

Informe técnico

## **Meningites Parasitárias e por Fungos: Diagnóstico e Caracterização Laboratorial dos Agentes Etiológicos**

*Parasite and fungal meningitis: Diagnosis and Laboratory Characterization of the Etiological Agents*

**Bernadete L. Liphaus<sup>[1]</sup>; Lucas Xavier Bonfietti<sup>[2]</sup>; Adriana Pardini Vicentini<sup>[3]</sup>; Pedro Luiz Silva Pinto<sup>[4]</sup>; Leyva Cecília Vieira de Melo<sup>[4]</sup>; Telma RMP Carvalhanas<sup>[1]</sup>**

<sup>[1]</sup>Divisão de Doenças de Transmissão Respiratória (DDTR), Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE), Coordenadoria de Controle de Doenças (CCD), Secretaria de Estado da Saúde (SES-SP). São Paulo/SP, Brasil.

<sup>[2]</sup>Núcleo de Micologia, Instituto Adolfo Lutz (IAL), Coordenadoria de Controle de Doenças (CCD), Secretaria de Estado da Saúde (SES-SP). São Paulo/SP, Brasil.

<sup>[3]</sup>Centro de Imunologia, Instituto Adolfo Lutz (IAL), Coordenadoria de Controle de Doenças (CCD), Secretaria de Estado da Saúde (SES-SP). São Paulo/SP, Brasil.

<sup>[4]</sup>Núcleo de Enteroparasitas, Instituto Adolfo Lutz (IAL), Coordenadoria de Controle de Doenças (CCD), Secretaria de Estado da Saúde (SES-SP). São Paulo/SP, Brasil.

### **Autor para correspondência**

Bernadete L. Liphaus

E-mail: [dvresp@saude.sp.gov.br](mailto:dvresp@saude.sp.gov.br)

Instituição: Divisão de Doenças de Transmissão Respiratória (DDTR/CVE/CCD/SES-SP)

Endereço: Av. Dr. Arnaldo, 351, 6º andar. CEP: 01246-000. São Paulo /SP, Brasil

## INTRODUÇÃO

Meningite é a inflamação das membranas que envolvem o encéfalo e a medula espinhal, e pode ocorrer tanto por causas infecciosas, como não infecciosas. As infecções por bactérias ou vírus são mais frequentes e as primeiras a serem consideradas, na prática clínica, como hipótese diagnóstica. Além disso, a alta transmissibilidade desses agentes e a possibilidade de ocorrência de surtos contribuíram para a relevância destes patógenos em saúde pública. No entanto, outras etiologias infecciosas como parasitas e fungos podem causar meningite. A meningite parasitária e a por fungos são raras, mas devem ser sempre consideradas no diagnóstico diferencial.

Meningite parasitária ou eosinofílica pode ser causada por protozoários (*Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*, *Plasmodium sp*, amebas de vida livre e *Entamoeba histolytica*) e helmintos (*Taenia solium*, *Echinococcus granulosus*, *Schistosoma mansoni*, *Gnathostoma sp*, *Toxocara canis* e *Angiostrongylus cantonensis*).

O acometimento do sistema nervoso central (SNC) por parasitas pode ocorrer pela migração direta e obrigatória, condição determinada pelo próprio ciclo evolutivo de cada espécie (neurotropismo), ou pela migração errática, ocasional e, até mesmo, acidental como ocorre nas infecções por amebas de vida livre. Os protozoários e helmintos podem causar meningite, encefalite, ventriculite, mielite, isquemia e/ou abscesso cerebral.

O diagnóstico laboratorial (identificação do agente etiológico) dos parasitas relacionados às meningites é recomendado e fundamental para a vigilância epidemiológica e para as medidas de prevenção e controle. A realização dos exames quimiocitológico, bacteroscopia, teste de aglutinação pelo látex e cultura de líquido cefalorraquiano (LCR) e/ou sangue (hemocultura) é de responsabilidade dos laboratórios dos hospitais, municípios, e regiões de atendimento do caso.

O exame quimiocitológico do LCR permite a contagem e o diferencial das células, as dosagens de glicose e proteínas e deste modo, expressa a intensidade do processo inflamatório/infeccioso e orienta a suspeita clínica. No primeiro exame quimiocitológico do LCR o predomínio pode ser de neutrófilos, podendo alterar em 6 a 48 horas para eosinofílico nas meningites parasitárias ([Quadro 1](#)). O exame quimiocitológico não deve ser utilizado na conclusão do diagnóstico das meningites por sua baixa especificidade.

Na meningite parasitária ocorre a presença de pelo menos 10% de eosinófilos, em relação à contagem total de leucócitos no LCR, o que define o quadro de meningite eosinofílica. Infecções helmínticas, em particular pelo *Angiostrongylus cantonensis*, são

a causa mais frequente de meningite eosinofílica, no entanto, alguns fungos, bactérias, Rickettsias, vírus e agentes não infecciosos podem aumentar o número de eosinófilos no LCR (eosinorraquia).

**Quadro 1.** Exame quimiocitológico de líquido nas meningites de acordo com a suspeita clínica.

Diagnóstico	Aspecto	células (leucócitos/mm <sup>3</sup> )	proteína (mg/dL)	glicose (mg/dLI)	Bacteroscopia Gram
Normal	límpido incolor	RN até 20 < 1 ano até 10 > 1 ano até 5	15 - 50	45 - 100	negativo
Meningite bacteriana	turvo purulento	> 500 (neutrófilos)	> 100	< 50	positivo*
Meningite viral	límpido	até 500 (linfócitos)	normal	normal	negativo
Meningite por fungo	límpido	> 10 (linfócitos e monócitos)	aumentado	diminuído	positivo**
Meningite por parasita	turvo	500 – 2000 (eosinófilos)	aumentado	normal	negativo

\*presença de cocos, diplococos, bacilos ou cocobacilos Gram-positivos ou Gram-negativos;

\*\*presença de filamentos ou leveduras.

*Angiostrongylus cantonensis* é endêmico em países do Continente Asiático, Ilhas do Pacífico e no Caribe, sendo reconhecida, mais recentemente, sua transmissão no Continente Americano, incluindo o Brasil. *Angiostrongylus cantonensis* é um verme que parasita pulmões de ratos urbanos e tem como hospedeiros intermediários naturais moluscos terrestres (lemas e caramujos). O homem é considerado hospedeiro acidental, no qual o parasito, em sua forma larvária, não completa o ciclo de desenvolvimento. A transmissão do parasito para o homem ocorre por meio da ingestão de moluscos infectados, consumo de vegetais e frutas *in natura* contaminadas pelas secreções dos hospedeiros intermediários, ou ainda por ingestão de hospedeiros não habituais como caranguejos, camarões, entre outros. Após a ingestão de alimentos contaminados, as larvas migram para o SNC, onde induzem reação inflamatória e presença de eosinófilos no LCR. No Brasil esta parasitose foi oficialmente reconhecida pela primeira vez em 2007 e, desde então, vários casos isolados e alguns surtos familiares foram descritos. Estes dados mostram que se trata de doença emergente, com grande potencial de expansão no país. Apesar disso, esta parasitose ainda é desconhecida em muitos serviços de saúde, o que pode levar a subnotificação.

Assim, recomenda-se, nos casos com eosinorraquia > 10%, a pesquisa de parasitos, em especial do *Angiostrongylus cantonensis* e, se necessário, ampliar o diagnóstico diferencial para outros agentes que determinam eosinorraquia.

Meningite por fungo é rara, pode apresentar evolução lenta e ser fatal. Esta meningite ocorre principalmente com pacientes que apresentam alguma forma de imunodeficiência primária ou adquirida, porém, pode acometer indivíduos hígidos. Os principais patógenos relacionados à meningite fúngica são o *Cryptococcus neoformans* e o *Cryptococcus gatti*. No entanto, outros agentes como leveduras do gênero *Candida*; fungos dimórficos como *Histoplasma spp.* e *Coccidioides spp.*; fungos do gênero *Aspergillus spp.* e da ordem Mucorales podem, também, ocasionar esta doença.

Assim como para as meningites por parasitos o diagnóstico laboratorial dos fungos relacionados às meningites é recomendado e fundamental para a vigilância epidemiológica e para as medidas de prevenção e controle. A detecção de parasitas e fungos depende das características biológicas de cada agente etiológico e pode ser realizada por meio do exame microscópico direto ou após colorações específicas, da cultura, da reação em cadeia pela polimerase convencional (PCR) ou em tempo real (qPCR), do imunodiagnóstico/ensaios sorológicos e da imuno-histoquímica. Estes exames podem ser realizados em líquido, sangue e fragmentos de tecidos de acordo com o descrito abaixo.

Fungos filamentosos, como o gênero *Aspergillus spp.* podem ser identificados presuntivamente pela observação de características morfológicas ao microscópio com ou sem colorações específicas. Para confirmação de espécie, é necessária a utilização de técnicas moleculares como sequenciamento do DNA. Para o diagnóstico de meningite fúngica causada por leveduras, a observação de cápsula em microscópio a partir do método de tinta da china é indicativa do gênero *Cryptococcus spp.* Posteriormente, a partir de técnicas fenotípicas bioquímicas, como a metodologia de assimilação e fermentação de fontes de carboidratos e nitrogênio (auxanograma e zimograma), presença da enzima uréase (ágar ureia) e CGB (ágar Canavanina-Glicina azul de bromotimol) é possível determinar a espécie da levedura. Contudo, o diagnóstico da espécie de forma mais rápida e acurada, pode ser realizado por método de proteômica MALDI-TOF MS (*matrix assisted laser desorption ionization - time of flight mass spectrometry*) como orientado nas notas técnicas 17/2020 e 04/2021 da Anvisa. Quando a cultura for negativa, testes de PCR e de qPCR ou imunodiagnóstico/ensaios sorológicos são importantes e auxiliam a identificação correta do agente.

As amostras deverão ser enviadas ao Núcleo de Gerenciamento de Amostras Biológicas do IAL de São Paulo acompanhadas da Ficha de Encaminhamento contendo o número do SINAN-Net e de relato sucinto de caso, quando possível.

Este informe técnico tem por objetivo aprimorar o acondicionamento, manuseio, manutenção e transporte de amostras biológicas destinadas ao diagnóstico e caracterização laboratorial dos agentes etiológicos que causam meningites por parasitos e por fungos.

## Acondicionamento e transporte de amostras destinadas à pesquisa de parasitos

### 1. Pesquisa direta (a fresco)

Líquor – coletar 1 a 3 mL em tubo de polipropileno estéril com tampa rosqueada. Conservar em geladeira e transportar entre 2 a 8°C em até 48 horas com gelo reciclável em caixa isotérmica.

Para pesquisa de ameba conservar e transportar em temperatura ambiente imediatamente após a coleta, por no máximo 2 horas.

### 2. Pesquisa de anticorpos (imunodiagnóstico)

Líquor - coletar 1 a 3 mL em tubo de polipropileno estéril com tampa rosqueada. Conservar em geladeira e transportar (até 24 horas) entre 2 e 8°C com gelo reciclável em caixa isotérmica. Após 24 horas conservar a – 20°C e transportar mantendo a amostra congelada.

Sangue - coletar 4 a 5 mL em tubo com gel separador (tampa amarela) e centrifugar. Conservar em geladeira e transportar (até 24 horas) entre 2 e 8°C com gelo reciclável em caixa isotérmica. Após 24 horas conservar a – 20°C e transportar refrigerado entre 2 e 8°C, mantendo a amostra congelada.

Para o diagnóstico de meningite parasitária e/ou eosinofílica causada, sobretudo, por *Angiostrongylus cantonensis*, recomendamos o encaminhamento de amostras pareadas de líquido e/ou soro com intervalo de 15 dias, preferencialmente, nos casos de resultados inconclusivos ou negativos das primeiras amostras.

### 3. Pesquisa por PCR ou qPCR

Líquor - coletar 1 a 3 mL em tubo de polipropileno estéril com tampa rosqueada. Conservar em geladeira e transportar entre 2 a 8°C em até 48 horas com gelo reciclável em caixa isotérmica.

Fragmentos de tecidos - acondicionar cada fragmento de tecido/órgão (mínimo 1 mm) em frasco de boca larga (tipo coletor universal) *in natura* ou contendo solução salina, não formol. Identificar o frasco com nome do paciente e o local de coleta do fragmento.

## Acondicionamento e transporte de amostras destinadas à pesquisa de fungos

### 1. Pesquisa direta (a fresco)

Líquor - coletar 3 a 5 mL em tubo de polipropileno estéril com tampa rosqueada. Conservar e transportar à temperatura ambiente em caixa isotérmica, imediatamente após a coleta. Para o exame micológico direto são utilizadas a coloração tinta da China/Nigrosina ou Gram ou Giemsa.

### 2. Pesquisa por cultura

Realizar a coleta de líquido e/ou sangue preferencialmente antes da introdução do antifúngico.

Líquor - coletar 3 a 5 mL em tubo de polipropileno estéril com tampa rosqueada. Conservar e transportar em temperatura ambiente em caixa isotérmica.

Sangue - coletar 3 a 5 mL com assepsia e semear imediatamente no frasco de hemocultura adequado para idade (pediátrico ou adulto). Fazer também dois esfregaços em lâmina. Conservar e transportar a temperatura ambiente e ao abrigo da luz em caixa isotérmica.

A cultura de fungos deve ser realizada em ágar Sabouraud dextrose e possibilita a identificação de gênero e espécie por vários métodos: MALDI-TOF MS, auxanograma, zimograma, PCR e/ou sequenciamento de DNA. O isolamento do agente permite, também, a realização do teste de sensibilidade por microdiluição em caldo para os antifúngicos utilizados no tratamento, auxiliando assim na identificação de cepas resistentes.

### 3. Pesquisa por PCR

Líquor - coletar 3 a 5 mL em tubo de polipropileno estéril com tampa rosqueada. Conservar e transportar em temperatura ambiente em caixa isotérmica.

Sangue - coletar 4 mL de sangue total em tubo com EDTA (tampa roxa). Conservar em geladeira e transportar entre 2 a 8°C (até 24 horas) com gelo reciclável em caixa isotérmica. O tubo não pode estar em contato com o gelo.

### 4. Pesquisa de anticorpos (imunodiagnóstico)

Sangue - coletar 3 a 5 mL em tubo com gel separador (tampa amarela), ou em tubo seco (tampa vermelha) e centrifugar. Conservar em geladeira e transportar (até 24 horas) entre 2 a 8°C com gelo reciclável em caixa isotérmica.

Líquor - coletar 1 a 3 mL em tubo de polipropileno estéril com tampa rosqueada. Conservar em geladeira e transportar (até 24 horas) entre 2 a 8°C com gelo reciclável em caixa isotérmica. Após 24 horas conservar a – 20°C e transportar refrigerado entre 2 a 8°C, mantendo a amostra congelada.

### 5. Pesquisa por imuno-histoquímica

Acondicionar cada fragmento de tecido/órgão (mínimo 1 mm) em frasco de boca larga (tipo coletor universal) contendo solução fixadora de formalina 10% ou formalina tamponada no volume de 20 vezes o volume do fragmento. Identificar o frasco com nome do paciente e o local de coleta do fragmento. Este procedimento requer no mínimo 24 horas para fixação adequada, preferencialmente 72 horas. Conservar e transportar em temperatura ambiente em caixa isotérmica. Evitar temperaturas acima de 40°C.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Manual eletrônico de exames do Instituto Adolfo Lutz (IAL) - São Paulo. Disponível em: <http://www.ial.sp.gov.br/ial/servicos/exames-amstras-biologicas>
2. Laboratory biosafety manual, 4ed. 2020. Disponível em: <http://www.ial.sp.gov.br/ial/servicos/exames-amstras-biologicas>
3. Meningites. São Paulo (Estado) Secretaria de Estado da Saúde. Coordenadoria de Controle de Doenças. Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”. Guia de Vigilância Epidemiológica. 1ª ed. São Paulo: CVE, 2012, Caderno 3. Divisão de Doenças de Transmissão Respiratória, p.11-20.
4. Outras Meningites. Guia de Vigilância em Saúde: volume único. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. 4ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2019, capítulo 1, p.45-69.
5. Finsterer J, Auer H. Parasitoses of the human central nervous system. J Helminthol. 2013;87:257-70.
6. Morassutti AL, Thiengo SC, Fernandez M, Sawanyawisuth K, Graeff-Teixeira C. Eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*: an emergent disease in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2014;109(4):399-407.
7. Souza FN, Santos MA, Alves DA, Vieira de Melo LC, Mota DJG, Pertile AC, et al. *Angiostrongylus cantonensis* in urban populations of terrestrial gastropods and rats in an impoverished region of Brazil. Parasitology 2021;148(8):948-1002.
8. American Academy of Pediatrics. Parasitic Diseases. In: Kimberlin DW, Barnett ED, Lynfield K, Sawyer MH. eds. Red Book: 2021 Report of the Committee on Infectious Diseases. 32<sup>nd</sup> ed. Itasca, IL: American Academy of Pediatrics; 2021:557-61.
9. American Academy of Pediatrics. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gatti* Infections (Cryptococcosis). In: Kimberlin DW, Barnett ED, Lynfield K, Sawyer MH. eds. Red Book: 2021 Report of the Committee on Infectious Diseases. 32<sup>nd</sup> ed. Itasca, IL: American Academy of Pediatrics; 2021:285-88.
10. American Academy of Pediatrics. [Amebic Meningoencephalitis and Keratitis](#) (*Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* species, and *Balamuthia mandrillaris*). In: Kimberlin DW, Barnett ED, Lynfield K, Sawyer MH. eds. Red Book: 2021 Report of the Committee on Infectious Diseases. 32<sup>nd</sup> ed. Itasca, IL: American Academy of Pediatrics; 2021:193-6.



11. Liphaut BL, Yu ALF, Ferreira PM, Endo JAG, Silva MR, Carvalhanas TRMP. Meningite: O que precisamos saber? (Meningitis: What do we need to know?). Boletim Epidemiológico Paulista (BEPA) 2018;15(178):23-32.
12. Figueira GCN, Carvalhanas TRMP, Okai MIG, Yu ALF, Liphaut BL. Avaliação do sistema de vigilância das meningites no município de São Paulo, com ênfase para doença meningocócica. Boletim Epidemiológico Paulista (BEPA) 2012; 9(97):5-25.
13. Arendrup MC, Meletiadis J, Mouton JW, Lagrou K, Hamal P, Guinea J. Método para determinação de concentração inibitória mínima em caldo dos agentes antifúngicos para leveduras EUCAST – Documento Definitivo E.DEF. 7.3.2 – abril 2020.
14. Sanguinetti M, Posteraro B, Beigelman-Aubry C, Lamoth F, Dunet V, Slavin M, D. Richardson M. Diagnosis and treatment of invasive fungal infections: looking ahead. J Antimicrob Chemother. 2019;74:27-37.
15. Góralaska K, Blaszkowska J, Dzikowiec. Neuroinfections caused by fungi. Infection 2018; 46:443-59.
16. Guedes HLDM, Guimaraes AJ, Muniz MDM, Pizzini CV, Hamilton AJ, Peralta JM, Zancoppe-Oliveira RM). PCR assay for identification of *Histoplasma capsulatum* based on the nucleotide sequence of the M antigen. J Clin Microbiol. 2003;41(2):535-39.
17. Ota NKT, Tanikawa A, Takae Y, Mori T, Udagawa S, Nishikawa T. Genetic identification and detection of human pathogenic *Rhizopus* species, a major mucormycosis agent, by multiplex PCR based on internal transcribed spacer region of rRNA gene. J. Dermatol. Sci. 2005;39:23-31.
18. Houbraken J, Kocsubé S, Visagie CM, Yilmaz N, Wang X-C, Meijer M, Kraak B, Hubka V, Bensch K, Samson RA, Frisvad JC. Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (Eurotiales): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. Stud Mycol. 2020; 95:5-169.
19. Nota Técnica GVIMS/GGTES/ANVISA Nº 11/2020. Orientações para identificação, prevenção e controle de infecções por *Candida auris* em serviços de saúde. Acesso em 12/12/2021.
20. Nota Técnica GVIMS/GGTES/ANVISA Nº 04/2021. Orientações para vigilância, identificação, prevenção e controle de infecções fúngicas invasivas em serviços de saúde no contexto da pandemia da COVID-19. Acesso em 14/06/2021.

## HISTÓRICO

Recebimento  
14/01/2022

Aprovação  
17/01/2022

Publicação  
31/01/2022



Meningites Parasitárias e por Fungos: Diagnóstico e Caracterização Laboratorial dos Agentes Etiológicos

Liphaus BL, Bonfietti XL, Vicentini AP, Pinto PLS, Melo LCV, Carvalhanas TRMP