
Problemas no diagnóstico laboratorial de *C. neoformans* e *C. gattii*

Marilena dos Anjos MARTINS, Sandra Regina Brasil Stolf PUKINSKAS

Núcleo de Micologia, Centro de Parasitologia e Micologia, Instituto Adolfo Lutz

Criptococose é micose sistêmica causada por levedura capsulada do gênero *Cryptococcus spp.* Embora compreenda, aproximadamente, 39 espécies, somente as espécies *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* são consideradas patogênicas.

Anteriormente, a espécie *C. neoformans* estava dividida em duas variedades: *C. neoformans* var. *neoformans* e *C. neoformans* var. *gattii*. Devido às diferenças fenotípicas, genotípicas e epidemiológicas, os taxonomistas estabeleceram a separação definitiva das variedades em duas espécies distintas: *C. neoformans* e *C. gattii*¹.

Dados do Ministério da Saúde (2004) mostraram que a criptococose era a segunda infecção oportunista do Sistema Nervoso Central (SNC) mais frequente no Brasil. Apesar da diminuição do número de casos brasileiros da doença, ela ainda é considerada importante pela sua morbimortalidade². Do ponto de vista clínico e epidemiológico, essa micose se divide em: criptococose oportunista, associada a condições de imunodepressão celular causada predominantemente por *C. neoformans* e criptococose primária, associada a hospedeiro aparentemente imunocompetente, causada predominantemente por *C. gattii*³.

Devido ao seu tropismo pelo SNC, o Líquido Cefalorraqueano (LCR) é o material biológico mais utilizado para o diagnóstico laboratorial, porém outros materiais podem ser analisados: sangue,

escarro, lavado brônquico, medula óssea, urina, biópsia e secreção prostática.

O diagnóstico laboratorial da criptococose consiste, principalmente, na pesquisa direta da levedura capsulada no material biológico com tinta da China e no isolamento em meios de cultura. Pesquisa de antígeno e técnicas moleculares também podem ser utilizados.

Micológico direto e cultura de LCR apresentam sensibilidade variável, a saber: nos pacientes com Aids ela varia em torno de 80% a 100%, respectivamente; e nos pacientes imunocompetentes, ela está em torno de 30-50% e 89%, respectivamente (Moretti et.al, 2008).

No processamento das amostras biológicas líquidas, como LCR, é importantíssima a centrifugação, por 10 minutos a 2.000 rpm. O volume mínimo ideal é de 3mL.

Para micológico direto com tinta da China, coloca-se, sobre lâmina de microscopia, uma gota de tinta nankin ou nigrosina e uma gota do sedimento. Observar ao microscópio óptico em 40x a presença de levedura capsulada.

Nossa experiência mostra que amostras de LCR não centrifugadas e a não diluição da tinta nanquim (1:4 em sol. fisiológica) podem levar a falsos resultados negativos. Em pacientes com Aids, a levedura pode produzir pouca ou nenhuma cápsula. Nesses casos, a cápsula pode não ser visualizada; porém, na observação da morfologia da levedura,

o contorno da parede e as inclusões citoplasmáticas são características. Como o resultado do micológico direto deve ser liberado rapidamente pelo laboratório, em caso de dúvida quanto à presença de cápsula, liberar o resultado como: presença de leveduras sem cápsula com morfologia característica de *Cryptococcus spp* ou simplesmente presença de levedura. A inexperiência de alguns laboratoristas pode levar a falso resultado positivo nos casos em que houver extravasamento de material citoplasmático dos neutrófilos, o que leva à formação de halo ao seu redor, porém não é uniforme⁴.

Para o isolamento de *Cryptococcus spp*, podem ser utilizados vários meios de cultura como: ágar sangue, chocolate, Sabouraud e infusão de cérebro e coração (BHI). Não devem ser utilizados meios que contenham cicloheximida (Actidione, Roche®) como o meio Mycosel® e Micobiotic®, pois essa substância inibe o crescimento da levedura. Incubar por até 15 dias à temperatura de 30 °C, com leituras diárias. Normalmente, o crescimento é por volta de 48 a 72h. A utilização de ágar Niger auxilia na identificação presuntiva de *Cryptococcus spp*, pois nesse meio somente as colônias desse gênero apresentam coloração marrom.

Após crescimento em cultura, a identificação da espécie deve ser iniciada pela pesquisa de cápsula nas colônias de leveduras com tinta da China. O mesmo procedimento deverá ser aplicado quando da utilização de meios cromogênicos (meios utilizados na identificação presuntiva de leveduras do gênero *Candida*), em que o *Cryptococcus spp* cresce com tonalidade rosa ou creme, a mesma encontrada em outras leveduras; portanto, o laboratorista não suspeita do crescimento de *Cryptococcus* nesse meio. Deve-se ter cuidado, principalmente, em isolados de sangue e liquor de realizar a pesquisa de cápsula nas colônias antes de liberar um resultado presuntivo para espécies de *Candida* em um meio de cultura que também cresce *Cryptococcus spp* e outros gêneros de leveduras. Tal fato é observado em nosso laboratório, para onde são

encaminhadas culturas de leveduras, principalmente de corrente sanguínea, previamente identificadas como *Candida sp* e, ao serem reidentificadas, tratavam-se do gênero *Cryptococcus spp*.

A identificação das espécies de *Cryptococcus* pode ser realizada por método manual de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio e provas complementares como hidrólise da ureia, crescimento em várias temperaturas e prova de CGB (Canavanina, Glicina e indicador azul de Bromotimol) (Fell et al., 1998). A prova de CGB é de fácil execução e deve ser utilizada apenas para separar as duas espécies antes englobadas como *C. neoformans*. O teste de CGB pode apresentar resultado falso positivo se for semeado um inóculo pesado de levedura ou se houver contaminação.

Os laboratoristas que utilizarem métodos comerciais e não realizarem prova complementar de CGB para a diferenciação das espécies *C. neoformans* e *C. gattii*, mesmo que esses métodos cheguem ao resultado de *C. neoformans* (taxonomia antiga que engloba as duas novas espécies), deverão liberar o laudo como *Cryptococcus spp* ou pertencente ao complexo das espécies *C. neoformans/C. gattii*.

REFERÊNCIAS

1. Kwon-Chung KJ, Varma SA. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? FEMS Yeast Res; 2006;6:574-587.
2. Pappalardo, MCSM, Szeszs MW, Martins MA, Baceti LB, Bonfietti LX, Purisco SU et al. Susceptibility of clinical isolates of *C. neoformans* to amphotericin B using time-kill methodology. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2009.
3. Moretti ML, Resende MR, Lazera MS, Colombo AL, Shikanai - Yasuda MA. Consenso em cryptococcosis - Rev. Soc. Bras. Med. trop, 2008;41(5):524-44.
4. Mendes-Giannini MJS, Melhem MSC. Infecções Fúngicas. In Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes. Rio de Janeiro; Guanabara Koogan; 2001; p.334- 403.