

BRITTO, S. C. A; SILVA, Maria do Rosário Rodrigues. Isolamento, Identificação e Caracterização fenotípica de *Cryptococcus neoformans* obtidos de amostras clínicas na cidade de Goiânia – GO. In: CONGRESSO DE PESQUISA, ENSINO E EXTENSÃO DA UFG - CONPEEX, 2., 2005, Goiânia. *Anais eletrônicos do XIII Seminário de Iniciação Científica* [CD-ROM], Goiânia: UFG, 2005. n.p.

Isolamento, Identificação e Caracterização fenotípica de *Cryptococcus neoformans* obtidos de amostras clínicas na cidade de Goiânia – GO.

Britto, Sula Cristina Assis; **SILVA**, Maria do Rosário Rodrigues; **FERNANDES**, Orionalda de Fátima Lisboa; **SOUZA**, Lúcia kioko Hasimoto; **KOBAYASHI**, Cláudia Artiaga Castelo Branco; **BASTOS**, Angélica Lima; **SOARES**, Célia Maria Almeida; **PAULA**, Claudete Rodrigues; **GAMBALE**, Walderez.

Número de cadastro da inscrição: 22000000263

Unidade Acadêmica onde o trabalho foi desenvolvido: Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública

E-mail (do aluno bolsista e do orientador): sulacab@hotmail.com, rosario@iptsp.ufg.br

Palavras-chave: *Cryptococcus neoformans*, patogenicidade.

Introdução: A criptococose, causada pelo *Cryptococcus neoformans*, é capaz de produzir infecções graves, principalmente no sistema nervoso central de pacientes imunocomprometidos, particularmente em indivíduos com AIDS. *C. neoformans* tem como habitat natural o meio ambiente, sendo que a infecção pode ser adquirida através da inalação de basidiósporos e/ ou leveduras viáveis e dessecadas presentes no solo, vegetais, ocos de árvores, excrementos de pombos e torres de igrejas. Esta levedura apresenta duas variedades: *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipos A, D e AD) e *C. neoformans* var. *gattii* (sorotipos B e C). Fatores fenotípicos como presença de cápsula polissacarídica, produção de fenoloxidase, crescimento a 37° C, produção de exoenzimas e suscetibilidade a antifúngicos, podem interferir na patogênese deste fungo, favorecendo a invasão ao tecido do hospedeiro, e a existência de variabilidade genética pode ser traduzida em diferenças de virulência ou resposta à terapia. O estudo da suscetibilidade *in vitro* aos antifúngicos oferece a possibilidade de obter dados confiáveis ao selecionar um medicamento, uma vez que se conseguem dados quantitativos de concentração inibitória mínima, caracterizando um isolado clínico em sensível ou resistente frente ao antifúngico. O NCCLS aceita o método de macrodiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima para leveduras. Tendo em vista a frequência das infecções fúngicas oportunistas como criptococose nos pacientes com AIDS, com resultados terapêuticos nem sempre satisfatórios, objetivamos sorotipar os isolados de *Cryptococcus neoformans* em A, B, C, D e AD, caracterizá-los em relação aos seus principais fatores de virulência e avaliar sua suscetibilidade para anfotericina B, fluconazol e itraconazol.

Metodologia: As amostras clínicas foram obtidas a partir do cultivo no Agar sabouraud dextrose mantidos a 28°C de líquido cefalorraquidiano de pacientes com AIDS, no Laboratório de Saúde Pública Dr. Giovanni Cysneiros, de agosto de 2004 a fevereiro de 2005. Identificação de gênero e espécie: cultivo em ágar Sabouraud dextrose e em ágar DOPA com cloranfenicol para verificar a produção de melanina caracterizando a produção da fenoloxidase (pigmentação marrom); visualização microscópica com tinta da China (visualização da cápsula) e testes fisiológicos como produção de urease e termotolerância a 37°C. Quimiotipagem: em meio de CGB para diferenciar *C. neoformans* variedade *neoformans* de *C. neoformans* variedade *gatti*. Sorotipagem: teste de aglutinação em lâmina, utilizando anticorpos policlonais monoespecíficos. Produção de proteinase e de fosfolipase: a atividade enzimática foi medida através do cálculo da razão entre o diâmetro da colônia (dc) e o diâmetro da colônia mais a zona de degradação (dcp). Produção de Urease: a produção da enzima urease foi observada pela viragem do indicador de pH. Teste de suscetibilidade: Anfotericina B e itraconazol foram dissolvidos em dimetil sulfoxido, e fluconazol em água destilada, em seguida, as diluições de cada antifúngico foram preparadas com meio de RPMI 1640 contendo MOPS. Inóculo: a suspensão dos isolados após cultivo de 48 h foi preparada em salina estéril (0,85%) ajustada com um espectrofotômetro a uma densidade celular de acordo com a escala 0,5 de McFarland a uma transmitância de 530 nm. A suspensão foi diluída a 1:50 e depois 1:20 em RPMI para obter uma concentração final de 1×10^3 a 5×10^3 CFU/mL. Os poços da placa foram cobertos com 100 μ L das diferentes concentrações dos antifúngicos adicionados a 100 μ L da suspensão dos isolados. O inóculo final 0.5×10^3 a 2.5×10^3 CFU/mL e as concentrações das drogas variaram de 0,03 a 64 μ g/mL para fluconazol e de 0.007 a 16 μ g/mL para itraconazol e anfotericina B. As placas foram incubadas a 35°C e lidas após 72 h. Os valores da concentração inibitória mínima foram definidos como a menor concentração da droga capaz de inibir 50 e 90% de crescimento visível comparado ao crescimento do controle sem a droga.

Resultados e discussão: das 20 amostras clínicas coletadas dos pacientes 18 cepas foram isoladas e identificadas como *C. neoformans* e 2 foram identificadas como *Cryptococcus albidus*. Ao exame microscópico com tinta nanquim verificou-se que todos os 18 isolados de *C. neoformans* apresentavam-se como células esféricas ou globosas envolvidas por cápsula volumosa de material mucopolissacarídeo,

apresentaram-se também positivos ao teste da urease (diferenciando-os das espécies de *Cândida*, que não a produz). Os isolados apresentaram uma habilidade de crescimento a 37°C. No ágar Dopa os 18 isolados foram capazes de produzir fenoloxidase, ou seja, houve a formação de pigmentação marrom ou negra, mostrando que estes microorganismos se tratam de *C. neoformans*. O cultivo das 18 amostras em agar CGB mostrou que nenhum dos isolados cresceu, sendo quimiotipados em *C. neoformans* variedade *neoformans*, outros trabalhos também mostram essa variedade como a mais comum no Brasil. A sorotipagem realizada para estes isolados permitiu classificá-los como sendo todos (18) do sorotipo A, compatível com dados da literatura. Produção de fosfolipase: 8 foram fortemente produtores desta enzima, 9 foram produtores e apenas 1 não produziu a enzima. Proteinase não foi realizada neste trabalho. Suscetibilidade *in vitro* dos isolados clínicos: Anfotericina B – CIM₅₀=0,5 µg/ml, Fluconazol – CIM₅₀=2,0 µg/ml e Itraconazol – CIM₅₀=0,125 µg/ml, mostrando que todos os isolados foram sensíveis as drogas.

Conclusão: A virulência expressa por *C. neoformans* verificada em nosso estudo mostra que este microrganismo é capaz de produzir quadro clínico grave que podem levar o paciente a morte. Portanto, o teste de suscetibilidade *in vitro*, deve ser realizado para todos os isolados.

Bibliografia:

1. BUCHANAN, K.L. AND MURPHY, J.W. *What makes Cryptococcus neoformans a pathogen?* Infect. Diseases. 4: 71-80, 1998
2. CHANDENIER, J.; ADOU-BRYN, K.D.; DOUCHET, C. *et al.* - *In vitro* activity of amphotericin B, fluconazole and voriconazole against 162 *Cryptococcus neoformans* isolates from Africa and Cambodia. Europ. J. Clin. Microbiol. infect. Dis., 23: 506-508, 2004.
3. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard. Document M27-A2. Villanova, NCCLS, 2002. v. 17, n. 9.
4. TANAKA, R.; NISHIMURA, K.; IMANISHI, Y.; TAKAHASHI, I.; HATA, Y.; MIYAJI, M. *Analysis of Serotype AD strains from F1 Progenies between Urease-positive and Negative Strains of Cryptococcus neoformans.* Jpn. J. Med. Mycol. Japan. Vol.44. 293-297,2003.

