

CRÍPTOCOCOSE. ESTUDO DE 9 ESTIRPES DE *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* ISOLADAS DE DOENTES IMUNODEFICIENTES

GUSTAVO NOBRE, MARIA ODETE RAMALHO, ERMELINDA MENDES, MARIA JOSÉ CHARRUA

Instituto Bacteriológico Câmara Pestana; Serviço de Patologia Clínica do Hospital Curry Cabral. Lisboa. Laboratório de Patologia Clínica do Centro de Saúde da Amadora. Amadora.

RESUMO

Estudaram-se 9 estirpes de *Cryptococcus neoformans*, das quais, 5 isoladas do líquido céfalo-raquidiano e 4 do sangue de doentes com síndrome de imunodeficiência adquirida. No aspecto morfológico eram todas idênticas. Em algumas, o auxanograma afastou-se do padrão clássico. Todas se revelaram patogénicas para o rato, por via intracerebral. Seis estirpes eram sensíveis à 5-fluorocitosina e as outras três resistentes. Todas eram sensíveis aos restantes antifúngicos ensaiados, nistatina, anfotericina B, clotrimazol, miconazol, econazol e cetoconazol.

SUMMARY

Cryptococcosis. A study of nine isolates of Cryptococcus neoformans from AIDS patients

Five strains of *Cryptococcus neoformans* isolated from the cerebro-spinal fluid and 4 from the blood of AIDS patients, were studied. Although morphologically identical, they differed in the auxanographic pattern. All strains were pathogenic for mice by intracerebral route. Six isolates were sensitive and the other three resistant to 5-fluorocytosine. All strains were sensitive to the other antifungal tested: nystatin, amphotericin B, clotrimazole, miconazole, econazole and ketoconazole.

INTRODUÇÃO

A criptococose é uma micose sistémica provocada por uma levedura capsulada, *Cryptococcus neoformans*. A doença ocorre em todo o Mundo. Embora as formas clínicas sejam muito variadas, a meningoencefalite está presente em mais de metade dos casos. As lesões pulmonares são também relativamente frequentes. Outras localizações, como, cerebrais, cutâneas, ósseas, hepáticas e renais observam-se com menor frequência.

A meningoencefalite, geralmente, tem início insidioso com febre, cefaleias, vertigens, vômitos, alterações do comportamento e sinais focais. O curso pode ser agudo, mas são frequentes as formas arrastadas ou crónicas, de alguns meses a vários anos^{1,2}.

São condições predisponentes da criptococose, variadas situações de compromisso imunitário, como, síndrome de imunodeficiência adquirida, doença de Hodgkin, sarcoidose, lupus eritematoso sistémico e outras doenças do colagénio, linfomas, carcinomas, leucemia, corticoterapia sistémica, transplantação renal, diabetes mellitus.

A criptococose é, a par da candidíase, toxoplasmose, pneumocistose, criptosporidiose e micobacterioses, uma das infecções que ocorre com maior frequência, em doentes com SIDA³. Geralmente, o aumento do número de casos de criptococose num país, precede ou acompanha o aumento do número de casos de SIDA. No Zaire, por exemplo, a partir de 1981 e durante um período de 18 meses, só no Mama Yemo General Hospital de Kinshasa, foram diagnosticados 15 casos de criptococose⁴. Em Portugal poucos casos foram publicados antes de 1980^{5,7}. Em Dezembro de 1985, estavam referidos, pelo menos, 2 casos de criptococose em doentes com SIDA⁸ e actualmente, já estão referidos na literatura médica nacional, mais de 12 casos^{9,10}.

Cryptococcus neoformans é uma levedura que, em geral, não produz micélio ou pseudomicélio e que em situações de parasitismo e, *in vitro*, em meios com maltose e sacarose, desenvolve cápsula. Cresce bem nos meios habituais onde forma colónias cremosas, lisas, de cor branca, muito parecidas com as colónias de *Candida albicans*.

Como características importantes do género *Cryptococcus*, devem referir-se, a ausência de micélio ou pseudomicélio, a não produção de gases dos açúcares, a actividade ureásica, a assimilação do inositol e a produção de amido nos meios de cultura.

Cryptococcus neoformans assimila, geralmente, a glucose, maltose, sacarose, galactose, sorbitol, inositol, xilose, raminose, trealose, dulcitol, melezitose e rafinose; não assimila a lactose, glicerol, xilitol e melibiose; não utiliza o nitrato de potássio e é inibido pela ciclo-heximida. As colónias produzem um pigmento castanho (melanina ou compostos análogos) quando desenvolvidas em meio, contendo vários polifenóis ou extracto de certas sementes (*Guizotia abyssinica*). Tal facto, deve-se à presença no fungo de uma fenoloxidase, sendo o único membro do género e a única levedura conhecida em que esta reacção é positiva utilizando como substractos o- e p- difenóis^{11,12}.

Considera-se a existência no *C. neoformans* de 4 serotipos: A, B, C e D. A maior parte das estirpes isoladas da natureza são *mating-types* de formas perfeitas que se situam no género *Filobasidiella*, criado especialmente para tal fim. Entre os serotipos A/D e B/C, há diferenças morfológicas, fisiológicas e de homologia do ADN, de tal modo, que se consideraram duas variedades diferentes de *C. neoformans*: A/D—var. *neoformans* e B/C—var. *gatti*. Os serotipos B/C, contrariamente aos serotipos A/D, assimilam a glicina

como única fonte de carbono, utilizam rapidamente a creatinina, são muito resistentes à ciclo-heximida e são fracamente patogênicos para o ratinho^{13,14}.

Os serotipos A/D são os que se encontram mais difundidos por todo o Mundo. Os serotipos B/C encontram-se limitados a certas regiões dos E.U.A. e Sueste Asiático¹⁵.

O fungo encontra-se na natureza associado, muito em particular, com excrementos de pombos acumulados em certos locais e metaboliza as purinas e a creatinina. Embora o fungo provoque doença em animais, como, gatos, cães e várias espécies de animais de abate, não é capaz de provocar doença em aves, provavelmente, por não tolerar a sua temperatura normal. Nunca se demonstrou transmissão de animais ao homem e de homem a homem.

Os aspectos morfológico, fisiológico e de virulência para o ratinho e sensibilidade a antifúngicos, de 9 estirpes de *Cryptococcus neoformans* isoladas de doentes com síndrome de imunodeficiência adquirida, em instituições hospitalares de Lisboa, são apresentados no presente trabalho,

MATERIAL E MÉTODOS

Estirpes

As 9 estirpes estudadas, foram isoladas, oito no Hospital Curry Cabral e uma no Hospital Pulido Valente, no período decorrido entre Julho de 1984 e Agosto de 1989, sendo 5 delas do líquido céfalo-raquidiano e 4 do sangue.

Características Morfológicas

As culturas efectuaram-se em meio de farinha de milho-agar (Cornmeal-agar, Difco) segundo técnica descrita anteriormente¹⁶, a fim de avaliar a capacidade de formação de pseudomicélio.

Na indução da formação de cápsula, cuja presença se verificou ao microscópio com tinta da china, utilizou-se o meio de Sabouraud-maltose¹⁷.

Características Fisiológicas

Em cada uma das estirpes, estudaram-se, a capacidade de desenvolvimento a 37°C, o desdobramento da ureia, a produção de amido, a formação de pigmento de compostos difenólicos, a assimilação de glicose, glicerol, 2-ceto-D-gluconato, l-arabinose, xilose, adonitol, xilitol, galactose, inositol, sorbitol, metil-D-glucosido, N-acetil-D-glucosamina, celobiose, lactose, maltose, sacarose, trealose, melezitose, rafinose, glicina, creatinina e nitrato de potássio.

No desdobramento da ureia usou-se o meio de Christensen¹⁸. Na produção de amido seguiu-se o método descrito por Lodder e Kreger-Van Rij¹⁹. No estudo da formação de pigmento a partir de compostos difenólicos usou-se o ácido cafeico (ácido 3,4-dihidroxicinâmico, Aldrich) segundo método de Hopfer e Blank²⁰. Na assimilação da glicina usou-se o meio preconizado por Salkin e Hurd¹⁴. Na assimilação da creatinina seguiu-se o método descrito por KwonChung e col.¹³ e para o nitrato de potássio o método de Lodder e Kreger-Van Rij¹⁹. No estudo da assimilação dos restantes substratos usou-se o sistema API 20 Aux (API System S.A.).

Virulência para o Ratinho

As 9 estirpes inocularam-se em ratinhos adultos, por via intracerebral, com inóculos de 10⁵, 10⁶ e 10⁷ células em grupos de 10 animais. O volume a inocular foi de 0,05 ml da suspensão da levedura em soluto de cloreto de sódio a 9 p. 1000²¹. Os ratinhos mantiveram-se em observação durante 1 mês, tendo sido registada a mortalidade.

Sensibilidade a Antifúngicos

Fez-se em placa por difusão em agar, com o método dos discos²², tendo-se utilizado o meio Yeast Morphology Agar, Difco e discos do Instituto Pasteur (Paris) com as seguintes concentrações: 5-fluorocitosina 1 µg, nistatina 100 µg, anfotericina B 100 µg, clotrimazol 50 µg, miconazol 50 µg e cetoconazol 50 µg. As estirpes em que se verificou um diâmetro de área de inibição ≤ 10 mm, foram consideradas resistentes.

RESULTADOS

Nas primoculturas as colónias eram, em geral, lisas, cremosas, muito parecidas com as colónias de *Candida albicans*. Colónias mucoides, aspecto que acompanha a produção de cápsula, surgiram, apenas, após passagens para meio de Sabouraud-maltose. Nenhuma das estirpes formou pseudomicélio em meio de farinha de milho-agar.

Todas as estirpes se desenvolveram a 37°C, desdobram a ureia e formaram pigmento a partir do ácido cafeico, tendo 8 delas produzido amido. Todas assimilaram a glicose, 2-ceto-D-gluconato, galactose, inositol, sorbitol, metil-D-glucosido, N-acetil-D-glucosamina, maltose, sacarose, melezitose. Os resultados da assimilação da arabinose, xilose, adonitol, celobiose, trealose e rafinose foram variáveis e nenhuma das estirpes assimilou o glicerol, xilitol, lactose, glicina, creatinina e nitrato (Quadro 1).

A inoculação, por via intracerebral, no ratinho, levou em todas as estirpes, à morte da maior parte dos animais, no período de observação de 1 mês. Todavia, parece haver diferenças de virulência entre as várias estirpes. A estirpe 19025, foi a única que provocou 100% de mortalidade mesmo com o inóculo mais fraco (Quadro 2). No cérebro dos animais mortos observou-se, a fresco, com tinta da china, grande constância de formas capsuladas de *C. neoformans* (Fig. 1).

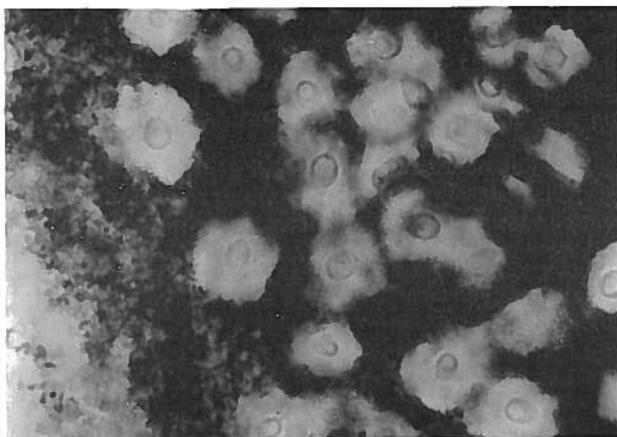
No que se refere à sensibilidade *in vitro* aos antifúngicos, seis das estirpes revelaram-se sensíveis à 5-fluorocitosina e as três restantes, resistentes. Todas se mostraram sensíveis aos outros fármacos ensaiados.

QUADRO 1—Estudo da capacidade de assimilação (número de estirpes positivas) de 9 estirpes de *Cryptococcus neoformans*

| | |
|------------------------|---|
| Glucose | 9 |
| Glicerol | 0 |
| 2-ceto-D-gluconato | 9 |
| L-arabinose | 6 |
| Xilose | 8 |
| Adonitol | 8 |
| Xilitol | 0 |
| Galactose | 9 |
| Inositol | 9 |
| Sorbitol | 9 |
| Metil-D-glucosido | 9 |
| N-acetil-D-glucosamina | 9 |
| Celobiose | 5 |
| Lactose | 0 |
| Maltose | 9 |
| Sacarose | 9 |
| Trealose | 5 |
| Melezitose | 9 |
| Rafinose | 8 |
| Glicina | 0 |
| Creatinina | 0 |
| Nitrato de potássio | 0 |

QUADRO 2—Resultados da inoculação intracerebral em ratinhos, das estirpes de *Cryptococcus neoformans* estudadas. Observação durante 1 mês

| Estirpe | N.º de ratinhos mortos/n.º de ratinhos inoculados, para os inóculos indicados | | |
|---------|--|-----------------|-----------------|
| | 10 ⁷ | 10 ⁶ | 10 ⁵ |
| 339 | 8/10 | 9/10 | 7/10 |
| 39 138 | 9/10 | 6/10 | 5/10 |
| 3 251 | 7/10 | 7/10 | 6/10 |
| 19 025 | 9/10 | 10/10 | 10/10 |
| 19 031 | 10/10 | 10/10 | 9/10 |
| 19 286 | 10/10 | 10/10 | 9/10 |
| 51 080 | 10/10 | 10/10 | 9/10 |
| 18 408 | 10/10 | 10/10 | 8/10 |
| 24 442 | 10/10 | 10/10 | 9/10 |


 Fig. 1—*Cryptococcus neoformans*. Preparação de cérebro de ratinho. Observação com tinta da china, 800 X.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

No aspecto morfológico, as nove estirpes, eram praticamente idênticas. O auxanograma foi variável com a estirpe e nalgumas afastou-se um pouco do padrão clássico. Contudo, pode dizer-se que a identificação do fungo foi sempre fácil, apoiada na capacidade de desenvolvimento a 37.°C e na patogenicidade para o ratinho.

Embora não tivéssemos efectuado tipagem serológica, presumiu-se que as estirpes isoladas eram dos serotipos A/D, uma vez que não assimilaram a glicina nem a creatinina^{13,14}.

No estudo da virulência para o ratinho, optou-se pela via intracerebral aconselhada por Cooper e Silva-Hutner²¹, por se ter verificado, em experiências preliminares, que raramente levavam à morte dos animais, as estirpes inoculadas por via intraperitoneal e que por via endovenosa a virulência se perdia após passagens sucessivas. Por via intracerebral, verificou-se também maior mortalidade nos ratinhos inoculados com estirpes mantidas há menos tempo no laboratório.

No que se refere à sensibilidade a antifúngicos, os resultados estão de acordo com dados já conhecidos, isto é, a

inconstância de sensibilidade à 5-fluorocitosina. Todas as estirpes estudadas se revelaram sensíveis aos derivados do imidazol, todavia, devemos chamar a atenção para a dificuldade com que alguns destes atravessam a barreira hematoencefálica²³.

BIBLIOGRAFIA

- EMMONS C.W., BINFORD C.H., UTZ J.P., KWON-CHUNG K.J.: Medical Mycology, 3.º ed., Lea & Fetiger, Philadelphia 1977, pp 206.
- HAY R.J., MACKENZIE D.W.R., CAMPBELL C.K., PHILPOT C.M.: Cryptococcosis in the United Kingdom and the Irish Republic: an analysis of 69 cases. *J Infection* 1980; 2: 13-22.
- ADLER M.W.: ABC of AIDS. Development of the epidemic. *Br Med J* 1987; 294: 1083-1085.
- VANDEPITTE J., VERWILGHEN, ZACHES P.: Aids and cryptococcosis. *Lancet* 1983; i: 925-926.
- CRESPO C.F., ARAUJO F.C.: Meningite por *Cryptococcus neoformans* (A propósito de um caso clínico). *J Médico* 1966; 59: 203-212.
- FURTADO D., LEITE S., SILVA M., RÉ L., FREITAS A.: Criptococose meningo-encefálica. Primeiro caso diagnosticado em vida e tratado em Portugal. *J Médico* 1961; 44: 13.
- RODRIGO F.G., CABRITA J.: Criptococose (Caso com lesões multiplas da pele e dos órgãos internos e sem compromisso meningeoencefálico). *J. Médico* 1970; 71: 1021-1024.
- GRUPO DE TRABALHO DA SIDA: Situação em Portugal em 31 de Dezembro de 1985. Centro de vigilância epidemiológica de doenças transmissíveis. Lisboa 1986.
- MIRANDA A.M., FIGUEIREDO P., GOMES M.H., LECOUR H.: Meningite criptocócica em doentes com SIDA. 1.º Cong Ibérico Doenças Inf e Microbiol Clínica. Funchal 1989.
- MONTEIRO J.A., GUIMARÃES P., SOUSA J.A. e col.: Três anos de SIDA. Experiência do Hospital Curry Cabral com a infecção pelo HIV (1985-1988). *Acta Méd Port* 1989; 6: 270-275.
- CHASKES S., TYNDALL R.I.: Pigment production by *Cryptococcus neoformans* from para — and ortho — diphenols: effect of the nitrogen source. *J Clin Microbiol* 1975; 1: 509-514.
- CHASKES S., TYNDALL P.L.: Pigment production by *Cryptococcus neoformans* and other *Cryptococcus* species from aminophenols and diamino benzenes. *J Clin Microbiol* 1987; 7: 146-152.
- KWON-CHUNG K.J., PELACHECK I., BENNET J.E.: 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* 1982; 15: 535-537.

14. SALKIN I.F., HURD N.J.: New medium for differentiation of *Cryptococcus neoformans* serotype pairs. *J Clin Microbiol* 1982; 15: 169-171.
15. FROMTLING R.A., SHADOMY S., SHADOMY H.J., DISMUKES W.E.: Serotype B/C *Cryptococcus neoformans* isolated from patients in non endemic areas. *J Clin Microbiol* 1982; 16: 408-410.
16. NOBRE G., RAMALHO M.C.: Fungos leveduriformes de origem humana. *Bol Clin Hosp Cívica de Lisboa* 1969; 33: 31-37.
17. ESTEVES J.A., CABRITA J.D., NOBRE G.N.: Micologia Médica. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa 1977, pp 719.
18. CHRISTENSEN W.B.: Urea decomposition as a means of differentiating *Proteus* and paracolon cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella*. *J Bact* 1946; 52: 461-466.
19. LODDER J., KREGER-VAN RIJ N.J.W.: The yeasts. A taxonomic study. 2° ed. North-Holland Pub Co, Amsterdam, 1967, pp. 26 e 31.
20. HOPFER R.L., BLANK F.: Caffeic acid-containing medium for identification of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol* 1975; 2: 115-120.
21. COOPER B.H., SILVA-HUTNER M.: Yeasts of medical importance, *In*, Manual of Clinical Microbiology, 4.º ed. Lenette e col American Society for Microbiology, Washington, DC, 1985, pp. 526.
22. DROUHET E. BARALE T., BASTIDE J. e col.: Standardisation de l'antibiogramme antifongique. Rapport du groupe d'études de la Société Française de Mycologie Médicale. *Bull Soc Franç Myc Méd* 1981; 10: 131-134.
23. NOBRE G.: Antifúngicos. *O Médico* 1989; 121: 368-372.

Pedido de Separatas:

G. Nobre
Rua Raul Brandão n.º 9
1700 Lisboa