

Investigação Ambiental de *Cryptococcus neoformans* na Cidade de Votuporanga – São Paulo

Cátia Rezende, Cláudia Jaqueline Martinez Munhóz, Gláucia Gomes de Almeida

Centro Universitário de Votuporanga – UNIFEV – Curso de Biomedicina

Resumo

Cryptococcus neoformans é uma levedura capsulada causadora de criptococose em humanos e animais, estando associado com várias fontes ambientais, tais como excretas de aves, frutas e detritos de plantas. Foram analisadas amostras de fezes de pombos para estudar as fontes saprofíticas de *C. neoformans*, em áreas urbanas na cidade de Votuporanga – SP. Suspensões em salina estéril das amostras foram semeadas em placas com ágar Níger. Após cinco dias, colônias mucóides marrom-escuro foram subcultivadas para identificação através de provas morfofisiológicas. Ao término da análise micológica, nenhuma colônia isolada foi identificada como *Cryptococcus neoformans*. A ausência de *C. neoformans* nas excretas de pombos demonstra que estudos ambientais mais amplos necessitam ser feitos futuramente para monitorar a frequência e determinar a prevalência, uma vez que dados da literatura indicam estas são as principais fontes ambientais urbana, associado ao fato da constante exposição aos pombos nos centros urbanos nos dias atuais.

Palavra-chave: Excretas de pombos, *Cryptococcus neoformans*, fontes saprofíticas

Summary

Environmental investigation of *Cryptococcus neoformans* in Votuporanga City – São Paulo

Cryptococcus neoformans is an encapsulated yeast agent of human and animal cryptococcosis, has been associated with various natural sources, such as avian excreta, fruits and plant material. To study saprophytic sources of *C. neoformans*, in urban areas in city of Votuporanga – SP, were analyzed samples of pigeon dropping. The samples were suspended in sterile saline and then inoculating onto niger seed agar medium in Petri dishes. Five days later melanoid yeast colonies were subcultivated for identification by morphophysiological tests. At the end of serial mycological studies, none of these isolates was identified as *Cryptococcus neoformans*. The absence of *C. neoformans* in pigeons droppings that demonstrates that more extensive environmental studies need to be done in the future to monitor the frequency and to determine the prevalence; since that datas of literature indicate the main environment urban sources, associated to the fact of the constant exposition to the pigeons in the urban centers in the current days.

Keywords: Pigeon droppings, *Cryptococcus neoformans*, saprophytic sources

Introdução

Cryptococcus *neoformans*, patógeno oportunista que causa meningoencefalite principalmente em indivíduos infectados pelo HIV, é uma levedura capsulada, ubíqua, isolada de diversas fontes ambientais (1, 2, 3, 4).

Esta espécie apresenta cinco sorotipos (A, B, C, D e AD) e recentemente foi subdividida em três variedades conhecidas como *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A), *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D) e *C. neoformans* var. *gattii* (sorotipo B e C) (5). Já a correta designação para os isolados

de sorotipo AD ainda não foi estabelecida (6). Os sorotipos diferem em aspectos ecológicos, epidemiológicos, fisiológicos e genéticos (7, 8, 9).

Há uma correlação entre distribuição geográfica dos sorotipos no meio ambiente e manifestação clínica da criptococose (10). Os sorotipos A, D e AD têm distribuição cosmopolita relacionada a várias fontes naturais, principalmente excretas de pombos e solos contaminados com excretas de grande variedade de aves (11, 12, 13, 14, 15). Mais recentemente, foi demonstrada em diferentes localidades a associação com madeira em decomposição em ocas de árvores, sugerindo

um novo habitat natural e um possível nicho ecológico para a levedura (1, 2, 10, 16, 17, 18).

Por outro lado, *C. neoformans* var. *gattii* foi inicialmente isolado de *Eucalyptus* em diferentes países, seguindo-se de detritos de algumas espécies de plantas (10, 1, 19, 16, 13, 20, 21). Estudo desenvolvido por ABEGG et al. (11), no Brasil, demonstrou a presença desta variedade em amostras de fezes de diferentes espécies de aves.

Cryptococcus neoformans var. *neoformans/grubii* é um importante agente oportunista em pacientes imunodeprimidos, ganhando destaque nos dias

atuais, não só pelo aumento populacional, mas sobretudo pelo crescente número de hospedeiros suscetíveis (4). Em contraste, a var. *gattii* comporta-se como patógeno primário, acometendo hospedeiros imunocompetentes (22, 8).

Vários estudos têm demonstrado a capacidade do *Cryptococcus neoformans* em colonizar o trato digestório de pombos, comportando-se como um saprófita natural. As excretas de pombos podem ser consideradas importantes substratos para a presença e manutenção da levedura na natureza (12). A adaptação de pombos aos centros urbanos e, conseqüentemente, a presença desta levedura nas fezes destes, constituem uma importante fonte ambiental de transmissão para a população, inclusive de poeira domiciliar (23, 24, 25). Associado a este fato, estudos demonstram alta ocorrência de criptococose no Brasil, justificando o interesse pela investigação de fontes ambientais de *Cryptococcus* (26, 27). Desta maneira, o propósito deste estudo é verificar a presença desta levedura nas excretas de pombos em diferentes regiões do município de Votuporanga, São Paulo.

Materiais e Métodos

Vários locais da cidade de Votuporanga, São Paulo, foram analisados, sendo escolhidos os que apresentavam grandes quantidades de pombos. Trinta amostras de excretas de pombos foram coletadas aleatoriamente nos seguintes locais: Praça da Matriz, Praça São Bento, Praça do Rotary, Praça Santa Luzia e arredores da Casa de Saúde. Teve-se o cuidado de se coletar materiais envelhecidos e secos, encontrados no solo.

As amostras foram colhidas em frascos plásticos estéreis e acondicionadas sob refrigeração (8 a 12°C) por 24 horas. O material foi processado em câmara de fluxo laminar no Laboratório de Microbiologia da UNIFEV – Centro Universitário de Votuporanga. As amostras foram homogeneizadas em gral com pistilo, esterilizado. Cerca de 1g do material foi suspenso em solução fisiológica estéril contendo cloranfenicol. O material foi agitado em vórtex por 3 minutos e deixado em repouso por 30 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi aspirado e 0,1mL foi semeado em cada placa de Petri com Ágar Niger (*Guizotia abyssinica*), contendo 0,2g/L de cloranfenicol. Foram semeadas 10 placas por amostras, incubadas à temperatura ambiente (26-27°C) e observadas diariamente por sete dias. O controle positivo deste ágar foi realizado através do cultivo de cepa de *Cryptococcus neoformans* variedade *neoformans* sorotipo A, cedida pelo Departamento de Micologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Araraquara.

Colônias suspeitas de *Cryptococcus* (lisas, úmidas, brilhantes e de coloração marrom-escura) foram sub-

cultivadas em ágar Sabouraud com cloranfenicol e incubadas à temperatura ambiente. A identificação foi realizada segundo os critérios: características macroscópicas das colônias, características microscópicas (tinta Nanquim), e testes fisiológicos como produção de uréase, termotolerância a 35°C, sensibilidade a cicloheximida e testes de assimilação de carbono e nitrogênio (¹²-modificado).

Resultados e Discussão

Dados mundiais indicam altos índices de meningite – 42,8 milhões/pacientes ao ano (28). A infecção provém de fontes ambientais, existindo uma correlação entre distribuição geográfica das variedades no meio ambiente e manifestação clínica (10).

A investigação de surtos comunitários de criptococose tem resultado numa melhor compreensão de fontes de transmissão (29), incentivando aos estudos que possam identificar o nicho ecológico desta levedura.

Lopez-Martinez *et al.* (15) analisaram 711 amostras de várias fontes ambientais, na cidade do México, tais como: fezes de aves, frutas e vegetais; relatando a presença de *C. neoformans* var. *neoformans* em 9,5% das amostras de fezes, 9,5% nas frutas e 4,2% nos vegetais.

Em outro estudo realizado em Bogotá, Colômbia, 480 amostras de detritos de árvores e 89 amostras de fezes foram investigadas. Das amostras de plantas, 99% eram *C. neoformans* var. *gattii* e 1% *C. neoformans* var. *grubii*; já das amostras de fezes somente foi isolada a variedade *grubii* (1).

No Brasil, Goiânia, Kobayashi *et al.* (2) relataram *C. neoformans* var. *grubii* de amostras de excretas de pombos e material de detritos de eucaliptos e ausência nas amostras de excretas de aves de aviculturas, de solos e de árvores ornamentais. Estudo semelhante desenvolvido por Nishikawa *et al.* (7) analisou 80 amostras ambientais obtidas de

excreta de pássaros, poeira doméstica, detritos de árvores e fezes de morcegos em diferentes regiões do Brasil, indicando diferenças regionais nas distribuições dos sorotipos e isolados de *C. neoformans* do ambiente urbano, não somente associado com excretas de pombos e aves, mas também associado com árvores.

Recentemente, foi demonstrada a associação saprofítica de *C. neoformans* var. *neoformans/grubii* com madeira em decomposição de árvores no Brasil, constituindo um novo habitat natural e indicando um possível nicho ecológico para o fungo (16, 17, 18); uma vez que vários estudos indicam uma forte ligação destas variedades com fezes de pombos. Swinne (30) e Bauwens *et al.* (31) também isolaram *C. neoformans* var. *grubii* de árvores tropicais.

Estudos demonstraram que a var. *gattii* é raramente observada em fezes de aves, mesmo utilizando melhor a creatinina como fonte de nitrogênio do que a var. *grubii/neoformans* (11). Entretanto, Lazera *et al.* (18) isolaram esta variedade de fezes de morcegos, em sótãos de casas antigas no Rio de Janeiro.

Filiú *et al.* (12) demonstraram a presença de *C. neoformans* var. *grubii* em 50% das 20 amostras de excretas de aves de cativeiros na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. Dados semelhantes foram relatados por Abegg *et al.* (11), no Rio Grande do Sul, que isolaram *C. neoformans* var. *grubii* em 87% das amostras de excretas de psitáceos.


Passoni *et al.* (24) encontraram em torno de 15% de positividade de isolamento de *C. neoformans* var. *neoformans* de excretas de aves em cativeiros, como canários, periquitos e outros psitacídeos, assim como na poeira doméstica na cidade do Rio de Janeiro.

Em nosso estudo, das 30 amostras de excretas de pombos analisadas, 100% foram negativas para *Cryptococcus neoformans*; dificuldade na identificação do nicho ecológico de *C. neoformans* também foi relatada por Laurenson *et*

al. (28). Hamasha *et al.* (32) analisaram 509 amostras de excretas de pombos não isolando *C. neoformans*. Estes dados contrastam com os relatados anteriormente, que indicam esta fonte um importante nicho ecológico.

A ausência de *C. neoformans* nas excretas de pombos demonstra que há a necessidade de estudos complementares com uma amostragem maior por um período de tempo mais prolongado; já que há evidência de que o *C. neoformans* é mais frequentemente isolado nas estações mais úmidas e de fezes secas (1). Nas fezes úmidas, a decomposição bacteriana causa uma forte alcalinização do substrato e inibição do crescimento do *C. neoformans* (8).

Outra hipótese, que poderia ter dificultado o isolamento desta levedura nas excretas de pombos, foi pelo crescimento rápido de fungos filamentosos contaminantes que sobrepujam a da levedura, levando a um resultado falso-negativo (33). Além disso, outras técnicas poderiam ser utilizadas, como por exemplo, a metodologia usada por Soares *et al.* (34), onde foram feitas exposições das placas por 15 minutos perto do acúmulo de fezes e cultura das mesmas, em placas de Petri com Sabouraud e Ágar Niger, ambos com cloranfenicol.

A alta biodiversidade de *C. neoformans*, isolado de diversas fontes ambientais nas áreas urbanas do Brasil, sugere a possibilidade dos pacientes entrarem em contato com múltiplas fontes de inoculação diariamente ao longo da vida (35). Estudos subseqüentes para monitorar a frequência e determinar a prevalência de *C. neoformans* em excretas de pombos, fazem-se necessários; uma vez que dados da literatura indicam estas as principais fontes ambientais urbana, associado ao fato da constante exposição aos pombos nos centros urbanos nos dias atuais. 



Correspondências para:
Cátia Rezende
catia_rezende@terra.com.br

Referências Bibliográficas

1. Granados DP, Castañeda E. Isolation and characterization of *Cryptococcus neoformans* varieties recovered from natural sources in Bogotá, Colombia, and study of Ecological conditions in the Area. *Microb. Ecol.* 2005; 49: 282-290.
2. Kobayashi CCBA, Souza LKH, Fernandes OFL, Brito SCA, Silva AC, Sousa ED, et al. Characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated from urban environmental sources in Goiânia, Goiás State, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 2005; 47:203-207.
3. Pappalardo MCSM, Melhem MSC. Cryptococcosis: a review of Brazilian experience for the disease. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 2003; 45(6): 209-305.
4. Mitchel TG, Perfect JR. Cryptococcosis in the era of AIDS-100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clin. Microbiol. Rev.* 1995; 8(7): 515-548.
5. Franzot SP, Salkin LF, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37: 838-840.
6. Lengeler KB, Cox GM, Heitman J. Serotype AD strains of *Cryptococcus neoformans* are diploid or aneuploid and are heterozygous at the mating-type locus. *Infect. Immun.* 2001; 69: 115-122.
7. Nishikawa MM, Lazera MS, Barbosa GG, Trilles L, Balassiano BR, Macedo RCL et al. Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from Clinical and environmental sources in Brazil: analysis of host and regional patterns. *Journal of Clinical Microbiology* 2003; 41:73-77.
8. Kwong-Chung KJ, Bennett JE. Cryptococcosis. In: Kwong-Chung, K.J. & Bennett, J.E. *Medical Mycology*. Philadelphia, Lea & Febiger, 1992. p.397-446.
9. Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Epidemiologic differences between the varieties of *Cryptococcus neoformans*. *American Journal of Epidemiology* 1984; 120: 123-130.
10. Blaschke-Hellmessen, R. *Cryptococcus* species-etiological agents of zoonoses or sapronosis? *Mycoses* 2000; 43:48-60.
11. Abegg MA, Cella FC, Faganello J, Valente P, Schrank A, Vainstein MH. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolated from the excreta of Psittaciformes in a Southern Brazilian Zoological Garden. *Mycopathologia* 2006; 161:83-91.
12. Filiú WFO, Wanke B, Aguenta SM, Vilela VO, Macedo RCL, Lazera M. Cativeiro de aves como fonte de *Cryptococcus neoformans* na cidade de Campo Grande. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2002; 35(6): 591-595.
13. Montenegro H, Paula CR. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* and *C. neoformans* var. *neoformans* in the city of São Paulo, Brazil. *Med. Mycol.* 2000; 38:385-390.
14. Caicedo LD, Alvarez MI, Delgado M, Cardenas A. *Cryptococcus neoformans* in bird excreta in the city zôo of Cali, Colômbia. *Mycopathologia* 1999; 147: 121-124.
15. Lopez-Martinez R, Castanon-Olivares LR. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* from bird droppings, fruits and vegetables in Mexico City. *Mycopathologia* 1995; 129: 25-28.
16. Lazera MS, Cavalcanti MAS, Londero AT, Trilles L, Nishikawa M M, WANKE B.. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. *Medical Mycology* 2000; 38: 379-383.
17. Lazera MS, Pires FDA, Camilo-Coura L, Nishikawa MM, Bezerra CC F, Trilles L et al. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in decaying wood forming hollows in living trees. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* 1996; 34: 127-131.
18. Lazera MS, Wanke B, Nishikawa MM. Isolation of both varieties of *Cryptococcus neoformans* from saprophytic sources in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* 1993; 31: 449-454.
19. Davel G, Abrantes R, Brudny M, Cordoba S, Rodero L, Canteros CE et al. 1st environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Argentina. *Rev. Argent. Microbiol.* 2003; 35:110-112.
20. Bezerra CCF, Wanke B, Cavalcanti MAS et al. *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* e var. *gattii* isolados de *Eucalyptus camaldulensis* no Brasil. In: Congresso Brasileiro de Micologia; 1998; Rio de Janeiro. p.183.
21. Krockenberger MB, Canfield PJ, Malik R. *Cryptococcus neoformans* in the koala (*Phascolarctos cinereus*): colonization by *C. n.* var. *gattii* and investigation of environmental sources. *Med. Mycol.* 2002; 40: 263-272.
22. Rosenbaum R, Gonçalves AJP. Clinical epidemiological study of 171 cases cryptococcosis. *Clin. Infect. Dis.* 1994; 18(3): 369-380.

23. Passoni LFC, Wood, animals, and human beings as reservoir for human *Cryptococcus neoformans* infection. *Revista Iberoamericana de Micologia* 1999; 16: 77-81.
24. Passoni LFC, Wanke B, Nishikawa MM, Lazera MS. *Cryptococcus neoformans* isolated from human dwellings in Rio de Janeiro, Brazil: An analysis of domestic environment of AIDS patients with and without cryptococcosis. *Medical Mycology* 1998; 36: 305-311.
25. Swinne D, Deppner M, Laroche R, Floch JJ, Kadende P. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from houses of AIDS-associated cryptococcosis patients in Bujumbura (Burundi). *AIDS* 1989; 3: 389-390.
26. Fernandes OFL, Passos XS, Souza LKH, Miranda ATB, Cerqueira CHPV et al. In vitro susceptibility characteristics of *Cryptococcus neoformans* varieties from AIDS patients in Goiania, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2003; 98(6): 839-841.
27. Ohkusu M, Tangonan N, Takeok et al. Serotype, mating type and ploidy of *Cryptococcus neoformans* strains isolated from patients in Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 2002; 44:299-302.
28. Laurenson IF, Lalloo DG, Naraqi S, Seaton RA, Trevett AJ, Matuka A et al. *Cryptococcus neoformans* in Papua New Guinea: a common pathogen but an elusive source. *J. Med. Vet. Mycol.* 1997; 35: 437-440.
29. Ellis D, Marriott D, Hajjeh RA, Warnock D, Meyer W, Barton R. Epidemiology: surveillance of fungal infections. *Med. Mycol.* 2000; 38:173-182.
30. Swinne, D. Ecology of *Cryptococcus neoformans* and epidemiology of cryptococcosis in the old World. In: Torres-Rodriguês, J. M., ed. *Proceedings of the X Congress of the International Society for Human and Animal Mycology*; 1988; Barcelona: Prous Scientific, 1988.
31. Bauwens L, Swinne D, De Vroey C, De Meurichy W. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in the aviaries of the Antwerp zoological gardens. *Mikosen* 1986; 29(7): 291-294.
32. Hamasha AM, Yildiran ST, Gonlum A, Saracli MA, Doganci L. *Cryptococcus neoformans* varieties from material under the canopies of eucalyptus trees and pigeon dropping samples from four major cities in Jordan. *Mycopathologia* 2004; 158: 195-199.
33. Fortes ST, Lazera MS, Nishikawa MM, Macedo RCL, Wanke B. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from a native jungle tree in the Brazilian Amazon Rainforest. *Mycoses* 2001; 44:137-140.
34. Soares MCB, Paula CR, Dias ALT, Caseiro MM, Costa SOP. Environmental strains of *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* in the city of Santos, SP, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 2005; 47(1): 31-36.
35. Igreja RP, Lazera MS, Wanke B, Galhardo MC, Kidd SE, Meyer W. Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients of the Brazilian city, Rio de Janeiro. *Med Mycol* 2004, 42:229-38.



NewsLab
a revista mais
disputada do
mercado laboratorial