

## INQUÉRITO IMUNO-ALÉRGICO COM CRIPTOCOCINA

Marcia de Souza Carvalho MELHEM (1) e Carlos da Silva LACAZ (2)

### RESUMO

Os Autores prepararam com duas amostras de *Cryptococcus neoformans*, antígeno extraído por autoclavagem de culturas dessa levedura em ágar-Sabouraud, seguindo a técnica utilizada por FAVA NETTO<sup>11</sup> para obtenção de fração polissacarídica do *Paracoccidioides brasiliensis*. O antígeno obtido corresponde a um péptido-polissacarídeo, tendo sido utilizado na diluição de 1:10 em solução fisiológica em 190 indivíduos não portadores de criptococose ativa, na faixa etária de 10 a 77 anos. Nenhum dos doentes do Hospital das Clínicas, onde esse inquérito foi realizado, estava tomando droga imunodepressora. A hipersensibilidade do tipo tardio foi avaliada 48 horas após a injeção intradérmica de 0,1 ml do antígeno. Foram obtidas 5 reações positivas (2,6%) com pápula eritematosa medindo 5 mm ou mais no seu maior diâmetro. Duas reações positivas foram biopsiadas e o exame histopatológico acusou quadro compatível com hipersensibilidade de tipo tardio. Dos cinco reatores positivos à criptococina, foram coletadas amostras de fezes, escarro e urina, semeado o material em ágar-Sabouraud e ágar-malte com extrato de levedura, com resultado negativo para *Cryptococcus neoformans*. De um caso isolou-se das fezes, amostra de *C. laurentii*. Esses dados, aliados a outros citados no texto do trabalho, sugerem a ocorrência de criptococose-infecção em nosso meio. Os ensaios prosseguem para se ter uma idéia da extensão do problema.

### INTRODUÇÃO

*Cryptococcus neoformans* é uma levedura predominantemente oportunista, isolada em várias partes do mundo, do solo, de frutas deterioradas, de leite bovino (em casos de mastite), de fezes de pombos e de escarro de indivíduos saudáveis. Esta última ocorrência tem significado epidemiológico, mostrando que a presença em comensalismo dessa levedura no organismo de certos hospedeiros, explica muitas vezes o aparecimento da criptococose doença (casos de linfomas e de outras doenças graves ou durante o emprego de drogas imunodepressoras).

Em 1973, HOWARD<sup>14</sup>, pesquisando *C. neoformans* em 561 amostras de escarro, 162 de saliva e 310 de fezes, de pacientes não portadores de criptococose, isolou três culturas dessa levedura do escarro.

EMMONS & col.<sup>10</sup>, referem o isolamento do *C. neoformans* da pele, urina e mucosa do trato gastrointestinal de indivíduos normais. Esses dados, aliados a outros da literatura (HART & col.<sup>13</sup>; COLLINS & col.<sup>7</sup>; ZIMMERMAN & RAPPAPORT<sup>24</sup>; TYNES & col.<sup>23</sup>; BATES & col.<sup>2</sup> e REISS & SZILAGYI<sup>20</sup>), mostram que o *C. neoformans* pode

Trabalho realizado na Seção de Micologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo, Brasil

- (1) Micologista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo  
(2) Diretor do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo

se colonizar em indivíduos sadios, sem manifestação clínica.

Nosso trabalho tem por objetivo detectar a criptococose-infecção através de prova intradérmica de leitura tardia, utilizando um antígeno péptido-polissacarídico.

Vários ensaios já foram realizados com outros tipos de antígenos, a partir do *C. neoformans*.

Em 1927, BERGHAUSEN<sup>4</sup>, utilizando extrato aquoso aquecido de *C. neoformans*, em paciente com criptococose, observou pronunciada reação local. KESSEL & HOLTZWART<sup>15</sup>, utilizando filtrado de culturas dessa levedura em paciente com criptococose (lesão no joelho), obtiveram pápula eritematosa com 20 mm de diâmetro, após 24 horas. DIENST<sup>9</sup>, em paciente com criptococose, preparando suspensão, em solução salina, contendo um bilhão de células por ml, obteve área eritematosa de 20 mm, com leitura de 24 horas. CARTON<sup>6</sup> e LEOPOLD<sup>16</sup> realizaram provas intradérmicas em pacientes com criptococose, observando reações positivas com pápula e eritema após 48 horas. SALVIN & SMITH<sup>21</sup> prepararam extratos de parede de células de *C. neoformans*, testando-os em cobaios infectados, obtendo resultados positivos em provas de leitura tardia. Em 1965, BENNETT & col.<sup>3</sup>, descreveram antígeno semelhante ao de SALVIN & SMITH<sup>21</sup>, trabalhando com cobaios infectados e pacientes portadores de criptococose. Assim, em 16 doentes com essa infecção obtiveram reações positivas em 88% (casos tratados, nos quais não havia atividade do processo). Em 22 voluntários sadios e em 17 pacientes com várias micoses sistêmicas, a positividade foi respectivamente de 68% e 47%. Sugerem os Autores que novos inquéritos realizados em outras partes do mundo poderiam determinar o valor do teste intradérmico na criptococose.

Em 1967, NEWBERRY & col.<sup>19</sup>, utilizando criptococina idêntica a de ATKINSON & BENNETT<sup>1</sup>, em Kansas City, realizaram provas intradérmicas em 28 indivíduos, por eles chamados de "contactados" (criadores e vendedores de pombos), 24 não "contactados" e 5 pacientes com criptococose inativa. Os resultados positivos foram respectivamente: 32,1%, 4,2% e 40%.

NEWBERRY & col.<sup>19</sup> citam em seu trabalho a opinião de LITTMAN & SCHNEIERSON<sup>17</sup> de que na cidade de Nova York, deve existir, anualmente, cerca de 5000 a 15000 casos de criptococose pulmonar ativa ou assintomática.

BINDSCHADLER & BENNETT<sup>5</sup> verificaram que após testes intradérmicos com criptococina, pode haver viragem de reações de imunofluorescência indireta para criptococose. Nesse trabalho não são citados os resultados dos testes intradérmicos realizados em pacientes com criptococose e em controles.

MUCHMORE & col.<sup>18</sup> avaliaram a reação de hipersensibilidade tardia em 82 indivíduos normais com antígeno idêntico ao de SALVIN & SMITH<sup>21</sup>, encontrando positividade de 32% (Oklahoma City, Montana). Essa população foi escolhida de uma região onde ocorreram três casos de criptococose no período de 1 ano, sugerindo que esta comunidade poderia ter adquirido a infecção. Nesse mesmo ano, ATKINSON & BENNETT<sup>1</sup> descreveram o preparo de uma criptococina a partir de extrato uréico de *C. neoformans*. Esse extrato foi utilizado em pacientes com criptococose (38 casos), blastomicose norte-americana (12 casos), histoplasmose (9 casos), coccidioidomicose (4 casos), pesquisadores de laboratórios de Micologia (16 casos) e em indivíduos normais (21 casos). Não se pode tirar conclusão desse trabalho, porque os Autores fizeram ensaios com criptococina diluída a 1:100 e 1:10, estando seis pacientes de criptococose em estado de anergia. De qualquer modo verifica-se que a porcentagem de positividade aumentou à medida que se elevou a concentração do antígeno. Em 21 indivíduos normais, na concentração de 1:100 as provas foram negativas, e a 1:10 positivas em 5%. O antígeno utilizado tinha 5,2 mg de proteína por ml e 0,3 mg de carboidrato por ml. Em sua monografia sobre criptococose ZIMMERMAN & LITTMAN<sup>25</sup> citam antígeno denominado "Torulina" do Laboratório Lilly (Indianópolis, Indiana) não vendável, mas em uso experimental naquela época, usada na diluição a 1:1000 em solução salina, para injeções intradérmicas.

DIAMOND & BENNETT<sup>8</sup> praticaram provas intradérmicas em pacientes com criptococose

e em indivíduos normais, com a finalidade de estudar a correlação entre os testes cutâneos e a transformação de linfócitos *in vitro*.

SCHIMPF & BENNETT<sup>22</sup>, estudando a imunidade celular de pacientes com criptococose, e comparando a voluntários sadios, verificaram resposta positiva a testes intradérmicos, com criptococina de ATKINSON & BENNETT<sup>1</sup>, em 85% de 13 técnicos de laboratórios de micologia, 0% de 10 estudantes de colégio, 33% de 15 pacientes com criptococose inativa, 50% de 6 pacientes ainda sem cura completa e 16,6% de 6 pacientes com comprometimento na imunidade celular.

#### MATERIAL E MÉTODOS

Para o preparo do antígeno por nós utilizado, com duas amostras de *C. neoformans*, seguimos a técnica de FAVA NETTO<sup>21</sup> para obtenção da fração polissacarídica de *P. brasiliensis*. Preparada a suspensão com culturas da levedura em ágar-Sabouraud à temperatura ambiente após 20 dias, foi a mesma tratada com mertiolato a 1:5000 (24 h) e lavada várias vezes em solução fisiológica, acetona e éter sulfúrico. Após centrifugação, seguiu-se suspensão em solução fisiológica, tampão veronal, na proporção de 15% do volume das células úmidas e autoclavagem por 20 minutos a 120°C. O sobrenadante foi dosado quimicamente, demonstrando a presença de 263,6 mg de proteína por 100 ml (método de Lowry, padrão albumina) e 207,0 mg% de polissacarídeo (método de antrona, padrão glicose). A eletroforese para proteínas, glicoproteínas e lípidos, revelou três faixas para as duas primeiras, e ausência de fração lipídica. O antígeno foi conservado em geladeira, após provas de esterilidade e diluído a 1:10 em solução fisiológica, antes de seu emprego. As injeções intradérmicas foram realizadas com 0,1 ml do antígeno diluído, em pacientes de 10 a 77 anos internados na Clínica Dermatológica do Hospital das Clínicas de São Paulo ou em tratamento no ambulatório do Serviço de Alergia desse Hospital. Nenhum paciente estava sendo submetido à drogas imunodepressoras e o estado geral dos mesmos era bom (Quadro I). Devemos referir que alguns pacientes eram portadores de doenças

capazes de provocar imunodeficiência do sistema timo dependente (neoplasias, lupus eritematoso etc.), fato este que poderia afetar o resultado das reações obtidas. Ressalte-se também que ainda estamos tentando padronizar o antígeno, observando qual a concentração ideal a ser utilizada, mas a raridade da criptococose entre nós ainda não nos possibilitou este ensaio.

#### QUADRO I

Diagnósticos estabelecidos

Diagnóstico	N.º de pacientes
Mal de Hodgkin	3
Candidíase	3
Tuberculose	5
Paracoccidioidomicose	5
Normais	5
Leishmaniose tegumentar	8
Neoplasias	9
Outras micoses superficiais	9
Asma brônquica	10
Outras doenças	50
Causa a esclarecer	83
Total	190

O Quadro II relaciona o número de provas até agora realizadas, com a faixa etária e sexo dos pacientes. A leitura se efetuou após 48 horas à injeção do antígeno, considerando-se como prova positiva aquela que apresentava pápula eritematosa com diâmetro igual ou superior a 5 mm. Duas reações foram biopsiadas para exame histopatológico (casos 57 e 165).

#### RESULTADOS

Das 190 provas realizadas obtivemos cinco reações positivas (2,6%) com tamanhos variáveis da pápula eritematosa:

Caso 16 (A.C.S.) — 5 mm

— Hipertensão

Caso 27 (L.P.O.) — 15 mm

— Suspeita de tuberculose



Fig. 1 — Caso 57 (L.V.S.). A e B — Denso infiltrado linfo-histiocitário em torno à vênula e junto a pequenos vasos da derma, que se apresenta edemaçada. H.E., 200 x.

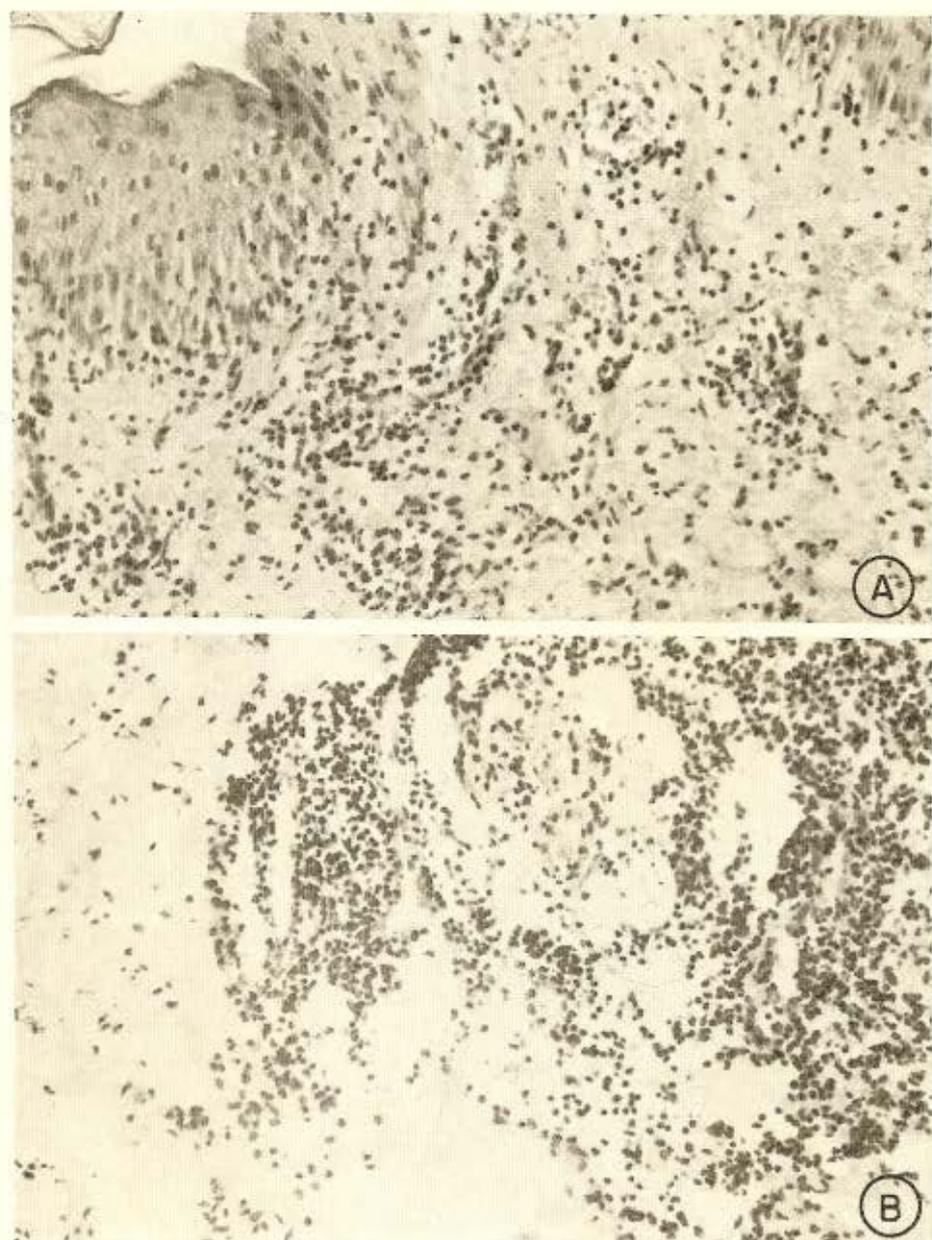


Fig. 2 — Caso 165 (M.O.C.C.). A e B — Epiderme com edema intercelular na parte profunda. Infiltrado mononuclear em torno a pequenos vasos da derma, que se apresenta edemaciada. H.E., 200 x.

QUADRO II

Distribuição por idade e sexo de 190 pacientes estudados com criptococina

Idade	Sexo		Total
	Feminino	Masculino	
10-15	7	8	15
16-20	12	16	28
21-25	12	9	21
26-30	6	7	13
31-35	11	8	19
36-40	13	8	21
41-45	8	12	20
46-50	14	6	20
51-55	6	5	11
56-60	5	4	9
61-65	2	3	5
66-70	3	2	5
71-75	0	2	2
76-80	0	1	1

- Caso 57 (L.V.S.) — 10 mm  
— Dermatite de contato
- Caso 122 (L.S.M.) — 20 mm  
— Diabetes mellitus
- Caso 165 (M.O.C.C.) — 20 mm  
— Asma com infiltração pulmonar e seqüela de tuberculose.

A biopsia foi executada nos casos 57 e 165, sendo as lâminas examinadas pelo Prof. Thales de Brito, com os seguintes resultados: *Caso 165* — Os cortes mostram pele apresentando epiderme de estratificação preservada, parcialmente dissociada por edema, localizada nas camadas mais inferiores. Entre as células epiteliais percebe-se infiltrado linfo-histiocitário moderado. A derme se apresenta edemaciada, com vasos de endotélio tumefeito, vazios de sangue. Em torno aos vasos anexos, intenso infiltrado inflamatório linfo-histiocitário, com poucos eosinófilos de permeio. Este mesmo infiltrado é visível de maneira difusa e escassa no fragmento da hipoderme presente no preparado. *Diagnóstico:* Dermovascularite sugestiva de reação de hipersensibilidade de tipo tardio; *Caso 57* — Os cortes revelam pele com a epiderme apresentando discreta ceratose su-

perficial e acantose irregular. A derme se mostra edemaciada e apresenta infiltrado inflamatório linfo-histiocitário com poucos eosinófilos de mistura, disposto predominantemente em torno de anexos e vasos. Nesta última situação ele se faz acompanhar de edema da parede vascular e proliferação endotelial, para a luz. *Diagnóstico:* Dermovascularite subaguda, sugestiva de processo de hipersensibilidade.

DISCUSSÃO

Em várias micoses profundas pode ocorrer infecção assintomática ou com sintomatologia frusta, detectadas por provas intradérmicas de leitura tardia, tal como ocorre na histoplasmose, coccidioomicose, esporotricose e paracoccidioomicose.

Demonstrada a presença de *C. neoformans* no meio ambiente e em material o mais diverso, bem como o achado dessa levedura no organismo do homem e de outros animais, aventou-se a possibilidade de criptococose-infecção. São raros os inquéritos imuno-alérgicos com a criptococina ou torulina, sendo registrados na literatura casos de criptococose que reagem positivamente aos antígenos extraídos daquela levedura.

Nosso trabalho permitiu demonstrar através de um antígeno de natureza péptido-polissacarídica, resposta positiva revelada por provas intradérmicas de leitura tardia.

A freqüência de reações positivas foi baixa, em relação a outros inquéritos realizados. Assim, em 190 indivíduos não portadores de criptococose ativa, utilizando o antígeno diluído a 1:10 obtivemos apenas cinco reações positivas (2,6%).

Iremos prosseguir nesse inquérito em outros grupos da população (incluindo indivíduos normais), bem como em outros animais (bovinos, ovinos e eqüídeos) tendo também a intenção de utilizar o antígeno por nós preparado em indivíduos que trabalham em pombais ou nos que vivem em áreas onde se encontram pombos em grande quantidade.

Tudo faz crer que as respostas por nós obtidas revelam realmente um estado de hipersensibilidade de tipo tardio, não só devido ao aspecto da reação, bem como pelo quadro histopatológico, que em dois casos demonstrou alterações compatíveis com aquele tipo de resposta. Faremos também o teste de inibição da migração de leucócitos para confirmação da resposta de tipo celular. É bem provável que em indivíduos normais, a positividade à prova de criptococina seja mais elevada do que a por nós obtida, já que as provas realizadas foram praticadas em pacientes provavelmente alguns deles com imunodeficiência primária.

Pretendemos também, com a finalidade de melhor padronizar o antígeno, testá-lo (puro e diluído) em cobaios infectados com doses subletais de *C. neoformans* e em pacientes de criptococose, desde que os mesmos apresentem bom estado geral, e não estejam eventualmente sendo submetidos à terapia imunodepressora. Novos antígenos serão preparados para um estudo comparativo de sensibilidade e especificidade da prova. As perspectivas que se abrem com esta investigação são as mais promissoras.

Finalmente, é nossa intenção praticar rotineiramente a prova de criptococina em pacientes candidatos a transplante renal e que ainda não estão recebendo drogas imunodepressoras. A finalidade dessa pesquisa será a de acompanhar o pós-operatório dos reagentes a criptococina, tentando isolar *C. neoformans* de várias fontes, bem como detectar o antígeno e anticorpo correspondentes no soro e líquido.

#### SUMMARY

##### *Immune-allergic survey with cryptococin*

With two samples of *Cryptococcus neoformans*, the Authors have prepared an antigen according to the technique employed by FAVA NETTO<sup>11</sup> for the obtention of the polysaccharide fraction of *Paracoccidioides brasiliensis*, i.e., by autoclaving cultures of that yeast grown in Sabouraud agar. The resulting extract, a peptide-polysaccharide, was diluted in saline (1:10) and employed

0.1 ml aliquots for the intradermic testing of 190 individuals of both sexes, in an age range from 10 to 77 years, none of them exhibiting active cryptococcosis, nor being under immunosuppressive therapy. The delayed hypersensitivity reaction was evaluated 48 hours later. Five (2.6%) positive reactions were recorded, with the erythema and induration areas measuring 5 mm or more in width. Two out of these five were submitted to biopsy, the histopathologic findings confirming a delayed hypersensitivity reaction.

Feces, sputum and urine samples were collected from the five cases, and seeded on Sabouraud agar and on malt agar enriched with yeast extract. A single isolate — of *C. laurentii* — was obtained.

These results and the pertinent data reported in this paper, suggest the occurrence of cryptococcosis-infection in our country. Further enquiries into the subject are being developed, to allow a better appraisal of the problem.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ATKINSON, A.J. & BENNETT, J.E. — Experience with a new skin test antigen prepared from *Cryptococcus neoformans*. *Amer. Rev. Resp. Dis.* 97:637-643, 1968.
2. BATES, J.H.; STONE, A. & WARR, W. — The spectrum of pulmonary cryptococcosis. *Ann. Int. Med.* 69:1109-1116, 1968.
3. BENNETT, J.E.; HASENCLEVER, H.F. & BAUM, G.L. — Evaluation of a skin test for cryptococcosis. *Amer. Rev. Resp. Dis.* 91: 616, 1965.
4. BERGHAUSEN, O. — Torula infection in man. *Ann. Int. Med.* 1:235-240, 1927.
5. BINDSCHADLER, D.D. & BENNETT, J.E. — Serology of human cryptococcosis. *Ann. Int. Med.* 69:45-52, 1968.
6. CARTON, C.A. — Treatment of central nervous system cryptococcosis; a review and report of four cases treated with actidione. *Ann. Int. Med.* 37:123-154, 1952.
7. COLLINS, V.P.; TRIMBLE, J.R. & GEL-LORN, A. — The coincidence of cryptococcosis and disease of the reticuloendothelial and lymphatic system. *Cancer* 4:883-889, 1951.

8. DIAMOND, R.D. & BENNETT, J.E. — Disseminated cryptococcosis in man: decreased lymphocyte transformation in response to *Cryptococcus neoformans*. *J. Infect. Dis.* 127:694-697, 1973.
9. DIENST, R.B. — *Cryptococcus histolyticus* isolated from subcutaneous tumor. *Arch. Dermatol. & Syph.* 37:461-464, 1938.
10. EMMONS, C.W.; BINFORD, C.H. & UTZ, J.P. — *Medical Mycology*. Philadelphia, Lea & Febiger, 1970, 186-206.
11. FAVA NETTO, C. — *Estudos quantitativos sobre a fixação do complemento na Blastomycose sul-americana, com antígeno polisacarídico*. [Tese de doutoramento], 1955.
12. GRAYBILL, J.R. & ALFORD, R.H. — Cell-mediated immunity in cryptococcosis. *Cell. Immunol.* 14:12-21, 1974.
13. HART, P.D.; RUSSELL Jr., E. & REMINGTON, J.S. — The comprised host and infection. II — Deep fungal infection. *J. Infect. Dis.* 120:169-191, 1969.
14. HOWARD, D.H. — The commensalism of *Cryptococcus neoformans*. *Sabouraudia* 11:171-174, 1973.
15. KESSEL, J.F. & HOLTZWART, F. — Experimental studies with *Torula* from a knee infection in man. *Amer. J. Trop. Med.* 15:467-483, 1935.
16. LEOPOLD, S.S. — Pulmonary monilliasis and cryptococcal osteomyelitis in the same patient. *Med. Clin. N. America* 37:1737-1746, 1953.
17. LITTMAN, M.L. & SCHNEIERSON, S.S. — *Cryptococcus neoformans* in pigeon excreta in New York City. *Ann. J. Hyg.* 69:49-59, 1959.
18. MUCHMORE, H.G.; FELTON, F.G.; SALVIN, S.B. & RHOADES, E.R. — Delayed hypersensitivity to cryptococcin in man. *Sabouraudia* 6:285-288, 1968.
19. NEWBERRY, W.M.; WALTER, J.E.; CHANDLER, J.W. & TOSH, F.E. — Epidemiologic study of *Cryptococcus neoformans*. *Ann. Int. Med.* 67:724-732, 1967.
20. REISS, F. & SZILAGYI, G. — Ecology of yeast-like fungi in a hospital population. *Arch. Dermatol.* 91:611-614, 1965.
21. SALVIN, S.G. & SMITH, R.F. — An antigen for detection of hypersensitivity to *Cryptococcus neoformans*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 108:493-501, 1961.
22. SCHIMPF, S.C. & BENNETT, J.E. — Abnormalities in cell-mediated immunity in patients with *Cryptococcus neoformans* infection. *J. Allergy Clin. Immun.* 55:430-441, 1975.
23. TYNES, R.; MASON, K.N.; JENNINGS, A. E. & BENNETT, J.E. — Variant forms of pulmonary cryptococcosis. *Ann. Int. Med.* 69:1117-1125, 1968.
24. ZIMMERMAN, L.E. & RAPPAPORT, H. — Occurrence of cryptococcosis in patients with malignant disease of reticuloendothelial system. *Amer. J. Clin. Path.* 24:1050-1072, 1954.
25. ZIMMERMAN, L.E. & LITTMAN, M.L. — *Cryptococcosis*. New York, Grune & Stratton, 1956.

Recebido para publicação em 18/8/1976.