

Técnicas histopatológicas no diagnóstico de criptococose por *Cryptococcus* deficiente de cápsula: relato de caso

Histopathological techniques for diagnosing cryptococcosis due to capsule-deficient *Cryptococcus*: case report

Alexandra Flávia Gazzoni¹, Karla Lais Pegas² e Luiz Carlos Severo³

RESUMO

Caso de criptococose por *Cryptococcus* deficiente de cápsula, no qual cultivo do espécime clínico e pesquisa do antígeno capsular no líquido e soro foram negativos. As técnicas histopatológicas foram: Hematoxilina-eosina, Grocott, Mucicarmim de Mayer e Fontana-Masson. Confirmou-se o diagnóstico do *Cryptococcus* deficiente de cápsula pela técnica de Fontana-Masson e pela imunofluorescência direta. É discutida a potencialidade das técnicas histoquímicas.

Palavras-chaves: *Cryptococcus* deficiente de cápsula. Mucicarmim de Mayer. Fontana-Masson.

ABSTRACT

A case of cryptococcosis due to capsule-deficient *Cryptococcus* is presented, in which culturing of the clinical specimen and tests for capsular antigen in cerebrospinal fluid and serum were negative. The histopathological techniques evaluated were hematoxylin-eosin, Grocott methenamine silver, Mayer's mucicarmine and Fontana-Masson. The diagnosis of cryptococcosis due to capsule-deficient *Cryptococcus* was confirmed by means of the Fontana-Masson technique and by direct immunofluorescence. The potential of the histochemical techniques is discussed.

Key-words: Capsule-deficient *Cryptococcus*. Mucicarmine. Fontana-Masson.

A criptococose é uma micose sistêmica causada fundamentalmente por duas espécies do basidiomiceto, naturalmente encapsulado *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. Enquanto o *Cryptococcus neoformans* tem distribuição mundial, é sapróbio do solo e está presente em maior abundância em ambientes contaminados pelas fezes de pombos, o *Cryptococcus gattii* fica praticamente restrito a climas tropicais e subtropicais e está associado a árvores como *Eucalyptus camaldulensis*².

O estabelecimento do diagnóstico laboratorial da criptococose é feito pelos achados microscópicos (exame direto e histopatologia), isolamento em cultivo e soromicologia, realizada pelo teste de aglutinação das partículas do látex através da detecção do antígeno capsular. As características micromorfológicas do *Cryptococcus* são elementos esféricos a ovais, com ou sem brotamentos, medindo de 4 a 20 µm de diâmetro, envoltos por uma cápsula gelatinosa². Contudo, a literatura registra casos de criptococose sem estas características, dificultando o diagnóstico por simular outros elementos fúngicos^{1 4 5 6 7 12 13 14 15 16 17 18}, o que demanda uma técnica laboratorial mais específica^{8 15}.

Justifica o relato a avaliação das potencialidades e limitações diagnósticas das técnicas histopatológicas na criptococose.

RELATO DO CASO

Paciente feminina, de 42 anos, branca, natural e procedente de Guaíba, Rio Grande do Sul. Interna com tosse seca, cefaléia, dor ventilatório-dependente no hemitórax direito e febre. Exame físico sem particularidades. Radiografia do tórax revelou nódulos subpleurais no lobo inferior do pulmão direito. Realizada toracotomia à direita. A macroscopia da peça cirúrgica evidenciou três nódulos subpleurais de aspecto caseoso. Realizada punção líquórica, o exame microbiológico do líquido mostrou ausência de germes aos esfregaços corados; os cultivos para bactérias, micobactérias e fungos obtiveram resultados negativos.

Espécime clínico. Peça cirúrgica de tecido pulmonar macroscopicamente alterado foi submetido a processamento histológico padrão e incluso em blocos de parafina. A seguir, os cortes foram corados por meio de técnicas padronizadas⁸.

Técnicas histoquímicas. Hematoxilina-eosina (HE): rotina no diagnóstico histológico e de grande utilidade na avaliação dos padrões de reações teciduais^{5 9}.

Grocott: também chamada de impregnação pela prata é a mais sensível, sendo largamente utilizada na pesquisa dos

1. Curso de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. 2. Departamento de Patologia, Santa Casa-Complexo Hospitalar, Porto Alegre, RS. 3. Departamento de Medicina Interna, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

Endereço para correspondência: Dr. Luiz Carlos Severo. Laboratório de Micologia/Santa Casa Complexo Hospitalar. Rua Anne Dias 285, 90020-090 Porto Alegre, RS.

Tel: 55 51 3214-8409

e-mail: severo@santacasa.tche.br

Recebido para publicação em: 10/09/2007

Aceito em: 15/01/2008

elementos fúngicos tanto nos cortes de tecido, quanto nos esfregaços, corando de negro a parede celular, que é visualizada sobre um fundo verde-claro^{8,9}.

Mucicarmim de Mayer: diferencia o *Cryptococcus* de outros fungos similares em tamanho e forma. Método exclusivo de visualização do material polissacarídico capsular. O carmim liga-se a mucina, a qual destaca-se dos outros componentes celulares pela coloração magenta^{3,9,11}.

Fontana-Masson: evidencia a parede celular fúngica por reagir com pigmentos de melanina, bem como grânulos argentafins. A melanina corada destaca-se do restante do tecido, que adquire coloração amarelada^{8,9,11}.

Imunofluorescência: técnica restrita a único centro de referência, baseada na formação de um conjugado composto por anticorpos fluorescentes específicos e antígenos do polissacarídeo capsular³.

Soromicologia. teste de detecção do antígeno polissacarídeo capsular através da aglutinação das partículas de látex sensibilizadas².

A Tabela 1 resume as finalidades e limitações das colorações histoquímicas quando do diagnóstico de criptococose por *Cryptococcus* deficiente de cápsula.

Posteriormente, houve análise microscópica comparativa entre a técnica de rotina (HE) e três técnicas especiais da micologia.

Aos cortes, os achados microscópicos à coloração de hematoxilina-eosina revelaram lesões granulomatosas, de intensa resposta inflamatória, constituídas por macrófagos, coleções nodulares de células epitelióides (macrófagos modificados que adquirem citoplasma mais pálido, à semelhança das células epiteliais), células gigantes e fagocitose. Alguns linfócitos estavam

dispostos periféricamente (Figura 1A). Não foram identificados polimorfonucleares. Alguns organismos esféricos de tamanho variável foram identificados no interior dos granulomas (Figura 1B). A coloração de Grocott revelou numerosos organismos dispostos ora dentro de células gigantes (fagocitados), ora no tecido necrótico e espaço extracelular. A parede celular dos elementos fúngicos corou-se de marrom-escuro a preto, sem visualização do espaço claro circundante. Raramente, se observou elementos com brotamento unipolar (Figura 1C). A coloração de mucicarmim de Mayer para estrutura capsular foi fracamente reativa (Figura 1D). A melanina foi evidenciada com a coloração de Fontana-Masson, a qual variou de marrom-escuro a negra (Figura 1E). Duas técnicas diagnósticas foram realizadas no CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*), Atlanta, EUA. A pesquisa do antígeno polissacarídico capsular (aglutinação com partículas de látex sensibilizadas) no líquido cefalorraquidiano e no soro que foram negativas. A técnica de imunofluorescência direta, obtendo resultados fracamente reativos para material capsular, confirmando o diagnóstico de *Cryptococcus* deficiente de cápsula.

Tabela 1 - Finalidades e limitações das técnicas histopatológicas no diagnóstico da criptococose por *Cryptococcus* deficiente de cápsula.

Finalidades	Limitações
HE reação tecidual	não evidencia as estruturas fúngicas
GMS cora parede celular dos fungos	complexidade no procedimento alto custo
MM cora envelope capsular	insuficiente no diagnóstico de <i>Cryptococcus</i> deficientes de cápsula
FM cora melanina na parede celular fúngica	complexidade no procedimento alto custo

HE: hematoxilina-eosina, GMS: Grocott-methenamine silver, MM: mucicarmim de Mayer, FM: Fontana-Masson.

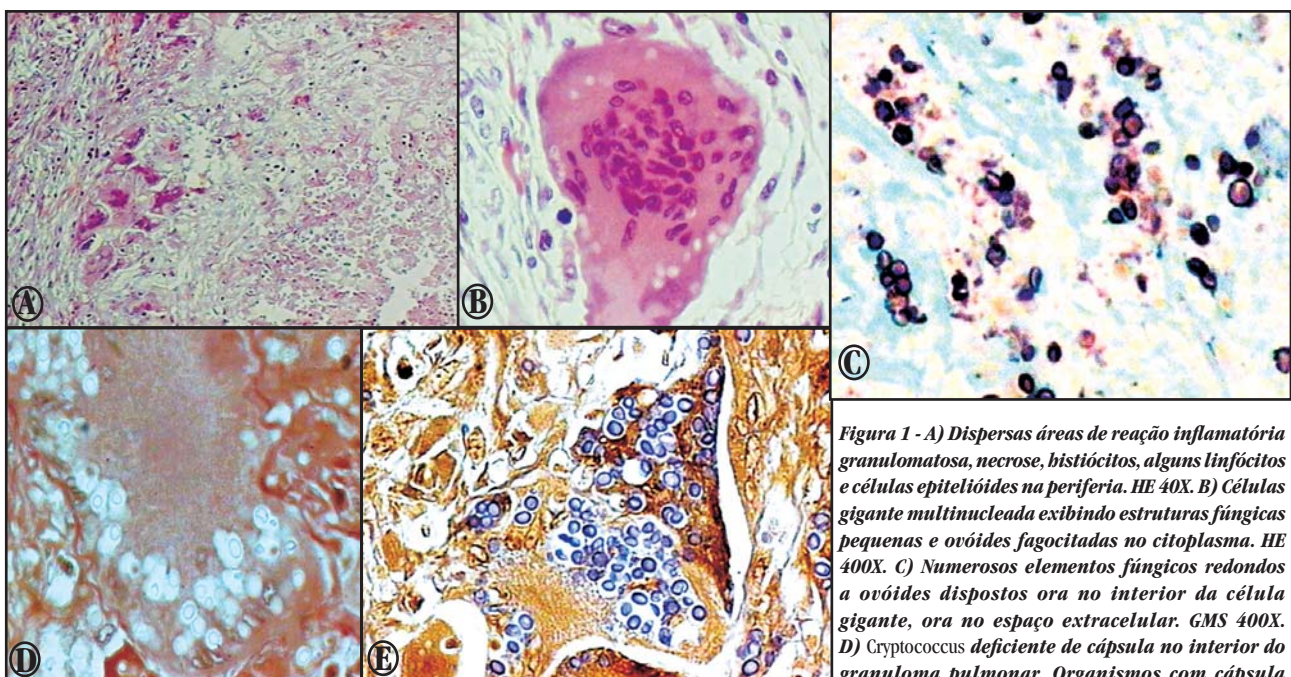


Figura 1 - A) Dispersas áreas de reação inflamatória granulomatosa, necrose, histiócitos, alguns linfócitos e células epitelióides na periferia. HE 40X. B) Células gigante multinucleada exibindo estruturas fúngicas pequenas e ovóides fagocitados no citoplasma. HE 400X. C) Numerosos elementos fúngicos redondos a ovóides dispostos ora no interior da célula gigante, ora no espaço extracelular. GMS 400X. D) *Cryptococcus* deficiente de cápsula no interior do granuloma pulmonar. Organismos com cápsula atenuada fracamente reativa nos cortes corados com Mucicarmim de Mayer. MM 400X. E) Elementos fúngicos positivamente reativos com a coloração de Fontana-Masson. Reatividade pela parede celular criptocócica contendo pigmentos de melanina. A reação positiva não depende do polissacarídeo capsular. FM 400X.

DISCUSSÃO

A literatura mostra relatos de criptococose pulmonar⁵ e disseminada¹⁴ por formas deficientes de cápsula. Em 28 casos revisados, 14 (50%) pacientes exibiam infecção pulmonar^{4 5 15 17} e os outros 14 (50%) pacientes apresentavam sinais de doença extrapulmonar: meningite^{1 16}, sepse¹, sepse concomitante com meningite¹⁴, infecção óssea⁶, prostatite¹³ e artrite¹². O diagnóstico histopatológico foi realizado em 17 (61%) pacientes^{4 5 6 7 12 13 15}. A técnica de hematoxilina-eosina foi realizada em 9 (53%) pacientes^{3 5 6 7 12 13 15}, com observação de granuloma, célula gigante e fagocitose em 100% dos casos, demonstrando que a criptococose ocasionada por formas deficientes de cápsula produz intensa resposta inflamatória. A técnica de Grocott foi realizada em 100% dos casos^{4 5 6 7 12 13 15 17}, foram visualizados aspectos como parede celular e brotamentos compatíveis com *Cryptococcus*. A técnica de mucicarmim de Mayer também foi realizada em 100% dos casos^{4 5 6 7 12 13 15 17}, sendo negativa em 7 (41%) pacientes^{4 5 6 7 13 15}, nos 10 (59%) casos restantes^{7 12 17}, a técnica obteve resultados levemente positivos. A técnica de Fontana-Masson foi realizada em 6 (35%) pacientes, sendo reativa em todos os casos^{4 7 13 15}. Portanto, esta coloração demonstra-se altamente específica no diagnóstico das formas deficientes de cápsula. A técnica de imunofluorescência foi realizada em 4 (14%) casos^{6 7 12 16}. Conforme resultados observados em outra revisão de 39 casos¹⁸, estruturas fúngicas deficientes de cápsula exibiram reações fracamente positivas para material capsular por esse método. Em adição, a baixa porcentagem deste último, é devido ao fato de que este tipo de procedimento está restrito a um único centro de referência. Como vimos, os achados do presente caso estão em concordância com a literatura.

Por outro lado, a soromicologia baseada na aglutinação das partículas de látex sensibilizadas foi realizada em 22 (79%) casos^{1 5 6 12 13 16 17}, 13 foram aplicados no soro^{1 5 6 12 13 17}, 11 aplicados no líquido cefalorraquidiano^{1 5 12 16} e 1 aplicado no líquido sinovial¹². No soro, a negatividade foi em 8 (36%) casos^{1 6 12 17} e a positividade em 5 (22%) casos^{1 5 13}. No líquido cefalorraquidiano, a negatividade em 3 (13%) casos^{5 12 16} e a positividade foi em 8 (36%) casos¹. No líquido sinovial, o resultado foi negativo¹². Este percentual de negatividade, como era de se esperar, é reflexo da deficiência de material capsular.

Em resumo, os achados morfológicos proporcionados pelas colorações de hematoxilina-eosina e Grocott, bem como os resultados oferecidos pelas técnicas histopatológicas de Fontana-Masson e mucicarmim de Mayer estabelecem o diagnóstico dos organismos criptocócicos. Portanto, o Fontana-Masson é alternativa diagnóstica para casos de infecções por organismos morfológicamente sugestivos de *Cryptococcus*, uma vez que a imunofluorescência direta está disponível somente em um centro de referência.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Leo Kaufman pela realização da soromicologia e ao Dr. William Kaplan pela realização da imunofluorescência direta, ambos do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), Atlanta, USA.

REFERÊNCIAS

1. Bottone EJ, Toma M, Johansson BE, Wormser GP. Poorly encapsulated *Cryptococcus neoformans* from patients with AIDS. I. Preliminary observations. *AIDS Research* 2: 211-217, 1986.
2. Casadevall A, Perfect JR. *Cryptococcus neoformans*. The American Society for Microbiology - ASM Press, Washington, 1998.
3. Chandler FW, Watts JC. Cryptococcosis. In: Connor DH, Chandler FW, Schwartz DA, Manz HJ, Lack EE, Baird JK, Utz JP (eds) Pathology of infectious diseases, Appleton & Lange, Stamford, p. 989-997, 1997.
4. Cheon WS, Eom K, Yoo BK, Jang SH, Bahn JW, Kim DG, Jung KS. A case of pulmonary cryptococcosis by capsule-deficient *Cryptococcus neoformans*. *The Korean Journal of Internal Medicine* 21: 83-87, 2006.
5. Harding, SA, Scheld WM, Feldman PS, Sande MA. Pulmonary infection with capsule-deficient *Cryptococcus neoformans*. *Virchows Archives A Pathological Anatomy and Histology* 382: 113-118, 1979.
6. Heenan PJ, Dawkins RL. Cryptococcosis and multiple squamous cell tumors associated with a T-cell defect. *Cancer* 47: 291-295, 1981.
7. Kimura M, Kaufman L, Maekura S, Teramura K, Satou T, Hashimoto S. Pulmonary cryptococcosis due to capsule-deficient strain confused with metastatic lung cancer. *Mycopathologia* 140: 65-68, 1998.
8. Kwon-Chung KJ, Hill WB, Bennett JE. New, special stain for histopathological diagnosis of cryptococcosis. *Journal of Clinical Microbiology* 13: 383-387, 1981.
9. Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Melo NT. *Tratado de Micologia Médica* - Lacaz. Editora Sarvier, São Paulo, 2002.
10. Lazcano O, Speights VO, Strickler JG, Bilbao JE, Becker J, Diaz J. Combined histochemical stains in the differential diagnosis of *Cryptococcus neoformans*. *Modern Pathology* 6: 80-84, 1993.
11. Lazcano O, Speights VO Jr, Bilbao J, Becker J, Diaz J. Combined Fontana-Masson-Mucin staining of *Cryptococcus neoformans*. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 115: 1145-1149, 1991.
12. Levinson DJ, Silcox DC, Rippon JW, Thomsen S. Septic Arthritis due to nonencapsulated *Cryptococcus neoformans* with coexisting sarcoidosis. *Arthritis and Rheumatism* 17: 1037-1047, 1974.
13. Milchgrub S, Visconti E, Avellini J. Granulomatous prostatitis induced by capsule-deficient cryptococcal infection. *The Journal of Urology* 143: 365-366, 1989.
14. Mukae H, Iwamoto M, Kinoshita A, Takase T, Mori N, Ishino T, Kohno S, Yamaguchi K, Hirota M, Hara K. A case of sepsis and meningitis due to capsule-deficient *Cryptococcus neoformans* with SIADH. *Kansenshogaku Zasshi* 63: 1206-1211, 1989.
15. Ro JY, Lee SS, Ayala AG. Advantage of Fontana-Masson stain in capsule-deficient cryptococcal infection. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 111: 53-57, 1987.
16. Sugiura Y, Homma M, Yamamoto T. Difficulty in diagnosing chronic meningitis caused by capsule-deficient *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry* 76: 1460-1461, 2005.
17. Torres HA, Prieto VG, Raad II, Kontoyiannis DP. Proven pulmonary cryptococcosis due to capsule-deficient *Cryptococcus neoformans* does not differ clinically from proven pulmonary cryptococcosis due to capsule-intact *Cr. neoformans*. *Mycoses* 48: 21-24, 2005.
18. Watts JC, Chandler FW. Infection by capsule-deficient cryptococci (letter). *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 111: 688-689, 1987.