNIOR et al., 2006). Outras manifestações podem ocorrer como: hepatite, sinusite, lesões em diversos órgãos e tecidos, como pele, olhos, esôfago, boca, estômago, intestino, trato genital feminino e ossos (KWON-CHUNG et al., 1992).

3.2 Meningite

Em indivíduos imunodeprimidos a meningite ocorre de forma aguda, principalmente em pacientes do sexo masculino, com carga fúngica elevada, com ampla variação de sinais e sintomas

clínicos, inclusive ausência de sinais meníngeos (QUICK et al., 1989; DROMER et al., 2007). Durante a meningite alguns pacientes podem apresentar poucos sinais e sintomas como febre e cefaleia, demência progressiva e confusão mental que ocorre nos pacientes com linfócitos T CD4+ menor que 50 células/mm³, o que dificulta que o sistema imunológico consiga a eliminação do fungo do sistema nervoso central. A hipertensão intracraniana ocorre em aproximadamente 50% dos pacientes, devido a alta carga fúngica, contribuindo para significativo aumento da morbimortalidade da doença (SHARON et al., 2014).

A meningite criptocócica pode evoluir com um número significativo de sequelas e déficits neurológicos, dentre as mais frequentes são: diminuição da capacidade mental (30%), redução da acuidade visual (8%) e paralisia permanente de nervos cranianos (5%) e hidrocefalia. A forma disseminada da doença pode apresentar-se como febre de origem indeterminada, como hepatosplenomegalia febril, bem como através do acometimento de adrenais, rins, linfonodos de mediastino, pele, ossos, miocárdio, endocárdio, tireóide, testículo, hipófise, entre outros (SHARON et al., 2014).

Pacientes imunodeprimidos que são acometidos pelo *C. gatti*, são submetidos a tratamentos antifúngicos prolongados e adquirem sequelas neurológicas que exigem intervenções neurocirúrgicas, por apresentarem meningite mais prolongada e resposta inflamatória mais intensa, devido a maior agressividade desta espécie (CHEN et al., 2000).

3.3 Criptococose Pulmonar

O acometimento pulmonar é o segundo mais frequente após o acometimento do sistema nervoso central, apresentando manifestações assintomáticas ou sintomáticas. Devido o acometimento pulmonar-linfonodo, ocorre uma semelhança as doenças: histoplasmoze e a tuberculose. Frequentemente infecção subpleural ocorre de forma assintomática, pois os propágulos fúngicos são pequenos e se depositam nos alvéolos periféricos (NADROUS et al., 2003; SHARON et al., 2014).

Os pulmões estão envolvidos em aproximadamente 30% dos casos, onde observa-se subdiagnóstico destas formas no paciente infectado pelo HIV. A maioria dos pacientes não infectados pelo HIV e imunodeprimidos que apresentam acometimento pulmonar pertence a

categoria de pacientes transplantados de órgãos (CASADIVALL et al., 1998; CAMPBELL et al., 1996; KERKERING et al., 1981).

Esta micose é descrita em todas as idades, porém é mais prevalente em indivíduos entre 30 a 50 anos de idade, principalmente ocorrendo em homens cerca de 70% e mulheres em 30%. Nos últimos anos houve o aumento de casos relacionados as crianças, devido à desnutrição e ao nascimento de crianças imunocomprometidas (CASALI et al., 2001; MAFRA et al., 2008).

3.4 Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico laboratorial da criptococose é realizado através: líquido (LCR), urina, fragmentos de tecido, aspirados de lesões cutâneas, escarro e demais amostras do trato respiratório. O diagnóstico definitivo é realizado pelo exame direto que detecta a presença do próprio organismo no material e exames auxiliares como imagem, cultura, exames bioquímicos, exame histopatológico, sorologia e técnicas moleculares (COLOMBO et al., 2014; XAVIER et al., 2009).

3.4.1 Exame Direto

Quase todos os casos de criptococose são diagnosticados através da visualização do microrganismos através de espécimes clínicos adequados e / ou um título de antígeno criptocócico de soro ou líquido (LCR) (CONSENSO, 2008).

O LCR deve sempre ser examinado para pesquisa de criptococos, a menos que a punção lombar não possa ser realizada. O exame direto, é realizado uma preparação em lâmina com o material biológico e tinta Nanquim ou tinta da China ou tinta da Índia que, ao microscópio óptico, coloca em evidência a cápsula polissacarídica da levedura. Também pode ser acrescentado o KOH a 10% para reduzir elementos interferentes que possam induzir a erro na microscopia. A visualização microscópica é de leveduras redondas ou ovais, com brotamentos únicos ligados por finas conexões ou sem brotamentos. Amostras refrigeradas podem atenuar a cápsula de polissacarídeos, por isso, devem-se preferir amostras recentes. Este método apresenta sensibilidade a 94,1% e especificidade de 100% (DIAZ et al., 2011). Este método é um teste de diagnóstico barato e simples para amostras de LCR, tornando-se positivo em 5 min. A tinta da China normalmente se dá positivos em 70 a 95 dos pacientes imunodeprimidos (LALLOO et al., 1994).

3.4.2 Cultura

A cultura continua essencial para o auxílio do diagnóstico, pois uma vez que a pesquisa do antígeno criptocócico não distingue as espécies *C. neoformans* e *C. gattii*, sendo o material pode ser cultivado a partir de qualquer local do corpo. Para diagnosticar a infecção pulmonar, pode-se ser utilizado lavado broncoalveolar, aspirados de agulhas e biópsias pulmonares (CONSENSO, 2008).

Os criptococos crescem prontamente sobre Ágar bacteriológico (por exemplo, Ágar Sangue) e cultivo com o Ágar Sabouraud e Ágar Mycosel, em meio de cultura diferencial pode-se utilizar o ágar Semente de Niger (alpiste), Ágar semente de girassol, ágar dopamina, ágar L-dopa ou ágar batata-cenoura (LACAZ, 1991). O Ágar Sabouraud em algumas culturas utiliza-se antibiótico Cloranfenicol adicionado, para inibir crescimento de bactérias e solução peptonica a 1% para induzir produção de capsula pelo fungo . O Fungo leva de 48 a 72 horas para o crescimento em temperatura entre 25° a 37° C, suas colônias apresentam coloração de branco a bege, e com um aspecto de mucoide e brilhante tomando com aspecto de leite condensado. A identificação então ocorre através da avaliação microscópica dos organismos. No entanto, as culturas podem se tornar secas e opacas com o tempo (BENNETT et al., 2014).

Outro ágar utilizado é o ágar Canavanina-Glicina-Azul de Bromotimol (CGB) que distingue de forma confiável entre *C. gattii* (colônias produzem um pigmento azul) e *C. neoformans* (sem alteração na cor da colônia), sendo a cor azul resulta da utilização de glicina, que reduz a amônia, provocando a alcalinização e, portanto, a cor azul e a susceptibilidade à canavanina, sendo o *C. gattii* possui a capacidade de utilização de glicina. Testes falso negativos podem dar devido que o *C. gattii* pode não mudar a coloração do meio mesmo depois de vários dias, porém estes casos são incomuns. Mesmo que seja improvável que as cepas de *Candida sp.* sejam confundidas com *C. gattii* ou vice-versa, os cientistas de laboratório devem estar atentos a inspecionar cuidadosamente e a testar todas as colônias suspeitas de *C. gattii* (KWO-CHUNG et al., 1981).

3.4.3 Sorologia

A sorologia é realizada para a pesquisa de antígenos capsulares polissacarídicos solúveis nos fluídos corporais do indivíduo como líquido, urina, lavado broncoalveolar. O teste de ELISA (Ensaio Imunoenzimático) pode ser realizado para diagnóstico porém não devem substituir o exame direto (BENNETT et al., 2014). A pesquisa de antígeno da criptococose tem sido detectado por incubação

de espécies específicas como o *C. neoformans*. O teste pode ser quantificado. Existem dois formatos comerciais comuns de teste para pesquisa de antígeno: o teste de aglutinação de latex e o imunoensaio ligado à enzima (ELISA) (DIAZ et al., 2011).

O teste de aglutinação de látex, é o método mais comum empregado para triagem ou titulação do soro. As partículas de látex, recobertas com imunoglobulinas hiperimunes específicas de coelho, são misturadas com diluições da amostra do paciente, que pode ser líquido, soro ou urina, torna-se positiva em uma diluição de 1:4 é altamente sugestiva de infecção criptocócica. Títulos maiores ou iguais a 8 geralmente indicam doença ativa, que se dá na maioria dos pacientes com AIDS tem altos títulos do antígeno (DIAZ et al., 2011).

O anticorpo utilizado no teste de ELISA foi desenvolvido a partir de uma cepa de *C. neoformans*, os resultados ocasionais como falso-negativos podem resultar de uma menor afinidade do anticorpo para *C. gattii*. Na prática clínica, a sensibilidade do teste para a infecção por *C. gattii* permanece elevada, inclusive para pacientes HIV positivos onde 90% para doença pulmonar, com 87 a 100% de sensibilidade para testes de LCR (CHEN et al., 2000; MORGAN et al., 2002).

A técnica de ELISA é um pouco mais sensível que outras metodologias, porém requer um leitor de placas e é mais caro. Em estudos de infecção por *C. neoformans*, ocorreu falsamente resultados de efeito pro-zona ou ocasionalmente, devido a infecção com a resistências de cápsulas do fungo, pela presença de fator reumatóide, doença vascular do colágeno, malignidade e influência da qualidade do ágar (CHAU et al., 2010).

3.4.4 Histopatológico

Exames histopatológicos pode ser útil devido a formação de lesões diferentes, como por exemplo: padrão gelatinoso e o padrão granulomatoso. O padrão gelatinoso caracteriza-se por pouco ou nenhuma reação inflamatória e grande quantidade de fungos com cápsula volumosa. O padrão granulomatoso caracteriza-se pela presença de granulomas epitelióides, células gigantes, linfócitos e proliferação linfoblástica. O infiltrado inflamatório é fundamentalmente constituído por macrófagos e a quantidade de parasitas é sensivelmente menor que nas gelatinosas. As colorações úteis para a visualização do fungo são H.E. (hematoxilina e eosina), mucicarmim, PAS (Periodic Acid-Schiff), Alcian Blue . Mucicarmim cora as células de vermelho e Fontana-Masson cora a

melanina fúngica de marrom avermelhado, e são mais específicas para *C. neoformans* (PEDROSO et al., 2006).

3.4.5 Testes Bioquímicos

Testes bioquímicos também pode ser utilizados como o meio L-canavanina-glicina-azul de bromotimol, onde a espécie *C. gatti* cresce no meio canavanina, utiliza a glicina e apresenta coloração azul no meio. A espécie *C. neoformans* cresce no meio, porém não altera a coloração do meio. Pode-se utilizar o teste do Ágar Uréia, onde o *C. neoformans* muda a cor do meio após 7 dias incubação para a cor rosa pink, pois o fungo hidrolisa a uréia do meio (ALMEIDA et al., 2014).

3.4.6 Técnicas Moleculares

Os testes moleculares estão sendo cada vez mais utilizados, na atualidade, são praticamente essenciais, são raras as exceções que não se utiliza-se esses testes. A PCR (reação em cadeia da polimerase) demonstra níveis de sensibilidade e especificidade superiores à cultura e ao exame direto, devido que a PCR amplifica as sequências gênicas específicas do fungo, além disso, é possível uma melhor identificação, entre as duas formas patogênicas do *Cryptococcus sp* (BENNETT et al., 2014).

Os métodos de identificação moleculares são mais recentes e são úteis em estudos epidemiológicos, para a identificação da variedade, do sorotipo, e variações individuais de cepas. O método de PCR, sendo sensível, específico, e reprodutível, representa uma ferramenta promissora para análise de amostras de líquido em pacientes com suspeita clínica de neurocriptococose. Os resultados da pesquisa de DNA em líquido de paciente com meningite criptocócica têm correlacionado com a melhora clínica durante o tratamento (ALMEIDA et al., 2014; YEO et al., 2002). O uso dessas técnicas para a identificação de *C. neoformans* também é um avanço importante, pois permite um resultado mais preciso e mais rápido que o usual. Em relação a sensibilidade, a PCR apresenta sensibilidade de 92,9% que é superior quando comparada com a cultura do fungo, que apresenta 85,7%, e a prova da tinta Nanquim, com 76,8% (LEAL et al., 2006; LEAL et al., 2008).

A PCR Multiplex é uma série de alvos de genes e que pode ser realizada rapidamente e com uma pequena quantidade de DNA em comparação com a PCR convencional, onde permite uma

identificação mais rápida ao nível da espécie e pode distinguir entre sorótipos usando diferentes combinações de primers, tornando-se o resultado mais seguro e ágil (LEAL et al., 2008).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O diagnóstico laboratorial da criptococose em indivíduos imunodeprimidos pode ser realizado com segurança quando técnicas e métodos laboratoriais são utilizados adequadamente. As características morfológicas do microrganismo no espécime clínico ou na cultura, quando observadas atentamente, podem direcionar a identificação do microrganismo o mais rápido possível, fazendo que ocorra uma administração dos medicamentos para o tratamento da infecção. A suspeita clínica e os dados clínicos do paciente permitem também agilizar os procedimentos laboratoriais, permitindo a utilização de meios de cultura seletivos e/ou diferenciais, incubação em temperatura adequada e realização de provas de identificação direcionadas. O conhecimento dos materiais clínicos onde *C. neoformans* ou *C. gattii* pode ser isolado é importante para a triagem inicial, que vai da realização do exame direto à escolha dos meios de cultura.

Considerando a maior sobrevida e qualidade de vida de indivíduos em condição de imunocomprometimento, diversas espécies de microrganismos estão emergindo como agentes de infecção., com isto o conhecimento mais profundo e atualizado sobre esses microrganismos e suas principais características diferenciais é importante para um diagnóstico mais rápido e mais seguro destes pacientes, diminuindo o número de óbitos. Além disso, os profissionais de saúde devem fornecer instruções corretas de como deve ser feita a limpeza dos locais nas cidades que são fontes de infecção, com a intenção de diminuir cada vez mais a contaminação do meio ambiente e das pessoas por essa infecção fúngica oportunista.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA RLG, MACHADO ER. Cryptococcus spp. em pacientes com HIV/SIDA: Revisão da Literatura. Ensaio **Cienc.Cienc. Biol. Agrar. Saúde**. 2014, 18, 55-63.

BARBOSA JUNIOR AM. et al. Biological activity of Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii from clinical and environmental isolates. **J. Bras. Patol. Med. Lab**. 2013, 3, 160-168.

BENNETT JE, DOLIN R, BLASER MJ. **Principles and practice of infectious diseases**. Elsevier Health Sciences. 2014.

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde**. Módulo 8: Detecção e identificação de fungos de importância médica /Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2013.

CAMPBELL GD. **Primary pulmonary cryptococcosis**. American Review Respiratory Diseases. 1996, 94,236-243.

CASADEVALL A, PERFECT JR. **Cryptococcus neoformans**. ASM Press, Washington DC, 1998.

CASALI A.K. et al. Cryptococcus neoformans: Aspectos moleculares e epidemiológicos. **Biotechnol. Ciênc. Desenvol.** 2001, 20, 34-37.

CHAU TT, MAI NH, PHU NH, NGHIA HD, CHUONG LV, SINH DX, DUONG VA, DIEP PT, CAMPBELL JI, BAKER S, HIEN TT, LALLOO DG, FARRAR JJ, DAY JN. **A prospective descriptive study of cryptococcal meningitis in HIV um infected patients in Vietnam—high prevalence of Cryptococcus neoformans var. gattii in the absence of underlying disease**. BMC Infect. Dis. 2010, 10, 189-199.

CHEN S, SORRELL T, NIMMO G, SPEED B, CURRIE B, ELLIS D, et al. Epidemiology and host and variety-dependent characteristics of infection due to Cryptococcus neoformans in Australia and New Zealand. **Australasian Cryptococcal Study Group**. Clin Infect Dis. 2000, 31, 499-508.

CHUCK SL, SANDE MA. **Infections with Cryptococcus neoformans in the acquired immunodeficiency syndrome**. New England Journal of Medicine. 1989, 321, 794-799.

COGLIATI M. **Global molecular epidemiology of Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii: an atlas of the molecular types**. Scientifica. 2013, 19-23.

COLOMBO FA. et al. **Updating: cryptococcosis diagnostic aspects**. Journal of AIDS and Clinical Research. 2014, 5-12.

CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 2008, 41, 524-544.

DIAZ MR, NGUYEN MH. **Diagnostic approach based on capsular antigen, capsule detection, B-glucan and DNA analysis.** ASM Press, Washington, DC. 2011, 547–564.

DROMER F, MATHOULIP LO, LORTHOLARY O. **Determinants of disease presentation and outcome during cryptococcosis.** The Crypto A/D Study. PLoS Med. 2007, 4, 1-12.

GOLDMAN DL, KHINE H, ABADI J, LINDENBERG DJ, PIROFSKI LA, NIANG R, CASADEWALL. **A Serologic evidence for Cryptococcus neoformans infection in early childhood.** Pediatrics. 2001, 7, 60-66.

HERNÁNDEZ RN, PÉREZ RB. Aspectos clínicos y microbiológicos en un paciente inmunocompetente con criptococosis del sistema nervoso central. **Rev. Cubana Med. Milit.** 1999, 28, 67-72.

KERKERING TM, DUMA RJ, SHADOMY S. The evolution of pulmonary cryptococcosis. Clinical implications from a study of 41 patients with or without compromising host factors. **Annals of Internal Medicine.** 1981, 16, 611-616.

KUROKAWA CS, SUGIZAKI MF, PERAÇOLI MTS. Virulence factors in fungi of systemic mycoses. **Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo.** 1998, 40, 125-135.

KWON-CHUNG KJ, BENNETT JE. **Med. Myco. Philadelphia:** Lea & Febiger. 1992, 860-867.

KWONG-CHUNG KJ, POLACHEK I, BENNETT JE. Improved diagnostic medium for separation of Cryptococcus neoformans var. neoformans (serotypes A and D) and Cryptococcus neoformans var. gattii (serotypes B and C). **J. Clin. Microbiol.** 1989, 15, 535–537.

LACAZ CS et al. **Micologia médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico.** 1991, 645- 695.

LALLOO D, FISHER D, NARAQI S, LAURENSEN I, TEMU P, SINHA A, SAWERI A, MAVO B. **Cryptococcal meningitis (C. neoformans var. gattii) leading to blindness in previously healthy Melanesian adults in Papua New Guinea.** 1994, 87, 343–349.

LEAL AL et al. Padronização de um método de PCR multiplex para substituir o cultivo em ágar CGB na diferenciação de C. neoformans e C. gattii. **Rev. Bras. Anal. Clín.** (suplemento). 2006, 38, 69B.

LEAL AL, FAGANELLO J, BASSANESI MC, VAINSTEIN MH. **Cryptococcus species identification by multiplex PCR. Med. Mycol.** 2008, 46, 377–383.

MAFRA MO. et al. Criptococose Disseminada em Lúpus Eritematoso Sistêmico Juvenil. **Revista Brasileira de Reumatologia.** 2008, 6, 373-378.

MAGLIANI W, CONTI S, ARSENI S, SALATI A, RAVANETTI L, MAFFEI DL, GIOVATI L, POLONELLI L. Antibody-mediated protective immunity in fungal infections. **New Microbiology.** 2005, 28, 299-309.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Vigilância Epidemiológica da Criptococose.** Brasília.2012.

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.

HERNÁNDEZ RN, PÉREZ RB. Aspectos clínicos y microbiológicos en un paciente inmunocompetente con criptococosis del sistema nervoso central. **Rev. Cubana Med. Milit.**1999, 28, 67-72.

MORGAN J, MCCARTHY KM, GOULD S, FAN K, ARTHINGTON-SKAGGS B, IQBAL N, STMAEY K, HAJJEH RA, BRANDT ME. *Cryptococcus gattii* infection: characteristics and epidemiology of cases identified in a South African province with high HIV seroprevalence. **Clin. Infect. Dis.** 2004, 43, 1077–1080.

NADDROUS HF, ANTONIOS VS, Terrell CL, **Ryu JH.**Pulmonary cryptococcosis in nonimmunocompromised patients. **Chest.** 2003, 124, 2143-2147.

PEDROSO RS, CANDIDO RC. **Diagnóstico laboratorial da criptococose.**NewsLab. 2006, 77. 94-102.

PINTO JÚNIOR VL et al. Criptococose associada à Aids. A importância do cultivo da urina no seu diagnóstico. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 2006, 39, 230-232.

QUEIROZ JPAF, SOUSA FDN, LAGE RA, IZAEL MA, SANTOS AG. Criptococose - Uma revisão bibliográfica. **Acta Veterinaria Brasilica.** 2008, 2, 32-38.

QUIAN J. et al. Meningitis por *Cryptococcus neoformans* em niños y adolescentes infectados por vírus de la inmunodeficiencia humana. **Rev. chil. Infectol.** 2012, 5, 554-557. COGLIATI M. **Global molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: an atlas of the molecular types.** Scientifica. 2013, 19-23.

RODRIGUES ML, ALVIANO CS, TRAVASSOS LR. **Pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*: virulence factors and immunological mechanisms.** *Microbes Infection.* 1999, 1, 293-301.

SHARON CA, CHEN S, WIELAND M, SORRELLA TC. ***Cryptococcus gattii* Infections.** *Clinical Microbiology Reviews.* 2014, 4, 980–1024.

SHOHAM S, LEVITZ SM. The immune response to fungal infections. *British Journal of Hematology.* 2005, 129, 569-582.

SILVA VP. **Criptococose em pacientes submetidos a transplante renal.** *Prática Hospitalar.* 2009.

XAVIER MO, OLIVEIRA FM, SEVERO LC. **Chapter 1: Laboratory diagnosis of pulmonary mycoses.** *J Bras Pneumol.* 2009, 9, 907-919. DIAZ MR, NGUYEN MH. Diagnostic approach based on capsular antigen, capsule detection, B-glucan and DNA analysis. ASM Press, Washington, DC. 2011, 547–564.

YEO SF, WONG B. Current status of nonculture methods for diagnosis of invasive fungal infections. ***Clin. Microbiol. Rev.*** 2002, 15, 465-484.