

# Ocorrência de *Cryptococcus neoformans* em fezes de pombos na cidade de Caratinga, MG – Brasil

## *Occurrence of Cryptococcus neoformans in pigeon droppings in the city of Caratinga, MG – Brazil*

Joelma Teixeira Contin<sup>1</sup>, Geislane da Silva Quaresma<sup>1</sup>, Elsa Fernandes da Silva<sup>2</sup>, Valter Roberto Linardi<sup>3</sup>

### RESUMO

*Cryptococcus neoformans* é uma levedura encapsulada de grande importância médica, por ser o agente etiológico da criptococose. É encontrada em fontes ambientais, incluindo fezes de pombos, constituindo-se em importante causa de morbidade e mortalidade em indivíduos imunodeprimidos em todo o mundo. Contudo, ainda não há estudos sobre sua ecologia na cidade de Caratinga. Para pesquisar fontes saprofíticas de *C. neoformans*, foram coletadas 30 amostras de excretas de pombos em 10 diferentes locais. A levedura foi isolada em todos os locais pesquisados em 27 (90%) amostras, confirmando sua ocorrência em fontes ambientais na cidade de Caratinga, MG.

**Palavras-chave:** *Cryptococcus neoformans*; Criptococose; *Columbidae*.

<sup>1</sup> Acadêmica do Curso de Farmácia do Centro Universitário de Caratinga – UNEC. Caratinga, MG – Brasil.

<sup>2</sup> Bióloga Centro Universitário de Caratinga – UNEC. Caratinga, MG – Brasil.

<sup>3</sup> Professor da Faculdade de Medicina do Centro Universitário de Caratinga – UNEC. Caratinga, MG – Brasil.

### ABSTRACT

*Cryptococcus neoformans* is encapsulated yeast of great medical importance once it is the etiologic agent of cryptococcosis. It is found in environmental sources, including pigeon droppings, being an important cause of morbidity and mortality in immunocompromised individuals worldwide. However, there are no studies on its ecology in the city of Caratinga. In order to search saprophytic sources of *C. neoformans*, a total of 30 samples of pigeon droppings in 10 different locations were collected. The yeast was isolated in 27 (90%) samples in the areas where the research was carried out in, confirming their occurrence in environmental sources in the city of Caratinga, MG.

**Key words:** *Cryptococcus neoformans*; *Cryptococcosis*; *Columbidae*.

### INTRODUÇÃO

A imagem do pombo está associada ao símbolo de paz, religião e amor, o que a torna distante de ser considerada uma praga. Entretanto, em 1979, já tinham sido descritas, por Weber, 57 doenças associadas aos pombos, desde aquelas que afetam somente as aves até as que infectam o homem e outros animais.<sup>1</sup> O acúmulo de fezes de pombos em edifícios públicos, monumentos e moradias é muitas vezes tão grande, que a tarefa de limpeza se torna não só dispendiosa, mas de risco para quem a executa, caso cuidados básicos não sejam adotados no ambiente e com o trabalhador.<sup>2</sup> Muitos são os problemas encontrados pelo acúmulo de fezes, penas e restos de ninhos, que levam a entupimentos de sistemas de drenagem de águas de chuva, comprometimento no funcionamento de equipamentos diversos e riscos de contaminações em fontes de água e alimentos. No entanto, o mais grave é a

Recebido em: 02/12/2009  
Aprovado em: 20/04/2010

**Instituição:**  
Centro Universitário de Caratinga – UNEC, Campus II  
Caratinga, MG – Brasil.

**Endereço para correspondência:**  
Valter Roberto Linardi  
Rua: Ligúria 115  
Bairro: Bandeirantes  
Belo Horizonte, MG – Brasil  
CEP: 31340-360  
Email: linardivr@yahoo.com.br

grande quantidade de microrganismos patogênicos e parasitas veiculados por essas aves, especialmente em seus excrementos.<sup>2</sup> Entre os vários microrganismos veiculados através de seus excrementos, merece destaque o *Cryptococcus neoformans*. Trata-se da forma assexuada do basidiomiceto *Filobasidiela neoformans*, uma levedura encapsulada que se reproduz por brotamento e que possui grande importância médica, por ser o agente etiológico da criptococose. Tal levedura sobrevive nas excretas por vários meses, de forma que diversos substratos contaminados podem agir como fontes de infecção durante tempo prolongado.<sup>2</sup> Apresenta cápsula composta de polisacarídeos antigênicos, a qual protege a levedura da ação de células fagocitárias, tais como monócitos, macrófagos e neutrófilos, fator que contribui para a diminuição da resposta imunológica.<sup>3</sup>

Segundo Fries<sup>4</sup>, a cápsula dessa levedura é composta de polissacarídeos antigênicos, tais como tais glicuronoxilomana (GXM), galactoxilomana (Galxm) e manoproteína (MP). O glicuroxilomana é o principal constituinte, sendo responsável por potencializar a infecção, inibindo a resposta inflamatória e a fagocitose, além de reprimir tanto a imunidade humoral quando a celular.<sup>5</sup> Outro fato importante é a capacidade da levedura de crescer a 37°C.<sup>6</sup>

Como resultado de sua ação metabólica, o *C. neoformans* produz uréase, que inativa o sistema do complemento. Além disso, também produz fenol-oxidase, um dos fatores responsáveis por sua patogenicidade.<sup>2</sup>

Segundo Faganello<sup>7</sup>, outras características do parasito que contribuem para sua virulência incluem a secreção de proteinases, fosfolipases extracelulares e produção de manitol. Acredita-se que as proteinases contribuam para a virulência, degradando proteínas dos tecidos do hospedeiro, como colágeno, elastina e fibrinogênio, e/ou destruindo proteínas com funções imunológicas importantes, como imunoglobulinas e fatores do complemento. A levedura ainda pode produzir uma enzima fenol oxidase, identificada como uma lacase, que pode sintetizar melanina a partir de precursores com L- e D- Dopa, dopamina, epinefrina e norepinefrina.

Existem duas variedades de *C. neoformans*: *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo A, D, e AD) e *C. neoformans* var. *gattii* (sorotipo B e C).<sup>8</sup> *C. neoformans* var. *neoformans* é cosmopolita e tem nicho ecológico urbano, habitando solo rico em fezes de aves. É um patógeno oportunista, acometendo especialmente indivíduos imunodeprimidos. O *C. neoformans* var. *gattii*

é de nicho ecológico rural, de ocorrência sazonal, relacionada à floração do eucalipto, apresentando propensão a causar doença em hospedeiro hígido, como patógeno primário. Ambas as variedades exibem tropismo para o sistema nervoso central. A variedade *neoformans* é frequentemente isolada do sangue e da urina e a variedade *gattii* usualmente ocasiona consolidações pulmonares, sendo detectada no escarro. O tratamento antifúngico é mais prolongado na variedade *gattii*, normalmente havendo necessidade de cirurgia pulmonar ou cerebral, embora a evolução se dê para a cura. Já nos paciente infectados com *C. neoformans* var. *neoformans*, a mortalidade é alta.<sup>8</sup>

A infecção pelo *C. neoformans* acontece por meio da inalação de seus propágulos. O pulmão é o local primário de infecção. Ela é frequentemente assintomática, caracterizada por um nódulo pulmonar solitário, semelhante a um carcinoma. Pode causar pneumonia sintomática, que se caracteriza por infiltrados pulmonares difusos. A levedura pode migrar para outras partes do corpo, apresentando tropismo pelo SNC, no qual causa meningite, meningoencefalite ou encefalite.<sup>8</sup> Ocasionalmente, o acometimento do sistema nervoso central (SNC) pode assumir a forma de massa intercerebral expansiva, causando deficiências neurológicas focais. Outras manifestações comuns da criptococose disseminada incluem lesões cutâneas ósseas osteolíticas.<sup>9</sup>

A preferência pelo SNC deve-se à alta concentração, no liquor, de nutrientes assimiláveis pela levedura, como tiamina, ácido glutâmico, glutamina, carboidratos e minerais; deve-se também à falta de atividade do complemento e à resposta inflamatória fraca ou ausente no parênquima cerebral.<sup>7</sup>

Antes de 1981, a criptococose era uma doença rara e, já no início dos anos 90, tornou-se epidêmica em algumas regiões. Com o surgimento da síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA), na década de 80, a criptococose deixou de ser rara, passando a ocupar o quarto lugar entre as doenças infecciosas. Além da SIDA, outros fatores que colaboram para o aumento na incidência dessa doença são enfermidades como leucemia, linfoma, lúpus eritematoso sistêmico, doença de Hodgkin, sarcoidose e o aumento do número de transplantes de órgãos e terapias imunossupressora. Alguns países em desenvolvimento, nos quais o acesso ao tratamento é limitado, a mortalidade devida à criptococose em pacientes com SIDA ultrapassa 30%.<sup>7-10</sup>

No Brasil, dados do Ministério da Saúde no período de 1980 a 1999 mostraram que 4,5% das infecções oportu-

tunistas associadas a pacientes portadores de vírus da imunodeficiência humana (VIH) foram causadas por *C. neoformans*. No entanto, como a criptococose não representa doença de notificação compulsória, é provável que o número de casos seja mais alto.<sup>7</sup>

O perfil epidemiológico desse agente no Brasil foi traçado por meio de um estudo envolvendo 467 isolados clínicos e ambientais de *C. neoformans*, com as seguintes prevalências: sorotipo A (77,9%), sorotipo B (18,2%), sorotipo AD (1,3%), sorotipo D (0,4%), sorotipo C (0,2%) e não tipificáveis (1,9%). O sorotipo A prevalece nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, enquanto o sorotipo B predomina nas regiões Norte e Nordeste.<sup>8</sup>

Estudo realizado em hospital de Minas Gerais demonstrou que, entre os fatores de risco associados à micose, a SIDA se apresentava em 81,3% dos casos. A meningoencefalite criptocócica prevaleceu em 56,3% dos casos, sendo a manifestação clínica mais descrita. Dos pacientes, 59,4% foram tratados com anfotericina B ou derivados triazólicos, sendo que 72,9% evoluíram para óbito, em particular os portadores de SIDA, que corresponderam a 65% dos casos.<sup>9,10</sup>

As infecções pulmonares primárias são frequentemente assintomáticas e podem ser detectadas como achado incidental em radiografia de tórax de rotina. Mais frequentemente, observa-se um nódulo pulmonar solitário, que pode assemelhar-se a um carcinoma. Em geral, o diagnóstico é estabelecido quando a massa é removida, possibilitando a identificação laboratorial da levedura.<sup>9</sup>

O diagnóstico laboratorial da criptococose é baseado em três fundamentos: a demonstração da levedura no material clínico; o isolamento em cultura, seguido de provas bioquímicas para a identificação final; e a pesquisa de antígenos circulantes. A pesquisa direta da levedura pode ser realizada em espécimes como liquor, escarro, lavado brônquico, pus de lesões cutâneo-mucosas, urina, macerados de tecidos obtidos por biópsia, secreção prostática, sangue e punção de medula óssea.<sup>7</sup>

Segundo a Secretaria Estadual de Saúde do Rio Grande do Sul, 430 casos foram notificados entre 1999 e 2004. No entanto, como a criptococose não é uma doença de notificação compulsória, é provável que o número de casos seja ainda mais alto.<sup>5</sup>

Com o objetivo de descrever as características clínicas e laboratoriais da meningoencefalite criptocócica, segundo Darzé<sup>9</sup>, foram analisados retrospectivamente 96 prontuários de pacientes com esse diagnóstico, internados em um hospital no estado

da Bahia, entre janeiro de 1972 e dezembro de 1996. As apresentações clínicas relatadas por esse estudo revelam que o tempo de doença, considerado como o período decorrido entre o início da sintomatologia e o diagnóstico, variou de dois a 150 dias. A cefaleia foi o sintoma mais comum, seguido de febre e rigidez de nuca. Também foram relatadas alterações visuais e de comportamento, edema de papila, hemiparesia e afasia. Fatores predisponentes foram identificados em 15 pacientes, 12 com SIDA, um com diabetes *mellitus*, um com hepatite crônica ativa em uso de corticoide há um ano e um com doença de Hodgkin e uso de corticoide há dois anos. Dos 96 pacientes, 55 (57,3%) receberam alta e 41 (42,7%) evoluíram para óbito.

A cidade de Caratinga foi escolhida para a realização da pesquisa por apresentar fatores predisponentes para o desenvolvimento de grande quantidade de pombos.

## MATERIAIS E MÉTODOS

As coletas foram realizadas no período de fevereiro a abril de 2009. Foram estipulados 10 locais diferentes, com três amostras em cada local, totalizando 30 amostras. Os locais compreenderam a área central e bairros, sendo: três igrejas, três residências, três pontos de comércio e uma escola. As amostras foram raspadas de excretas envelhecidas e secas e acondicionadas em frascos plásticos estéreis por até 24 horas em temperatura ambiente.

O material foi processado em câmara de fluxo laminar. As amostras foram trituradas e homogeneizadas em gral com pistilo de porcelana previamente esterilizado.

Do material, 0,5 g foi homogeneizado e suspenso em 5 mL de solução estéril de cloreto de sódio a 0,9%. Após agitação em vórtex por três minutos e repouso por 30 minutos à temperatura ambiente, o sobrenadante foi aspirado e 0,1 mL semeado em placa de Petri com meio de ágar *Sabouraud* dextrosado a 2% com repetições em duplicata.

As placas foram incubadas em estufa à temperatura de 30°C e observadas diariamente até sete dias. Foi então estimada numericamente a quantidade de propágulos de *C. neoformans* existentes em cada amostra positiva com base na contagem das colônias características que se desenvolveram a partir da semeadura de 0,1 mL, que é equivalente a 0,01 g de fezes; essa contagem foi expressa em UFC/g.

As colônias aparentemente lisas, úmidas, brilhantes e de coloração creme foram repicadas na forma de estrias em placas com ágar *Sabouraud* 2% para isolamento e posterior realização do exame direto e prova de identificação (prova da uréase).

O exame direto das colônias foi feito por meio de montagens de lâminas com tinta da China e observado ao microscópio óptico, no qual as leveduras com formas regulares, encapsuladas, globosas, arredondadas, unibrotantes ou multibrotantes e sem hifas ou pseudo-hifas sugeriram a existência do *Cryptococcus neoformans*.

A prova confirmatória de identificação foi realizada pelo teste da produção de uréase. Para tal, foi utilizado o meio de cultura ágar ureia. Uma alça de platina foi inoculada em toda a superfície do ágar inclinado, com subsequente incubação a 30°C e observação durante sete dias. A habilidade da levedura de utilizar ureia por ação da enzima uréase foi verificada pela alcalinidade e resultante viragem do indicador de pH. O resultado positivo foi evidenciado a partir da viragem do indicador da cor amarela inicial do meio, como demonstrado pelo tubo A na Figura 1, para cor rosa ou vermelho final, visibilizado no tubo B na Figura 1, sendo a intensidade da coloração final indicativa do grau de hidrólise da ureia e atividade de uréase.<sup>11</sup>

## RESULTADOS

A levedura *C. neoformans* foi isolada nos 10 locais, correspondendo a 100%, e em 27 amostras, o equivalente a 90%. Foram observadas até 20.000 unidades formadoras de colônias/grama de material semeado (Tabela 1), confirmando sua ocorrência em fontes ambientais na cidade de Caratinga.

## DISCUSSÃO

O cultivo da levedura em laboratório é simples, pois se desenvolve facilmente em meio ágar *Sabouraud* formando colônias lisas, mucoides e de cor creme, como observado na Figura 2. Segundo Mitchell e Perfect<sup>12</sup>, o grau de mucosidade da colônia pode estar relacionado ao montante da cápsula.

Foram visibilizadas leveduras com formas regulares, globosas, arredondadas, encapsuladas, unibrotantes e sem hifas ou pseudo-hifas (Figura 3). A base para a visibilização pelo princípio de coloração negativa é que a cápsula afasta as partículas da tinta da China,

formando um halo claro em torno da mesma; esse fato torna difícil a visibilização de linhagens sem cápsulas. É um método de importante utilidade, rápido e barato.<sup>5</sup>

**Tabela 1** - Distribuição das amostras de *C. neoformans* em 27 amostras colhidas em 10 locais diversos de Caratinga, MG, fevereiro-abril, 2009

Local	<sup>1</sup> Ponto	Exame direto com tinta da China	Teste da Uréase	<sup>2</sup> UFC/g
1	A	negativo	negativo	0
	B	negativo	negativo	0
	C	positivo	positivo	1500
2	A	positivo	positivo	20000
	B	positivo	positivo	20000
	C	positivo	positivo	20000
3	A	positivo	positivo	20000
	B	positivo	positivo	20000
	C	positivo	positivo	20000
4	A	positivo	positivo	3950
	B	positivo	positivo	20000
	C	positivo	positivo	20000
5	A	positivo	positivo	2650
	B	positivo	positivo	1650
	C	negativo	negativo	0
6	A	positivo	positivo	20000
	B	positivo	positivo	20000
	C	positivo	positivo	7350
7	A	positivo	positivo	20000
	B	positivo	positivo	20000
	C	positivo	positivo	20000
8	A	positivo	positivo	8100
	B	positivo	positivo	7150
	C	positivo	positivo	5600
9	A	positivo	positivo	20000
	B	positivo	positivo	8900
	C	positivo	positivo	20000
10	A	positivo	positivo	4800
	B	positivo	positivo	5150
	C	positivo	positivo	7150

<sup>1</sup> repetições em duplicata.

positivo- presença de *C. neoformans*.

negativo- ausência de *C. neoformans*.

UFC/g- unidade formadora de colônias/g de material processado.

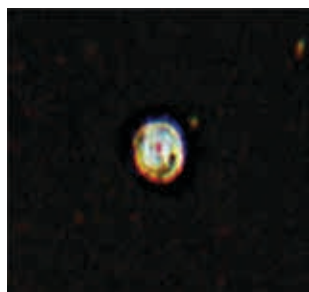
<sup>2</sup>UFC/g- média das repetições.

A cápsula potencializa a infecção de forma que deprime a inflamação, inibe a fagocitose e suprime tanto a imunidade humoral quanto a celular.<sup>12</sup> De acordo com Casadevall *et al.*<sup>13</sup>, recentes estudos *in vivo* sugerem que o *C. neoformans* é patógeno intracelular facultativo. Para sobreviver nos macrófagos, a levedura utiliza nova estratégia para o parasitismo intracelular, que inclui o acúmulo de polissacarídeo intracelular em vesículas citoplasmáticas, sendo a ingestão seguida por dano na membrana fagossomal. A confirmação poderia proporcionar novas

perspectivas em várias áreas de mau entendimento da patogênese criptocócica, incluindo mecanismos de latência, persistência e a falta de eficácia da imunidade humoral.



**Figura 1** - Teste da uréase: A (negativo), B (positivo).



**Figura 2** - Cápsula de *C. neoformans* visibilizado com tinta nanquim. Aumento 400x.



**Figura 3** - Crescimento de *C. neoformans* em ágar-sabouraud.

Em condições fisiológicas, essa reação pode resultar em aumento do pH e tem mostrado ser importante fator de patogenicidade.

Apesar de haver alguns raros relatos de casos de cepas de *C. neoformans* uréase-negativas que causaram infecção humana, a maioria dos isolados clínicos produzem grandes quantidades de uréase.<sup>14</sup> Segundo Faganello<sup>7</sup>, outras características que contribuem para a virulência incluem a secreção de proteinases, fosfolipases extracelulares e produção de manitol. Emmons<sup>14</sup>, no início da década de 1950, já fazia referência às excretas de pombos (*Columba livia*) como fontes saprofíticas de *C. neoformans* em ambientes urbanos. No entanto, de acordo com os estudos de Mitchell e Perfect<sup>12</sup>, as aves não se tornam infectadas, provavelmente porque a sua temperatura corporal é relativamente elevada, tornando-se hostil ao *C. neoformans*. Em 41°C, a levedura é inibida ou morta e essa restrição de temperatura pode ser um importante determinante de sua patogenicidade. Mas as aves são susceptíveis de distribuir as leveduras na natureza.

Os resultados encontrados trazem à luz a questão da importância de minimizar-se o risco de exposição a focos ambientais da levedura em locais de circulação pública e abrem interessante perspectiva sobre a ecologia do *C. neoformans* e epidemiologia da criptococose, pois a ausência de uma política de controle ambiental urbana traz riscos e desafios à saúde pública.

## REFERÊNCIAS

1. Schuller M. Pombos Urbanos - um caso de saúde pública. SBCC. 2005; 19:32-7.
2. Nunes VFP. Pombos urbanos: o desafio de controle. Inst Biol. 2003; 65:89-92.
3. Mezzari A, Rodrigues LRP, Reolon A. Prevalência de *Cryptococcus neoformans* nos pombos urbanos na cidade de Porto Alegre. J Bras Patol Med Lab. 2004; 40:293-8.
4. Fries BC, Goldman DL, Cherniak R, Ju R, Casadevall A. Phenotypic Switching in *Cryptococcus neoformans* Results in Changes in Cellular Morphology and Glucuronoxylomannan Structure. Infect Immun. 1999; 67: 6076-83.
5. Leal, AL. Diferenciação das espécies de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* utilizando a metodologia PCR multiplex e determinação do perfil epidemiológico de pacientes com meningite criptocócica [dissertação]. Biblioteca digital Ufrgs. 1, 2006, 17-100.

6. Severo LC, Oliveira FM, Silva VB. Diferenças clínicas, epidemiológicas e ecológicas entre as duas variedades de *Cryptococcus neoformans*. Rev Med St Casa. 1998;9: 1672-86.
7. Faganello J. Estudo da variabilidade e diferenças morfológicas entre as espécies *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* por análise de diferença representacional e microscopia eletrônica de varredura [tese]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2008.
8. Nishikawa MM, Lazera MS, Barbosa GG, Triles L, Balassiano BRB, Macedo RCL, et al. Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* Isolates from Clinical and Environmental Sources in Brazil: Analysis of Host and Regional Patterns. J Clin Microbiol. 2003;41:73-7.
9. Darzé C, Lucena R, Gomes I, Melo A. Características clínicas laboratoriais de 104 casos de meningoencefalite criptocócica. Rev Soc Bras Med Trop. 2000; 33:21-6.
10. Borges AS, Ribas RM, Ferreira, MS, Moreira TA. Criptococose: estudo clínico- epidemiológico, laboratorial e das variedades do fungo em 96 pacientes. Rev Soc Bras Med. 2006; 39:255-8.
11. Cox GM, Mukherjee J, Cole GT, Casadevall A, Perfect JR. Urease as a virulence factor in experimental Cryptococcosis. Infect Immun. 2000; 68, 443-8.
12. Mitchell TG, Perfect JR. Cryptococcosis in the Era of AIDS—100 Years after the Discovery of *Cryptococcus neoformans*. Clin Microbiol. 1995; 8:515-48.
13. Casadevall A, Turker S, Feldmesser M. Intracellular parasitism of macrophages by *Cryptococcus neoformans*. Trends Microbiol. 2001; 9: 273-8.
14. Emmons CW. Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with the pigeon (*Columba livia*). Am J Epidemiol. 1955; 62:227-32.
15. Feldmesser M, Casadevall A. Mechanism of action of antibody to capsular polysaccharide in *Cryptococcus neoformans* infection. Pub Med. 1998; 3:136-51.