

# 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 Gazzoni<sup>1</sup>, Karla Lais Pegas<sup>2</sup> e Luiz Carlos Severo<sup>3</sup>

### 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*<sup>2</sup>.

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 gelatinosa<sup>2</sup>. Contudo, a literatura registra casos de criptococose sem estas características, dificultando o diagnóstico por simular outros elementos fúngicos<sup>1 4 5 6 7 12 13 14 15 16 17 18</sup>, o que demanda uma técnica laboratorial mais específica<sup>8 15</sup>.

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 padronizadas<sup>8</sup>.

**Técnicas histoquímicas. Hematoxilina-eosina (HE):** rotina no diagnóstico histológico e de grande utilidade na avaliação dos padrões de reações teciduais<sup>5 9</sup>.

**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<sup>8,9</sup>.

**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<sup>3,9,11</sup>.

**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<sup>8,9,11</sup>.

**Imunofluorescência:** técnica restrita a único centro de referência, baseada na formação de um conjugado composto por anticorpos fluorescentes específicos e antígenos do polissacarídeo capsular<sup>3</sup>.

**Soromicologia.** teste de detecção do antígeno polissacarídeo capsular através da aglutinação das partículas de látex sensibilizadas<sup>2</sup>.

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.

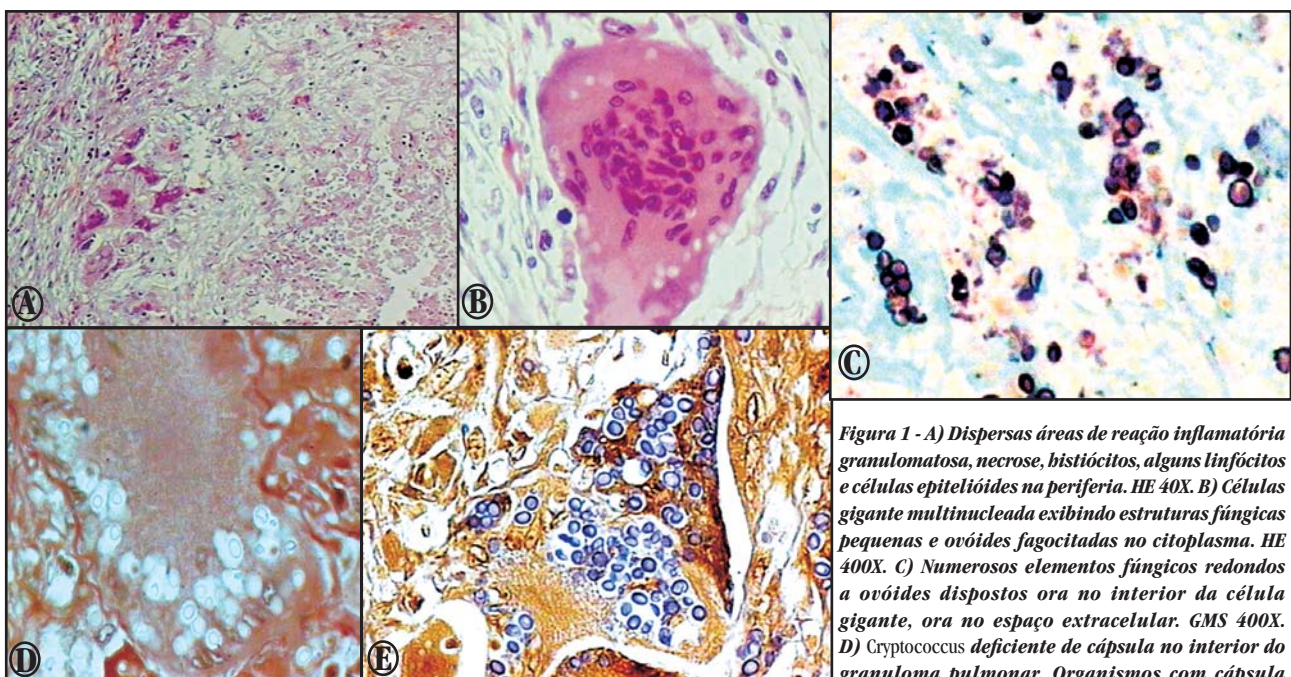
Aos cortes, os achados microscópicos à coloração de hematoxilina-eosina revelaram lesões granulomatosas, de intensa resposta inflamatória, constituídas por macrófagos, coleções nodulares de células epitelióides (macrófagos modificados que adquirem citoplasma mais pálido, à semelhança das células epiteliais),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

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 pulmonar<sup>5</sup> e disseminada<sup>14</sup> por formas deficientes de cápsula. Em 28 casos revisados, 14 (50%) pacientes exibiam infecção pulmonar<sup>4 5 15 17</sup> e os outros 14 (50%) pacientes apresentavam sinais de doença extrapulmonar: meningite<sup>1 16</sup>, sepse<sup>1</sup>, sepse concomitante com meningite<sup>14</sup>, infecção óssea<sup>6</sup>, prostatite<sup>13</sup> e artrite<sup>12</sup>. O diagnóstico histopatológico foi realizado em 17 (61%) pacientes<sup>4 5 6 7 12 13 15</sup>. A técnica de hematoxilina-eosina foi realizada em 9 (53%) pacientes<sup>3 5 6 7 12 13 15</sup>, 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<sup>4 5 6 7 12 13 15 17</sup>, foram visualizados aspectos como parede celular e brotamentos compatíveis com *Cryptococcus*. A técnica de mucicarmim de Mayer também foi realizada em 100% dos casos<sup>4 5 6 7 12 13 15 17</sup>, sendo negativa em 7 (41%) pacientes<sup>4 5 6 7 13 15</sup>, nos 10 (59%) casos restantes<sup>7 12 17</sup>, a técnica obteve resultados levemente positivos. A técnica de Fontana-Masson foi realizada em 6 (35%) pacientes, sendo reativa em todos os casos<sup>4 7 13 15</sup>. Portanto, esta coloração demonstra-se altamente específica no diagnóstico das formas deficientes de cápsula. A técnica de imunofluorescência foi realizada em 4 (14%) casos<sup>6 7 12 16</sup>. Conforme resultados observados em outra revisão de 39 casos<sup>18</sup>, 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<sup>1 5 6 12 13 16 17</sup>, 13 foram aplicados no soro<sup>1 5 6 12 13 17</sup>, 11 aplicados no líquido cefalorraquidiano<sup>1 5 12 16</sup> e 1 aplicado no líquido sinovial<sup>12</sup>. No soro, a negatividade foi em 8 (36%) casos<sup>1 6 12 17</sup> e a positividade em 5 (22%) casos<sup>1 5 13</sup>. No líquido cefalorraquidiano, a negatividade em 3 (13%) casos<sup>5 12 16</sup> e a positividade foi em 8 (36%) casos<sup>1</sup>. No líquido sinovial, o resultado foi negativo<sup>12</sup>. 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.