Testes para identificação e diferenciação de espécies do Complexo *Cryptococcus neoformans/gattii*: validação do processo para produção industrial.

Giulia S. Bruniéri, Luzia Lyra, Franqueline R. Lima e Angélica Z. Schreiber.

Resumo

A criptococose é um relevante problema de saúde pública no Brasil e a diferenciação entre os dois principais agentes causais, *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*, é crucial para garantir a abordagem terapêutica correta. Laboratórios clínicos que não dispõem de espectômetros de massa ou acesso a técnicas moleculares, para identificação precisavam preparar seus próprios meios de cultura clássicos: ágar Niger e ágar CGB, este último de preparo demorado, trabalhoso e dispendioso pelo grande número de reagentes necessários. Neste trabalho, foi possível ajustar e validar a preparação destes meios em escala industrial para a comercialização no Brasil. Os dois meios, em conjunto, permitiram a identificação e diferenciação segura das espécies, com ótimo desempenho, representando uma boa opção para diagnóstico laboratorial confiável e uma alternativa acessível e adequada para centros de diagnóstico microbiológico. Ambos já estão devidamente registrados na ANVISA e podem ser comercializados.

Palavras-chave: Criptococose, diagnóstico, microbiologia.

Introdução

Cryptococcus neoformans é agente causal de meningite criptocócica, relevante problema de saúde pública no Brasil, em razão das altas taxas de infecção em indivíduos imunocomprometidos sendo a principal causa fúngica de morte em pacientes com AIDS. *Cryptococcus gattii*, por sua vez, acomete principalmente pacientes imunocompetentes, com altas taxas de morbidade e mortalidade. A diferenciação entre estas espécies é crucial para guiar corretamente o tratamento, de acordo com o status imunológico do paciente. Laboratórios clínicos que não dispõem de espectômetro de massa ou acesso a técnicas moleculares, para identificação precisavam preparar seus próprios meios de cultura clássicos: ágar Niger para identificação do gênero e o Ágar CGB (L-canavanina – glicina - azul de bromotimol), para diferenciação entre as duas espécies. Este último de preparo demorado, trabalhoso e dispendioso pelo grande número de reagentes necessários. Para permitir que maior número de laboratórios pudesse utilizar a técnica e adquirir os meios na medida de seu consumo, o objetivo deste trabalho, foi ajustar e validar a preparação destes meios em escala industrial para a comercialização no Brasil.

Resultados e Discussão

Trinta cepas foram utilizadas para validar os meios de cultura: 9 *C. gattii* (8 isolados clínicos e 1 ATCC), 10 *C. neoformans* (9 isolados clínicos, sendo 1 *C. neoformans* var. *grubii* e 1 ATCC), e 11 outras espécies, incluindo 3 *C. laurentii*, 2 *C. albidus*, 1 *C. humicola*, 1 *Candida parapsilosis*, 1 *Candida krusei*, 1 *Candida albicans*, 1 *Candida auris* e 1 *Trichosporon mucoides*, para checagem de reações cruzadas.

O resultado positivo para gênero em ágar Niger observase com o crescimento de colônias marrons. Em CGB, o meio mantém sua cor verde original no caso de *C. neoformans* e há a produção de coloração azul cobalto (positivo) no meio para *C. gattii*. Os testes foram repetidos mensalmente até completar 6 meses de armazenamento para avaliação de reprodutibilidade e determinação do prazo de validade do produto.

Na prova com Ágar Niger os resultados foram positivos para *C. neoformans/gattii* mas não para as demais cepas, como esperado. Na prova com ágar CGB, de 9 cepas de *C. gattii*, apenas 7 apresentaram resultado positivo, enquanto apenas 6 das 9 cepas de *C. neoformans* resultado negativo. Repetiu-se o teste com CGB para as cepas com resultado anterior inconclusivo com o esperado, mas desta vez repicando-se as colônias a partir do Ágar Niger. Deste modo, todas as cepas geraram no CGB o resultado esperado. As demais espécies diferentes que reagiram em CGB tiveram resultado negativo em Niger, não passando na prova de gênero e, portanto, seriam desconsideradas.

Após 6 meses da data de fabricação, o desempenho foi decaindo, com resultados inconclusivos ou colorações dos meios diferentes da ideal, indicando, limitando então também 6 meses o prazo de validade dos produtos.

Conclusões

Os meios de cultura produzidos industrialmente mostraram bom desempenho, de acordo com os resultados esperados para os microrganismos avaliados. A realização sequencial dos testes em ágar Niger e CGB é uma ótima opção para a obtenção de um diagnóstico laboratorial confiável. O prazo de validade de 6 meses é bastante viável e comum a outros insumos utilizados na rotina diagnóstica.

Estes meios de cultura são uma alternativa adequada e acessível para centros de diagnóstico que não possuem a infraestrutura para utilizar métodos mais sofisticados e onerosos.

Agradecimentos

Ágar CGB e Ágar Niger foram elaborados com apoio da área de desenvolvimento da empresa LaborClin-LTDA e já conquistaram seus registros na ANVISA.

1. KWON-CHUNG, K. J.; POLACHEK, I.; BENNETT, J. E. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C). *Journal of Clinical Microbiology*, v. 15, n. 3, p. 535–537, mar. 1982.
2. STRACHAN, A. A.; YU, R. J.; BLANK, F. Pigment Production of *Cryptococcus neoformans* Grown with Extracts of *Guizotia abyssinica*. *Applied Microbiology*, v. 22, n. 3, p. 478–479, set. 1971.