

Ocorrência de *cryptococcus neoformans* em excretas dos pombos da cidade de Guaraí/TO

A presença de pombos em locais com grande circulação de pessoas se torna um grave problema da saúde, devido as fezes desses animais apresentaram microrganismos causadores de infecções oportunistas nos seres humanos. O *Cryptococcus neoformans* é uma levedura encapsulada que se reproduz por brotamento e que possui grande importância médica, por ser o agente etiológico da criptococose. O objetivo deste estudo é investigar a ocorrência de *Cryptococcus neoformans* nas excretas de pombos em locais públicos da cidade de Guaraí/TO e analisar os principais fatores de virulência encontrados na literatura, associados a essas leveduras. As amostras foram coletadas com o auxílio de espátulas, máscaras e luvas e armazenadas em frascos plásticos estéreis, padronizados e identificados quanto ao local e data de coleta. As amostras foram cultivadas em ágar sabouraud dextrose a 37°C e observados diariamente, por até 10 dias, para avaliação macromorfológica das colônias. A micromorfologia foi realizada através do exame direto com tinta nanquim e se utilizou a hidrólise da ureia para confirmação do fungo. Dentre as amostras selecionadas para compor este estudo 75% (6/8) apresentaram presença de leveduras revestidas com cápsulas polissacarídicas. No entanto, apenas 62,5% (5/8) das amostras coletadas apresentaram reação positiva para o teste confirmatório, o teste da uréase. É importante que a população se atente aos riscos da saúde que podem estar sendo expostos diariamente frequentando os locais que apresentaram amostras positivas para este fungo, sendo visível a necessidade de políticas de controle de natalidade de aves urbanas.

Palavras-chave: Criptococose; *Columba livia*; HIV.

Occurrence of *cryptococcus neoformans* in excreta from pigeons in the city of Guaraí/TO

The presence of pigeons in places with large circulation of people becomes a serious health problem, due to the feces of these animals, they presented microorganisms that cause opportunistic infections in humans. *Cryptococcus neoformans* is an encapsulated yeast that reproduces by budding and has great medical importance, as it is the etiological agent of cryptococcosis. The objective of this study is to investigate the occurrence of *Cryptococcus neoformans* in the excrement of pigeons in public places in the city of Guaraí/TO and to analyze the main virulence factors found in the literature, associated with these yeasts. The samples were collected with the aid of spatulas, masks and gloves and stored in sterile plastic bottles, standardized and identified as to the place and date of collection. The samples were grown on sabouraud dextrose agar at 37°C and observed daily, for up to 10 days, for macromorphological evaluation of the colonies. Micromorphology was performed through direct examination with ink and urea hydrolysis was used to confirm the fungus. Among the samples selected to compose this study, 75% (6/8) presented the presence of yeasts coated with polysaccharide capsules. However, only 62.5% (5/8) of the samples collected showed a positive reaction for the confirmatory test, the urea test. It is important that the population be aware of the health risks that may be exposed daily by visiting the places that presented positive samples for this fungus, being visible the need for birth control policies for urban birds.

Keywords: Cryptococcosis; *Columba livia*; HIV.

Topic: Microbiologia

Received: 22/04/2019

Approved: 13/08/2019

Reviewed anonymously in the process of blind peer.

Mateus Silva Santos 
Instituto Educacional Santa Catarina, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/4059367759608845>
<http://orcid.org/0000-0002-0811-8869>
biomateus07@outlook.com

Gustavo Oliveira Silva 
Instituto Educacional Santa Catarina, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/0594099265805639>
<http://orcid.org/0000-0001-5935-1698>
mateus.santos@iescfag.edu.br

Matheus Victor de Moura Nascimento
Instituto Educacional Santa Catarina, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/1591420514467740>
mateus.santos@iescfag.edu.br

Liberta Lamarta Favoritto Garcia Neres 
Instituto Educacional Santa Catarina, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/0563097731032602>
<http://orcid.org/0000-0003-1327-605X>
liberta.neres@iescfag.edu.br



DOI: 10.6008/CBPC2674-6506.2019.002.0001

Referencing this:

SANTOS, M. S.; SILVA, G. O.; NASCIMENTO, M. V. M.; NERES, L. L. F. G. Ocorrência de *cryptococcus neoformans* em excretas dos pombos da cidade de Guaraí/TO. *Health of Humans*, v.1, n.2, p.1-7, 2019. DOI: <http://doi.org/10.6008/CBPC2674-6506.2019.002.0001>

INTRODUÇÃO

Os pombos são aves que vivem com facilidade nas cidades, residindo em edificações onde costumam fazer seus ninhos em telhados, forros, caixas de ar condicionado, torres de igrejas e marquises, causando prejuízos por danificar as estruturas dos prédios. Entretanto, são frequentes os estudos que identificam doenças associadas a esses animais, desde aquelas que afetam somente as aves até as que infectam o homem (SCHULLER, 2005).

No entanto a presença em grande escala desses animais leva a problemas graves. O acúmulo de fezes de pombos em edifícios públicos, monumentos e moradias são muitas vezes tão grande, que a tarefa de limpeza se torna não só desnecessária, mas de risco para quem a executa, caso cuidados básicos não sejam adotados no ambiente e com o trabalhador (NUNES, 2003). As excretas dessas aves podem conter a presença de parasitas e microrganismos patogênicos. Entre os vários agentes etiológicos, merece destaque o *Cryptococcus neoformans*. Trata-se da forma assexuada de basidiomiceto *Filobasidiela neoformans*, uma levedura encapsulada que se reproduz por brotamento e que possui grande importância médica, por ser o agente etiológico da criptococose (CONTIN et al., 2011).

A criptococose em humanos normalmente ocorre quando o fungo é inalado, e atinge os pulmões, levando a pneumonia. No entanto, existe uma preferência pelo Sistema Nervoso Central (SNC), devido à alta concentração de Líquido Cefalorraquidiano (LCR) que por sua vez, contém nutrientes assimiláveis pela levedura, como tiamina, ácido glutâmico, glutamina, carboidratos e minerais (FAGANELLO, 2008). A resposta imunológica nessa região é baixa o que garante a levedura uma alta taxa de disseminação no SNC. A infecção tem sido descrita em pacientes de todas as idades, contudo, ocorre com mais frequência em adultos jovens e pessoas de meia idade, especialmente do sexo masculino (ROZENBAUM et al., 1994) No grupo pediátrico a micose basicamente ocorre nos imunodeprimidos (GAVALI et al., 1995).

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 da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) na década de 80, a criptococose deixou de ser rara, passando a ocupar o quarto lugar entre as doenças infecciosas que mais acometem indivíduos soropositivos. Além da AIDS, outros fatores que colaboram para o aumento da incidência dessa doença são enfermidades como leucemias, linfomas, lúpus eritematoso sistêmico, quimioterapias e aumento de transplante de órgãos, ou seja, reações onde o sistema imunológico fica totalmente enfraquecido e em risco (BORGES et al., 2006; FAGANELLO, 2008).

A infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Adquirida (HIV) ainda é uma realidade em todo território brasileiro, sendo a região Norte do país uma das mais afetadas pela doença. O Estado do Tocantins, segundo dados disponibilizados pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) apresentou 1.334 indivíduos infectados durante o período de 2007 a 2018. Uma das características mais observadas durante o processo de infecção pelo vírus HIV é a presença de infecções oportunistas como a criptococose, levando os indivíduos acometidos a hospitalização, e requerendo em algumas situações, tratamentos dispendiosos e muito tóxicos, podendo resultar no encurtamento da sobrevivência destes pacientes (CHAISSON et al., 1998).

O estudo tem relevância sócio sanitária, sendo assim leva a esclarecer o índice da espécie na região, e definir um diagnóstico quanto às condições de saúde ambiental do local contribuindo para a promoção de medidas preventivas e o bem-estar da população alertando com relação ao fungo e sua patogenia levando em conta o efeito que a mesma causa no organismo dos seres humanos. O objetivo deste estudo é investigar a ocorrência de *Cryptococcus neoformans* nas excretas de pombos em locais públicos da cidade de Guaraí/TO e analisar os principais fatores de virulência encontrados na literatura, associados a essas leveduras.

MATERIAIS E MÉTODOS

Características do local

O presente estudo foi realizado no Município de Guaraí, situado no interior do Estado do Tocantins. Segundo o IBGE (2018), o referido Estado localiza-se ao norte do Brasil e sua área se estende em um território de aproximadamente 277.772 km². O município mencionado se situa as margens da BR - 153, entre as coordenadas geográficas: 08°50'03"S 48°30'37"W (IBGE, 2018). Para a pesquisa foram selecionados 03 locais públicos da cidade de Guaraí, (1) o antigo hotel transbrasiliana (2) a praça da Igreja Matriz São Pedro e (3) o hospital regional de Guaraí, onde a presença de pombos é constantemente observada e por apresentarem muitos frequentadores.

Coleta de Amostras

As amostras foram coletadas com o auxílio de espátulas, máscaras e luvas e armazenadas em frascos plásticos estéreis, padronizados e identificados quanto ao local e data de coleta. Foram coletadas amostras fecais durante o período setembro de 2019, por não apresentar um clima úmido e chuvoso o que garantiu uma coleta de excretas secas, presentes no solo e ideais para a investigação do microrganismo.

Processamento das Amostras

As amostras coletadas foram encaminhadas ao laboratório do Instituto Educacional Santa Catarina/Faculdade Guaraí (IESC/FAG), onde foram processados os resíduos fecais, para o isolamento e identificação do fungo.

Isolamentos e identificação das leveduras

Cada amostra foi homogeneizada utilizando 2g de excretas em 20ml de solução salina acrescida de cloranfenicol (0,2g/L). Os tubos foram levados à agitação em vórtex por 3 min, e mantidos em repouso por 30 min para decantação e obtenção do sobrenadante. Uma alíquota de 0,1mL do sobrenadante foi retirada e semeada em triplicata, com alças de Drigalski estéreis, em ágar sabouraud dextrose. Os cultivos foram incubados a 37°C e observados diariamente, por até 10 dias, para avaliação macromorfológica das colônias. A micromorfologia foi realizada através do exame direto com tinta nanquim visualizando em microscopia óptica (400X). Para confirmação do *C. neoformans*, utilizou-se a hidrólise da ureia.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a realização dos procedimentos de semeadura em ágar Sabouraud dextrose e incubação a 37°C por aproximadamente 10 dias foi possível observar o crescimento de colônias em coloração bege e aspecto cremoso em todas as placas semeadas. Para a análise morfológica do microrganismo foi empregado o exame direto com tinta nanquim para a observação da cápsula polissacarídica formada pela levedura. A tabela 1 demonstra os resultados obtidos.

Tabela 1: Distribuição de amostras coletadas em 3 locais diversos de Guarai - TO em setembro de 2019.

| Local | Ponto de coleta | Exame direto com tinta nanquim | Teste de uréase |
|-------|-----------------|--------------------------------|-----------------|
| 1 | A | Positivo | Positivo |
| | B | Positivo | Positivo |
| | C | Positivo | Positivo |
| | D | Positivo | Positivo |
| 2 | A | Negativo | Negativo |
| | B | Negativo | Negativo |
| 3 | A | Positivo | Positivo |
| | B | Positivo | Negativo |

Positivo – presença de *C. neoformans*. Negativo – ausência de *C. neoformans*.

Dentre as amostras selecionadas para compor este estudo 75% (6/8) apresentaram presença de leveduras revestidas com cápsulas polissacarídicas (Figura 1). Para a confirmação da levedura patogênica foi realizado o teste de produção da uréase. A diferença de coloração do meio de cultura que permite a diferenciação de amostras positivas e negativas pode ser observado na figura 2.



Figura 1: Presença da cápsula polissacarídica em amostra corada com tinta nanquim, aumentativo de 40x.



Figura 2: Prova da uréase demonstrando resultados negativos (estrutura esquerda) e positivos (estrutura direita) para *C. neoformans*.

Por possuir morfologia muito similares entre si, as leveduras patogênicas se tornam mais difíceis de diferenciar através das técnicas de coloração convencionais. No entanto o *C. neoformans* promove a formação de uma cápsula polissacarídica que reveste toda a estrutura do microrganismo, um fator de virulência considerável tendo em vista o potencial patogênico dessa espécie. Para a visualização adequada desta estrutura, é necessário a utilização da tinta nanquim para uma melhor evidência do microrganismo. É

importante ressaltar que, mesmo com a micromorfologia do fungo sendo observada na maioria das amostras, é indispensável a aplicação de provas de caráter confirmatório.

É possível observar resultados similares ao abordado no presente estudo, quando analisados artigos na literatura. Contin et al. (2011) em seu estudo avaliou a ocorrência de *C. neoformans* em fezes de pombo na cidade de Caratinga/MG, onde através da análise direta com tinta da china conseguiu isolar a levedura em 90% (27/30) das amostras coletadas. Os resultados obtidos pelos pesquisadores evidenciam um grande risco de saúde pública uma vez que, os locais utilizados para a coleta das amostras demonstravam um grande fluxo de pessoas como: igrejas, residências, pontos comerciais e escolas. No estudo de Faria et al. (2010) fica evidente que *C. neoformans* está presente em locais onde ocorre acúmulo de excretas de pombos, e o estreito contato de humanos e animais com essas aves em áreas urbanas indica um risco em potencial para saúde pública, principalmente para indivíduos imunossuprimidos.

A habilidade da levedura de utilizar ureia por ação da enzima uréase pode ser verificada pela alcalinidade e resultante viragem do indicador de pH. Segundo Cox et al. (2000) O resultado positivo é evidenciado a partir da mudança da cor amarela inicial do meio para cor rosa ou vermelho final, sendo a intensidade da coloração final indicativa do grau de hidrólise da ureia e atividade de uréase. Com relação as 62,5% amostras coletadas que apresentaram reação positiva para o teste da uréase, em um dos casos, mesmo com a micromorfologia da levedura sendo sugestível a *C. neoformans*, não foi observado mudança significativa na cor do meio o que leva a hipótese de uma possível contaminação por fezes de outras aves, por se tratar de um local onde é visível a alta concentração de pássaros. No entanto, ainda no local 3 foi possível o isolamento e identificação de uma amostra positiva para *C. neoformans*, o que pode ser caracterizado como um problema sério visto que, o local selecionado comporta um imenso número de indivíduos imunodeprimidos e crianças recém-nascidas, ofertando um risco para a saúde dos frequentadores.

No estudo de Mezzari et al. (2014) foi avaliado a presença de *Cryptococcus* spp. nas excretas de pombos na cidade de Porto Alegre/RS, onde das 168 amostras coletadas em diferentes hospitais da região, 11 apresentaram resultados positivos, isolados em todas as estações do ano. A prevalência desse fungo em locais de risco como: escolas e hospitais trazem consequências graves, por se tratar do principal agente causador da meningite fúngica, que pode levar ao óbito se não tratada corretamente. Indivíduos frequentadores destes locais passam a se tornar potenciais alvos, mesmo sem o contato direto com as fezes desses animais, devido a capacidade do fungo de ser transportado pelo ar, entrando em contato pelas vias aéreas do indivíduo.

A presença total de amostras positivas (4/4) no local de coleta 1 também é preocupante. Mesmo sendo um local abandonado, o fluxo de pessoas ainda é bastante intenso, devido o lugar abrigar alguns comerciantes ambulantes que fazem uso do espaço. É possível observar a presença de barracas que vendem lanches em pleno convívio com os animais residentes daquele local. Ainda não existem relatos de infecção pelo *C. neoformans* através da ingestão de alimentos contaminados.

Das amostras coletadas para este estudo, as que foram provenientes do local de coleta 2 não apresentaram resultados positivos no exame com tinta nanquim e no teste da uréase. Esses resultados não descartam a possibilidade de contaminação do lugar pelo fungo, mesmo as amostras não terem apresentado resultados expressivos. A localidade em questão não apresenta muitos animais quando comparada com os outros pontos de coleta e por se tratar de um edifício em pleno funcionamento, é possível que possa ter ocorrido a limpeza do lugar nos dias em que foi realizada a obtenção das amostras, com conseqüente perda de material.

Entender os principais locais onde o fungo possa estar presente é de suma importância para verificar os possíveis riscos de uma exposição ao *C. neoformans*. No estudo de Santos et al. (2018), através de uma revisão sistemática foi possível verificar que a região Sudeste foi a que mais apresentou resultados positivos nos últimos anos, principalmente pelo fluxo de pessoas nessa região ser bem maior devido a presença das grandes metrópoles. Ainda foi verificado no estudo dos pesquisadores que, o principal tipo de amostra que foi utilizado para a identificação do *C. neoformans* foi as excretas de pombos e madeira de eucalipto, sendo importante a verificação dos fatores de virulência associados ao fungo.

C. neoformans possui fatores de virulência bem definidos, os quais são conhecidos por desempenhar funções importantes na sua patogenicidade uma vez que lhes permitem transpor as defesas do hospedeiro, sobreviver e causar doença. Vários desses fatores têm sido estudados em modelos de animais e identificados através de métodos bioquímicos e moleculares.

Segundo Fernandes (2010) o crescimento a 37°C, a presença de cápsula polissacarídica, e habilidade de produzir melanina são os principais fatores de virulência, considerados essenciais para o estabelecimento da infecção e sobrevivência do fungo no hospedeiro. Além da produção de proteinase, fosfolipase, uréase, manitol e superóxido dismutases, presentes nas leveduras do complexo *C. neoformans* contribuirão para esta virulência.

CONCLUSÕES

Através das análises realizadas no presente estudo, foi possível concluir que 62,5% das amostras coletadas apresentaram resultados positivos. Sendo o ponto de coleta 1 o mais preocupante por apresentar *C. neoformans* em todas as amostras coletadas. O fungo passa a ser um preocupante problema de saúde pública por ser um dos maiores causadores de óbitos em pacientes imunodeprimidos, principalmente em indivíduos portadores do vírus HIV.

Mesmo sendo evidente que o fungo não promove infecções através da contaminação de alimentos, é importante que a população se atente aos riscos de saúde que podem estar sendo expostos diariamente frequentando os locais que apresentaram amostras positivas para *C. neoformans*. Dentre os pontos de coleta presentes neste estudo, é importante destacar o hospital do município, uma vez que as fezes destes animais presentes no local são extremamente perigosas, devido a quantidade de indivíduos portadores do vírus HIV, transplantados e recém-nascidos que circulam diariamente nas redondezas do lugar.

Atualmente se vê a necessidade de políticas de controle de natalidade de aves urbanas como os pombos, por promoverem ações indesejadas como danos a edifícios residenciais e comerciais, além do grave risco de saúde que estão associadas. Conscientizar a população sobre os hábitos de alimentar essas aves e o impacto que isso pode causar na saúde pública da região, pode ser uma boa medida de intervenção a ser tomada.

REFERÊNCIAS

BORGES, A.; RIBAS, R.; FERREIRA, M.; MOREIRA, T.. Criptococose: estudo clínico-epidemiológico, laboratorial e das variedades do fungo em 96 pacientes. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.39, p.255-258, 2006.

CHAISSON, R.; GALLANT, J.; KERULY, J.; MOORE, R.. Impact of opportunistic disease on survival in patients with HIV infection. **AIDS**, v.12, p.29-33, 1998.

CONTIN, J. T.; QUARESMA, G. S.; SILVA, E. F.; LINARD, V. R.. Ocorrência de *Cryptococcus neoformans* em fezes de pombos na cidade de Caratinga, MG – Brasil. **Revista Médica de Minas Gerais**, v.21, n.1, p.19-24, 2011.

COX, G. M.; MUKHERJEE, J.; COLE, G. T.; CASADEVALL, A.; PERFECT, J. R.. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. **Infection and Immunity**, v.68, n.2, p.443-8, 2000. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/iai.68.2.443-448.2000>

FAGANELLO, J.. **Estudo da variabilidade e diferenças morfológicas entre as espécies *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gatii* por análise de diferença representacional e microscopia eletrônica de varredura**. Tese (Doutorado em Biologia celular e Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

FARIA, R. O.. Ocorrência de *Cryptococcus neoformans* em excretas de pombos na cidade de Pelotas, Estado do Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.43, n.2, p.198-200, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822010000200018>

FERNANDES, O. F. L.. **Fatores de Virulência em *Cryptococcus neoformans*. Suscetibilidade In Vitro e alterações**

morfológicas em células melanizadas e não melanizadas na presença de voriconazol, anfotericina B e extrato bruto da folha de *P. pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum. Tese (Doutorado em Medicina Tropical e Saúde Pública) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.

GAVAL, M.; GAUR, S.; FRENKEL, L.. Successful treatment of cryptococcosis in a premature neonate. **The Pediatric Infectious Diseases Journal**, v.14, p.1009-1010, 1995.

MEZZARI, A.; WLIBELLING, A. M. P.; WENCZENOVICZ, C.; SOUZA, C. D. A.; FREITAS, G. S. O.; BARBOZA, L. D.; PENA, L. D.; KISSMANN, N.; PORTICH, J. P.; CARNEIRO, L. C.; BEHAR, P. R. P.. Presença de *Cryptococcus* spp. nas excretas de pombos nos arredores de Hospitais de Porto Alegre. **Revista Pan-americana de Infectologia**, v.16, n.3, p.153-60, 2014.

NUNES, V.. Pombos urbanos: o desafio de controle. **Instituto Biológico**, v.65, p.89-92, 2003.

ROZENBAUM, R.; GONÇALVES, A.. Clinical epidemiologic study of 171 cases of Cryptococcosis. **Clinical infectious diseases**, v.18, p.369-380, 1994

SANTOS, M. S.; SILVA, A. M. T. C.; ATAIDES, F. S.; PASSOS, X. S.. Evaluation of cases of *Cryptococcus neoformans* isolated from environmental focus in Brazil: Systematic review. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.7, n.10, p.60-70, 2018. DOI: <http://doi.org/10.20959/wjpps201810-12393>

SCHULLER, M.. Pombos Urbanos - Um caso de saúde pública. **Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação**, v.19, p.32-7, 2005.