
CARACTERÍSTICAS *in vitro* DE ISOLADOS

DO COMPLEXO *Cryptococcus laurentii*

EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

Gabriel de Oliveira Faria¹, Adriano Gonçalves Martins², Mário Paulo Amante Penatti² e Reginaldo dos Santos Pedroso²

RESUMO

Cryptococcus laurentii é um fungo distribuído em diversos ambientes e, eventualmente, causa infecção no homem. Por ser uma espécie considerada emergente, requer, para sua identificação laboratorial, conhecimento técnico mais especializado, provas ou testes laboratoriais específicos que nem sempre estão disponíveis. O objetivo deste trabalho foi descrever características fenotípicas *in vitro* de isolados do complexo *C. laurentii* em meios de cultura utilizados na rotina de laboratório de microbiologia. Foram estudados isolados do complexo *C. laurentii* em diferentes meios de cultura e condições. A avaliação *in vitro* foi feita com base no crescimento nos meios: ágar cromogênico *Candida*, ágar chocolate, ágar sangue, ágar EMB, ágar MacConkey, ágar SS e ágar Mycosel; produção de melanina em ágar níger, crescimento a 37°C, avaliação da atmosfera de crescimento, análise da micromorfologia celular, catalase, urease, beta-glicosidase, gelatinase, fosfolipase, proteinase, DNase, amilase, atividade hemolítica e teste de sensibilidade aos antifúngicos. Em caldo tioglicolato, os isolados de *C. laurentii* apresentaram crescimento somente na superfície do meio; também mostraram crescimento em ágar MacConkey e não cresceram em Mycosel®; apresentaram crescimento variável em temperatura de 37°C, não produziram melanina em ágar níger e foram catalase, esculina e amilase positivos. As atividades de fosfolipase e proteinase foram negativas e a atividade hemolítica, variável. Os halos ao redor dos discos de antifúngicos variaram de 14 mm a 35 mm para anfotericina B, de 31 mm a 40 mm para voriconazol, de 13 mm a 28 mm para fluconazol. Conclui-se que *C. laurentii* cresce em diferentes meios de cultura, com características morfológicas, aspectos, bordas e colorações diversas como outras espécies de leveduras, de modo que provas clássicas para a identificação são necessárias. Testes de tipagem, incluindo exoenzimas e sensibilidade *in vitro* aos antifúngicos, podem ser úteis na diferenciação dos isolados.

DESCRITORES: *Cryptococcus laurentii*; fenotipagem; enzimotipagem.

-
- 1 Curso de Graduação em Enfermagem, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Uberlândia.
 - 2 Curso Técnico em Análises Clínicas, Escola Técnica de Saúde, Universidade Federal de Uberlândia.

Correspondência: Reginaldo dos Santos Pedroso. Curso Técnico em Análises Clínicas, Escola Técnica de Saúde, Universidade Federal de Uberlândia, Avenida Amazonas, s/n, Bloco 6X, 1o. andar. Bairro Umuarama, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. CEP: 38400-902. E-mail: rpedroso@estes.ufu.br

Recebido para publicação em: 20/3/2014. Revisto em: 20/8/2014. Aceito em: 29/8/2014.

ABSTRACT

In vitro characteristics of isolates of *Cryptococcus laurentii* complex in different culture media

Cryptococcus laurentii is a fungus distributed in different environments, where individuals come into contact with it, become colonized and develop infections that vary according to their immune status. This species is considered emerging, and for its laboratory identification specialized technical knowledge is required, as well as specific laboratory tests that are not always available. The objective was to describe the phenotypic characteristics of *in vitro* *C. laurentii* complexes in culture media that are routinely used in microbiology laboratories. We studied isolates of *C. laurentii* complex, *C. neoformans*, *C. albidus* and *Candida albicans*, in the evaluation of *in vitro* tests: growth in different culture media (*Candida* chromogen, chocolate agar, blood agar, EMB agar, MacConkey agar, SS agar and Mycosel®); melanin production in niger seed agar, growth at 37°C, assessment of growth atmosphere, analysis of cell micromorphology, catalase, urease, beta-glucosidase, gelatinase, phospholipase, proteinase, DNase, amylase, hemolytic activity, and susceptibility testing to antifungals. *C. laurentii* isolates grew only aerobically; for *C. neoformans*, no pigment was produced on niger seed agar, and all isolates of *C. laurentii* were catalase-positive, and had amylase activity. Halos around the antifungal disks ranged between 14 and 35 mm for amphotericin B, 31–40 mm for voriconazole and 13–28 mm for fluconazole. We conclude that *C. laurentii* grows in different culture media, with morphological features, aspects, borders and various colors, like other species of yeast, so classical tests for identification are required. Alongside the typing tests, exoenzymes and *in vitro* susceptibility to antifungal agents may be useful in the differentiation of isolates.

KEY WORDS: *Cryptococcus laurentii*; phenotyping; culture media.

INTRODUÇÃO

Cryptococcus laurentii é um fungo encontrado em diversos nichos, como água e vegetais, e em alguns animais (1, 9, 15). O homem pode ser, acidentalmente, colonizado, mas raramente desenvolve algum processo infeccioso, o que dependerá de seu estado imunológico. As infecções ocorrem principalmente em indivíduos imunocomprometidos, no entanto podem acometer também os imunocompetentes (12). Existem relatos de infecções no sistema nervoso central, nos tecidos cutâneos e na pele, além de casos de fungemia e pneumonia (1, 8, 9, 19). O tratamento dos indivíduos infectados é semelhante ao tratamento de infecções por *Cryptococcus neoformans*, que tem protocolo definido (1, 9). Estudos sobre sensibilidade *in vitro* aos antifúngicos são escassos, não havendo estudos conclusivos que relacionem resultados *in vitro* com a resposta clínica (1, 8, 9, 19, 22).

Os isolados de *C. laurentii* apresentam extensa diversidade fenotípica e genotípica, conforme mostraram estudos com isolados ambientais de *C. laurentii* (17, 18, 23, 24). Pesquisas experimentais *in vivo* revelaram a capacidade de sobrevivência de isolados de *C. laurentii* em modelos animais, sem, contudo, causar-lhes a morte, o que sugere baixa virulência dos isolados e capacidade de causar infecção crônica (17).

Na rotina de um laboratório de microbiologia e micologia, os gêneros e espécies de leveduras mais frequentes, em geral, são facilmente identificados. Todavia, espécies raras ou menos frequentes, ou emergentes, como isolados do complexo *C. laurentii*, requerem conhecimento técnico mais especializado, provas ou testes laboratoriais adicionais e específicos, que nem sempre estão disponíveis. A identificação laboratorial de isolados de *C. laurentii* inclui a caracterização do gênero *Cryptococcus* e a determinação da espécie, de modo que sejam diferenciados dos outros membros mais frequentes do gênero, como *C. neoformans* e *C. gattii*, além de outras espécies menos comuns, como *C. albidus*.

Os membros do gênero *Cryptococcus* apresentam células circundadas por cápsula, apresentam atividade de urease e não fermentam carboidratos. Em meios para produção de melanina, as espécies *C. neoformans* e *C. gattii* são fortemente produtoras do pigmento, ao passo que alguns isolados de outras espécies, incluindo *C. laurentii*, mostram uma pigmentação discreta e tardia (18). Os isolados do complexo *C. laurentii*, diferentemente das espécies *C. neoformans* e *C. gattii*, assimilam melibiose e lactose. As colônias em ágar Sabouraud dextrose são brilhantes, lisas, porém algumas vezes podem ser opacas e rugosas, com coloração variando entre creme, amarela, rosa ou laranja e, na micromorfologia, apresentam, em geral, células ovoides, blastoconídios isolados, aos pares ou em curtas cadeias, com cápsula visível em preparação com tinta nanquim (7, 10, 18).

Assim, investigações que envolvessem análises de características laboratoriais, especialmente aquelas mais facilmente disponíveis, facilitariam sobremaneira o trabalho do microbiologista ou micologista. Neste contexto, este trabalho foi concebido com o objetivo de descrever características *in vitro* de isolados do complexo *C. laurentii*, em alguns meios de cultura utilizados na rotina de um laboratório de microbiologia, e a sensibilidade *in vitro* aos antifúngicos anfotericina B, voriconazol e fluconazol.

MATERIAL E MÉTODOS

Descrição dos isolados

Foram incluídos no estudo oito isolados do complexo *C. laurentii* (seis isolados de origem ambiental, dois destes recuperados após inoculação em camundongo Balb/C em 60 e 120 dias (17), um isolado clínico e uma cepa de referência, *C. laurentii* ATCC 18883) e ainda as cepas de referência: *C. neoformans* ATCC 90112, *C. albidus* INCQS 40077 e *Candida albicans* ATCC 90028.

Para a manutenção *in vitro* dos isolados, utilizou-se ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol (ASD), sob refrigeração (2°C-8°C), e BHI-glicerol a -20°C. Para a execução dos experimentos, os isolados foram reativados por meio de três passagens consecutivas em ASD, com incubação a 30°C-32°C durante 48 a 72 horas.

Avaliação das características macro e micromorfológicas

A verificação do crescimento das colônias nos meios de cultura cromogênicos *Candida*, ágar chocolate, ágar sangue, ágar EMB (*Eosin Methylene Blue*), ágar MacConkey, ágar SS (*Salmonella e Shigella*) e ágar Mycosel foi feita após 48 horas de incubação a 30°C, sendo, então, descritas suas características macromorfológicas. A inoculação foi feita com uma suspensão dos microrganismos em solução salina esterilizada, com turbidez equivalente ao tubo 1 da escala de McFarland, na superfície dos respectivos meios contidos em placas 90x100, utilizando-se a técnica de esgotamento.

O crescimento em temperatura de 37°C foi feito em ASD, sendo o inóculo realizado em tubos contendo o meio, sempre em duplicata, em duas ocasiões diferentes e incubados às temperaturas de 37°C e 30°C, esta última usada como controle de crescimento.

Para a produção de melanina, utilizou-se ágar níger (18), com observação diária, por até dez dias de incubação. Foi utilizado *C. neoformans* ATCC 90112 como controle positivo e *C. albicans* ATCC 90028, como controle negativo. A análise dos isolados foi feita por comparação com os controles.

O crescimento em caldo tioglicolato teve como finalidade avaliar a atmosfera de crescimento requerida pelo microrganismo. O inóculo foi feito com agulha de platina, nas paredes do tubo que continha 4 mL do meio, até o fundo do tubo. Os tubos foram incubados a 30°C, durante quatro dias. Os resultados foram expressos a partir do local de crescimento das amostras, estabelecendo-se os respectivos escores: 1 - crescimento na superfície, 2 - quando o crescimento ocorreu logo abaixo da superfície, 3 - para crescimento no meio do tubo, 4 - crescimento somente no fundo do tubo, conforme a exigência de oxigênio, aeróbio estrito (escores 1 e 2), microaeróbio (escore 3) e anaeróbio (escore 4).

A análise da micromorfologia celular foi feita após crescimento em caldo BHI, em temperatura de 30°C, durante 48 horas e em microscopia de luz. Na pesquisa de cápsula, utilizou-se tinta nanquim (6, 11).

Avaliação da atividade de exoenzimas

Foi pesquisada a atividade das seguintes exoenzimas: catalase, urease, beta-glicosidase, gelatinase, fosfolipase, proteinase, DNase, amilase, além da atividade hemolítica. Todos os experimentos foram realizados em duplicata para todos os isolados.

A reação da catalase foi realizada pela adição de uma gota de peróxido de hidrogênio 10 volumes sobre uma colônia depositada sobre uma lâmina de microscopia. A produção de bolhas de gás indicou reação positiva.

A pesquisa de urease foi feita utilizando-se ágar ureia de Christensen, incubado a 30°C por sete dias, com observação diária. A produção da enzima foi

constatada quando o indicador de pH vermelho de fenol mudou de amarelo para vermelho, o que ocorre com a alcalinização do meio de cultura (6, 11).

A avaliação da atividade de beta-glicosidase foi realizada pela prova da esculina, em que a cultura é semeada naquele meio e mantida em temperatura de 30°C por um período de sete dias. A hidrólise da esculina, por ação enzimática, promoveu o escurecimento do meio, indicando resultado positivo.

O teste de hidrólise da gelatina (atividade de gelatinase) foi realizado conforme Dela-Cruz e Torres (5), com algumas modificações. O meio nutritivo contendo 12% de gelatina foi incubado a 30°C por dez dias. A positividade do teste foi evidenciada pela liquefação do meio que, quando resfriado a 8°C, permaneceu em estado fluido (5).

Para a realização dos outros experimentos, foi preparada uma suspensão de cada isolado, em solução salina, com turvação equivalente ao tubo 2 da escala de McFarland (1×10^8 a 5×10^8 células/ml). Nos meios ágar Mueller-Hinton, ágar DNase, ágar fosfolipase, ágar proteinase e ASD-sangue, contidos em Placas de Petri 90 mm x 15 mm, foram depositados 5µl de cada suspensão em pontos equidistantes na superfície do ágar, sendo cinco isolados diferentes em cada placa.

A avaliação da atividade de amilase foi realizada em ágar Mueller-Hinton (14). A suspensão foi depositada na placa contendo o meio de cultura, incubada a 30°C durante quatro dias e, em seguida, utilizou-se solução de lugol para a revelação. O halo claro formado ao redor da colônia indicou o teste positivo.

Para DNase, os testes foram realizados com ágar DNase por método semelhante ao utilizado para detecção de DNase por espécies de *Staphylococcus* (14). Placas foram incubadas a 30°C por sete dias. A positividade do teste foi evidenciada pela formação de um halo de clareamento ao redor da colônia (21).

Para a fosfolipase, foi utilizado ágar fosfolipase (2) e a atividade da enzima foi evidenciada pela formação de zona opaca ao redor da colônia da levedura (precipitação de complexo de cálcio). As placas foram incubadas a 30°C durante quatro dias.

Para proteinase, utilizou-se ágar proteinase (2) e a atividade proteolítica foi evidenciada pela formação de um halo claro ao redor do ponto de crescimento da levedura. A incubação a 30°C durou sete dias.

A pesquisa da atividade hemolítica foi adaptada de Rorig, Colacite e Abegg (20). Foi utilizado ágar Sabouraud contendo de 3% de glicose e 7% de sangue de carneiro. Cinco microlitros de suspensão de leveduras foram depositados na superfície do ágar, sendo utilizados cinco isolados diferentes em cada placa. As placas foram incubadas a 30°C, durante sete dias. A atividade hemolítica foi evidenciada pela formação de halo translúcido ao redor da colônia.

Os resultados das atividades enzimáticas, com exceção de DNase, foram expressos adotando-se os valores para fosfolipase (*Pz*= *phospholipase zone*), proteinase (*Prz*=*proteinase zone*) e atividade hemolítica (*Hi* = índice hemolítico), obtidos pela divisão do diâmetro da colônia (dc) pelo diâmetro da colônia mais a

zona de precipitação/clareamento e halo translúcido respectivamente (dcp). Valores de Pz ou Prz ou $Hi=1,0$ indicaram teste negativo (ausência de atividade) e menores que 1,0, teste positivo.

Teste de sensibilidade aos antifúngicos

O teste de sensibilidade aos antifúngicos seguiu a metodologia de disco-difusão em ágar, de acordo com as recomendações descritas no documento M44-A2 (4) e instruções do fabricante do disco (3). Os discos que continham os antifúngicos fluconazol (Cecon, São Paulo, SP, Brasil), voriconazol (Bio Rad; Rio de Janeiro, RJ; Brasil) e anfotericina B (Cecon, São Paulo, SP; Brasil) foram distribuídos de forma equidistante em placas de Petri (90 mm de diâmetro), contendo ágar Mueller-Hinton suplementado com 2% de glicose e 0,5 µg/mL de azul de metileno (4). As placas invertidas foram incubadas aerobicamente à temperatura de 30°C, durante 18-24 horas para realização das leituras. Quando não houve crescimento em 24 horas, o diâmetro da zona de inibição foi mensurado em 36 ou 48 horas de incubação.

RESULTADOS

As características morfocoloniais, cromogênicas e atmosfera de crescimento *in vitro* dos isolados de *C. laurentii* estão mostradas na Tabela 1. A Tabela 2 mostra a termotolerância e as atividades das exoenzimas produzidas pelos isolados do complexo *C. laurentii*. Observou-se que o crescimento a 37°C foi variável entre os isolados, assim como as atividades de gelatinase e hemolítica. Todos os isolados apresentaram atividade de DNase, urease, beta-glicosidase e amilase. Nenhum apresentou atividade de fenoxidase, fosfolipase e proteinase. Os halos de inibição ao redor dos discos contendo drogas antifúngicas estão mostrados na Tabela 3.

DISCUSSÃO

No presente estudo, analisou-se a possibilidade de serem utilizados testes *in vitro*, geralmente acessíveis aos laboratórios de microbiologia e micologia clínica, que pudessem sugerir ou apontar um possível isolado do complexo *C. laurentii*. Numa primeira etapa, foram verificadas as características dos isolados do complexo *C. laurentii* em meios de cultura utilizados em bacteriologia e micologia. Observou-se que os isolados de *C. laurentii* incluídos no estudo apresentaram atmosfera de crescimento aeróbio em caldo tioglicolato, meio utilizado em bacteriologia como caldo de enriquecimento e também para isolamento de microrganismos microaerófilos e anaeróbios estritos. *C. laurentii* cresceu na superfície do caldo tioglicolato, diferentemente do isolado de *C. albicans* que cresceu em microaerofilia.

Tabela 1. Características cromogênicas e morfocoloniais dos isolados do complexo *Cryptococcus laurentii* em diferentes meios de cultura

Isolado	Caldo tioglicolato (atmosfera de crescimento)	Ágar cromogênico <i>Candida</i>	Ágar chocolate	Ágar sangue	Ágar EMB	Ágar MacConkey	Ágar SS	Ágar Mycosel®
CRL 1	1	Bege	Branca	marrons*	rosa, cremosa	rosa, cremosa	rosa, seca	AC
CRL 2	1	Roxo	Branca	marrons*	rosa, seca	rosa, cremosa	AC	AC
CRL 9	2	marron	Cinza	marrons*	cinza, hialina, mucóide	rosa, cremosa	AC	AC
CRL 12	2	Cinza	Cinza	marrons, brilhantes*	rosa, cremosa	rosa, mucóide	AC	AC
CRL 12B60	1	Lilás	Cinza	marrons, brilhantes*	rosa, cremosa	rosa, cremosa	rosa, seca	AC
CRL 12B120	1	Lilás	Cinza	marrons, brilhantes*	rosa, cremosa	rosa, cremosa	rosa, seca	AC
CRL 2238	2	Bege	cinza, brilhante	cinza cremosa, brilhante	rosa, cremosa	rosa, cremosa	cinza, seca	AC
CRL 18803	1	Lilás	Cinza	creme escuro, seca	rosa, seca	rosa, cremosa	AC	AC
CRA 40077	2	Cinza	cinza, brilhante, hialina	cremosa, brilhante	rosa, cremosa	rosa, mucóide	AC	AC
CN 90112	2	Lilás	cinza	marron escuro	rosa, mucóide	cinza*	rosa*	AC
<i>C. albicans</i> 90028	3	Verde	Cinza	marron claro	rosa, mucóide	AC	AC	Colônias brancas

1- crescimento na superfície, 2- quando o crescimento ocorreu logo abaixo da superfície, 3- crescimento no meio do tubo (microaerofilia); * colônias puniiformes; AC= ausência de crescimento.

Tabela 2. Termotolerância e atividade das exoenzimas produzidas pelos isolados do complexo *Cryptococcus laurentii*

Isolados	30°C	37°C	Ágar niger*	Catalase	DNase	Urease	Beta-glicosidase (esculina)	Gelatinase	Amilase	Fosfolipase (Pz)	Proteinase (Pz)	Atividade hemolítica (Hh)
CRL1	+	+	-	+	+	+	+	-	0,50	1,00	1,00	1,00
CRL2	+	+	-	+	+	+	+	-	0,37	1,00	1,00	1,00
CRL9	+	-	-	+	+	+	+	-	0,54	1,00	1,00	0,90
CRL12	+	+	-	+	+	+	+	-	0,34	1,00	1,00	0,90
CRL12B60	+	+	-	+	+	+++	+	+	0,42	1,00	1,00	0,89
CRL12B120	+	+	-	+	+	+	+	-	0,50	1,00	1,00	0,90
CRL2238	+	+	-	+	+	+	+	-	0,45	1,00	1,00	0,71
CRL18803	+	-	-	+	+	+++	+	+	0,30	1,00	1,00	0,77
CRA40077	+	-	-	+	+	+++	+	-	0,70	1,00	0,64	0,71
CN90112	+	+	+	-	+	+	+	+	1,00	1,00	1,00	0,70
<i>C. albicans</i> 90028	+	+	-	+	-	-	-	-	1,00	0,5	1,00	0,79

*= produção de melanina, pela ação da enzima fenoloxidase; +++= reação fraca e tardia; - = reação negativa; + = reação positiva.

Tabela 3. Halos de inibição ao redor dos discos com drogas antifúngicas

Isolados	Diâmetro dos halos ao redor dos discos de antifúngicos (em mm)		
	Anfotericina B	Voriconazol	Fluconazol
CRL1	15	31	17
CRL2	23	32	17
CRL9	35	40	23
CRL12	14	33	15
CRL12B60	18	33	15
CRL12B120	15	35	13
CRL2238	17	35	23
CRL 18803	27	38	25
CRA40077	15	30	15
CN90112	15	35	12
<i>C. albicans</i> 90028	21	40	28

Os isolados de *C. laurentii* cresceram nos meios ágar chocolate, ágar sangue, ágar EMB e ágar MacConkey. Estes são meios enriquecedores e seletivos utilizados para isolamento de bactérias a partir de diferentes espécimes diagnósticos, como espécimes nobres (líquidos orgânicos de cavidades fechadas: líquido, líquidos ascítico e outros) em que se utilizam ágar chocolate e ágar sangue e, ainda, meios seletivos e diferenciais como EMB, MacConkey e ágar SS, que possibilitam, sobretudo, o crescimento de bactérias gram-negativas do grupo das enterobactérias. No ágar SS, os isolados de *C. laurentii* apresentaram crescimento variável.

O ágar cromogênico *Candida* é utilizado em laboratório de micologia para presumir a identificação de algumas espécies conforme o pigmento das colônias. Os isolados de *C. laurentii* apresentaram pigmentações variáveis de colônias. O ágar Mycosel®, outro meio usado especialmente para crescimento de dermatófitos, foi utilizado e evidenciou-se a incapacidade de crescimento de isolados de *Cryptococcus*, uma vez que são inibidos pela ciclo-heximida, uma droga com atividade antifúngica seletiva utilizada nesse meio de cultura. O isolado de *Candida albicans*, utilizado como controle, resistiu à ciclo-heximida e cresceu no ágar Mycosel®.

As colônias dos isolados de *C. laurentii* não apresentaram características especiais nos meios ágar cromogênico, ágar chocolate, ágar sangue ou ágar EMB. No ágar MacConkey, apresentaram colônias rosas e cremosas. *C. neoformans* apresentou colônia de cor cinza e *C. albicans* não cresceu neste meio.

Foi possível verificar que alguns testes, utilizados na rotina de bacteriologia, podem ser úteis na sinalização de crescimento de leveduras em culturas de espécimes clínicos diversos. No processo de identificação de leveduras no laboratório, incluem-se as características das colônias em meios enriquecedores (como ágar Sabouraud) e em meios seletivos e diferenciais (por exemplo, meios cromogênicos, diferenciais, como ágar cromogênico *Candida* e ágar níger), que favorecem a triagem inicial. Colônias de *C. neoformans* e *C. gattii* apresentam

coloração marrom ou escura em meios contendo substratos fenólicos e difenólicos, como ágar níger, ágar semente de girassol ou L-dopa. Estas características diferenciam os isolados de *C. laurentii* e de outras espécies do gênero, que não produzem este pigmento ou o produzem fraca e tardiamente (18, 19).

As características bioquímicas para diferenciação de espécies de leveduras entre os isolados do mesmo gênero incluem testes de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio. Considerando, por exemplo, fontes como glicose, inulina, sacarose, rafinose, melibiose, galactose, lactose e nitrato, *C. laurentii* somente não assimila inulina e nitrato; o complexo *C. albidus* não assimila inulina e melibiose, mas assimila nitrato; *C. neoformans* e *C. gattii* não assimilam melibiose, lactose e nem nitrato (9, 10). Dessa forma, é possível, por testes clássicos utilizados em laboratório de micologia, direcionar a espécie ou complexo de espécies entre os isolados relativamente mais frequentes. Testes comerciais miniaturizados podem ser úteis e alguns identificam estas espécies. No entanto, uma avaliação crítica da identificação deve ser feita e testes adicionais poderão ser necessários em virtude da natureza heterogênea dos isolados com complexo *C. laurentii*.

Provas de fermentação de carboidratos não se prestam para identificação de espécies de *Cryptococcus*, visto que os isolados deste gênero não produzem gás a partir daquelas fontes. No exame microscópico diretamente do material clínico ou de colônias de cultura, as células geralmente apresentam cápsulas de espessura variável (10, 11, 19).

Assim como já foi descrito anteriormente na literatura (10, 19), os isolados de *C. laurentii* apresentam crescimento variável quando incubados à temperatura de 37°C, contribuindo para mostrar a diversidade fenotípica dos isolados desta complexa espécie. Nenhum dos isolados produziu melanina (atividade de fenoloxidase) em ágar níger, diferentemente do isolado de *C. neoformans*, que mostrou pigmento entre 24 e 48 horas de incubação. Todos os isolados de *C. laurentii* apresentaram atividades de DNase, urease (embora temporalmente variável), beta-glicosidase e amilase, enquanto os isolados utilizados como controle – *C. neoformans*, *C. albidus* e *Candida albicans* – apresentaram atividades variáveis (Tabela 2). A atividade hemolítica também foi variável entre os isolados de *C. laurentii* e nenhum deles produziu fosfolipase e proteinase. As exoenzimas por vezes são consideradas como fatores de virulência para os microrganismos, contribuindo com a possível invasão tecidual e com a patogênese de um processo infeccioso (18). *C. laurentii* apresenta potencial patogênico em algumas ocasiões, e este estudo pode contribuir para futuras evidências de seus mecanismos de patogenicidade.

A variabilidade na produção e atividade de algumas enzimas pode não ser constante dentro de uma mesma espécie de levedura. Entretanto, algumas vezes pode ser característica de uma espécie ou gênero de microrganismo. Em um estudo realizado por Oliveira e colaboradores (13), com isolados de *Candida* spp. em amostras de secreção vaginal, eles mostraram essa variação nas atividades das

enzimas hemolíticas, fosfolipases, proteinases, catalases e gelatinases, conforme diferentes espécies e em isolados de uma mesma espécie.

A resistência aos antifúngicos não é um fenômeno comum entre os fungos, não obstante os relatos de resistência de alguns isolados clínicos. Para isolados do gênero *Cryptococcus*, não existe padronização de pontos de corte para testes *in vitro* de sensibilidade aos antifúngicos, fazendo-se necessários novos estudos e padronização de técnicas e métodos que possam ser aplicados na clínica (16). No presente trabalho, todos os isolados apresentaram halos de inibição de crescimento ao redor dos discos contendo antifúngicos. Isso faz supor que a metodologia possa ser utilizada na identificação de isolados resistentes ou quando se tratar de isolados seriados. Em casos de infecções recorrentes ou que não respondam ao tratamento, deve-se comparar os halos dos isolados em ocasiões diferentes, o que servirá como método também de tipagem dos isolados. Em estudo anterior (16), foi mostrada a concordância do método de disco-difusão com o método de microdiluição em caldo, que sinalizou para outros estudos que buscassem a padronização da metodologia para isolados do complexo *C. laurentii* a fim de alcançar melhor concordância entre as metodologias.

Apesar de serem poucos os isolados de *C. laurentii* incluídos neste estudo, foi possível verificar que esta levedura cresce em meios de cultura diversos e apresenta características morfocoloniais genéricas em seus aspectos, bordas e colorações. A evolução que tem ocorrido na área médica tem possibilitado e exigido melhor preparo dos laboratórios que realizam serviços de micologia clínica, de forma que novos microrganismos, gêneros e espécies passaram a ser isolados e precisam ser identificados. Assim, dentre as leveduras do gênero *Cryptococcus*, *C. laurentii* está incluído entres aqueles que podem ser isolados de diversos espécimes diagnósticos. Dessa forma, foi possível concluir que *C. laurentii* apresenta crescimento em meios de cultura diversos e pode ser identificado por testes clássicos utilizados para identificação de leveduras no laboratório e, por vezes, necessita de testes adicionais. Quando for necessária a tipagem dos isolados, podem ser utilizados testes de pesquisa e atividade de exoenzimas e testes de sensibilidade *in vitro* a antifúngicos.

Estudos futuros que incluam outros isolados de espécies e gêneros diversos poderão fornecer resultados importantes para aplicação prática, segura e relativamente fácil, em comparação com as técnicas moleculares e mesmo com os dispositivos comerciais miniaturizados, automatizados ou não, que ainda são relativamente caros para uma rotina em microbiologia.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Instituto Oswaldo Cruz (INCQS-FIOCRUZ), pelo fornecimento das amostras de referência e à Profa. Dra. Cláudia Maria Leite Maffei, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, pelo fornecimento do isolado clínico.

REFERÊNCIAS

1. Banerjee P, Haider M, Trehan V, Mishra B, Thakur A, Dogra V, Loomba P. *Cryptococcus laurentii* Fungemia. *Indian J Med Microbiol* 31: 75-77, 2013.
2. Campos FL, Baroni FA. Isolados de *Cryptococcus neoformans*, *C. gattii* e *C. laurentii* produtores de protease e fosfolipase. *Rev Patol Trop* 39: 83-89, 2010.
3. CECON. Centro de Controle e Produtos para Diagnósticos Ltda. Discos de antifúngicos itraconazol, fluconazol e anfotericina B. *Cecon*, 2010.
4. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2009. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts. Approved Guideline – Second Edition. CLSI document M44-A2. *Clinical and Laboratory Standard Institute*. Wayne, Pennsylvania USA, 2009.
5. Dela Cruz TEE, Torres JMO. Gelatin hydrolysis test protocol, 2012. Disponível em: <<http://www.microbelibrary.org/library/laboratory-test/3776-gelatin-hydrolysis-test-protocol>>. Acessado em: 19 out. 2013.
6. Gomes FS, Sarmiento DN, Espírito Santo EPT, Silva SHM. Quimiotipagem e caracterização fenotípica de *Cryptococcus* isolados em Belém, Estado do Pará, Brasil. *Rev Pan-Amaz Saude* 1: 43-49, 2010.
7. Ikeda R, Sugita T, Jacobson ES, Shinoda T. Laccase and melanization in clinically important *Cryptococcus* species other than *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol* 40: 1214-1218, 2002.
8. Johnson LB, Bradley SF, Kauffman CA. Fungaemia due to *Cryptococcus laurentii* and a review of non-*neoformans* cryptococcaemia. *Mycoses* 41: 277-280, 1998.
9. Khawcharoenporn T, Apisarnthanarak A, Mundy LM. Non-*neoformans* cryptococcal infections: a systematic review. *Infection* 35: 51-58, 2007.
10. Kurtzman CP, Fell JW. *The yeasts: a taxonomic study*. Amsterdam, Elsevier Scientific BV, 1998. 1005p.
11. López-Martínez R, Castañón-Olivares L R. Procedimiento para el diagnóstico de laboratorio de la criptococosis. *Rev Mex Patol Clin* 43: 177-182, 1996.
12. Molina-Leyva A, Ruiz-Carrascosa JC, Leyva-García A, Husein-Elahmed H. Cutaneous *Cryptococcus laurentii* infection in an immunocompetent child. *Int J Infect Dis* 12: e1232-e1233, 2013.
13. Oliveira SKR, Anjos DCV, Gonçalves LHB, Ferro TAF, Monteiro SG, Figueiredo PMS, Monteiro CA. Prevalence and production of enzymes by *Candida* isolates from vaginal secretion samples. *Rev Patol Trop* 42: 161-176, 2013.
14. Oplustil CP, Zoccoli CM, Tobouti NR, Sinto SI. *Procedimentos básicos em microbiologia clínica*. São Paulo, Sarvier, 2000. 254p.
15. Pavlova K, Grigorova D, Hrisozova T, Angelov A. Yeast strains from Livingston Island, Antarctica. *Folia Microbiol* 46: 397-401, 2001.
16. Pedroso RS, Ferreira JC, Costa KRC, Candido RC. Evaluation of the disk diffusion method for testing fluconazole susceptibility of *Cryptococcus laurentii*. *Rev Patol Trop* 42: 42-48, 2013.
17. Pedroso RS, Ferreira JC, Lavrador MA, Maffei CM, Candido RC. Evaluation of the experimental inoculation of *Cryptococcus albidus* and *Cryptococcus laurentii* in normal mice: virulence factors and molecular profile before and after animal passage. *Mycopathologia* 168: 59-72, 2009.
18. Pedroso RS, Ferreira JC, Candido RC. The isolation and characterization of virulence factors of *Cryptococcus* spp. from saprophytic sources in the city of Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. *Microbiol Res* 164: 221-227, 2009.
19. Pedroso RS, Penatti MPA, Maffei CML, Candido RC. Infecções causadas por *Cryptococcus albidus* e *C. laurentii*: implicações clínicas e identificação laboratorial. *Newslab* 102: 96-104, 2010.
20. Rorig KCO, Colacite J, Abegg MA. Production of virulence factors in vitro by pathogenic species of the genus *Candida*. *Rev Soc Bras Med Trop* 42: 225-227, 2009.
21. Sanchez M, Colom F. Extracellular DNase activity of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Rev Iberoam Micol* 27: 10-13, 2010.

22. Shankar EM, Kumarasamy N, Bella D, Renuka S, Kownhar H, Suniti S, Rajan R, Rao UA. Pneumonia and pleural effusion due to *Cryptococcus laurentii* in a clinically proven case of AIDS. *Can Respir J* 13: 275-278, 2006.
23. Sugita T, Takashima M, Ikeda R, Nakase T, Shinoda T. Intraspecies diversity of *Cryptococcus laurentii* as revealed by sequences of internal transcribed spacer regions and 28S rRNA gene and taxonomic position of *Cryptococcus laurentii* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 38: 1468-1471, 2000.
24. Takashima M, Sugita T, Shinoda T, Nasase T. Three new combinations from the *Cryptococcus laurentii* complex: *Cryptococcus aureus*, *Cryptococcus carnescens* and *Cryptococcus peneaus*. *Int J Syst Evol Microbiol* 53: 1187-1194, 2003.