

OCORRÊNCIA DE *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* (SANFELICE) VUILLEMIN (1901) EM EXCRETAS DE POMBOS NO PERÍMETRO URBANO DE SALVADOR, BAHIA, BRASIL

LÍLIAN S. SANTANA¹, MISAEL S. FERREIRA COSTA² & LUSINETE A. DE QUEIROZ²

¹Bióloga formada pela Universidade Estadual de Feira de Santana. Departamento de Ciências Biológicas, Km 03, BR 116, 44031-460, Feira de Santana, Bahia, Brasil (liu.uefs@ig.com.br)

²Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Micologia, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brasil (misael@uefs.br)

(Ocorrência de *Cryptococcus neoformans* (Sanfelice) Vuillemin (1901) em excretas de pombos no perímetro urbano de Salvador, Bahia, Brasil) – *Cryptococcus neoformans* é uma levedura capsulada, cosmopolita, causadora da criptococose humano. Duas variedades de *C. neoformans* são tradicionalmente reconhecidas: *C. neoformans* var. *neoformans*, agente oportunista da criptococose em indivíduos imunocomprometidos e *C. neoformans* var. *gattii*, causador da criptococose em pessoas aparentemente saudáveis, comportando-se como um verdadeiro patógeno em regiões tropicais e subtropicais. As principais fontes ambientais de *C. neoformans* são solos contaminados com excretas de pombo (var. *neoformans*) ou associado a madeira do eucalipto em decomposição, nos ocios de árvores vivas (var. *gattii*). O presente trabalho tem como objetivo verificar a presença de *C. neoformans* em excretas de pombos em praças, largos e avenida da cidade de Salvador-Ba; caracterizar os isolados com relação aos principais fatores de virulência *in vitro* – termotolerância a 37°C, cápsula e urease e quimiotipagem. Para este estudo foram analisadas 16 amostras de excrementos de pombos, coletadas em duplicatas em oito localidades. Suspensões das amostras foram semeadas em três meios, ágar malte, ágar Sabouraud e ágar semente de niger e incubadas a 27°C. Os resultados demonstraram que nos excrementos de pombos de 50% das localidades estudadas apresentaram *C. neoformans*, comprovado pelas provas morfofisiológicas. Através da quimiotipagem, foi constatado que todos os isolados pertenciam a var. *neoformans*. Este resultado sugere que excreta de pombos seja uma fonte potencial de *C. neoformans*.

Palavras-chave: *Cryptococcus neoformans*, pombos, excretas.

(Occurrence of *Cryptococcus neoformans* (Sanfelice) Vuillemin (1901) in droppings of pigeons in the urban perimeter of Salvador, Bahia, Brazil) – *Cryptococcus neoformans* is an encapsulated yeast, cosmopolitan, agent of human cryptococcosis. Two varieties of *C. neoformans* have traditionally been recognized: *C. neoformans* var. *neoformans* is the opportunistic agent of cryptococcosis in immunodepressed hosts, and *C. neoformans* var. *gattii* causes cryptococcosis in apparently healthy hosts in tropical and subtropical regions and behaves as a true pathogen. The major environmental sources of *C. neoformans* have been shown to be either soil contaminated with pigeon droppings (var. *neoformans*) or eucalyptus trees and decaying wood forming hollows in living trees (var. *gattii*). The present work aims to verify the presence of *C. neoformans* in pigeon droppings in squares, plazas and avenues in the city of Salvador-Ba; to characterize isolated with regard to the main factors of virulence *in vitro* - thermotolerance at 37°C, capsule and urease, and biotyping. For this study 16 samples of pigeon droppings were collected in duplicates in eight localities and analyzed. Suspensions of the samples were sown in three ways, agar malt, Sabouraud agar and Niger seed agar, and maintained at 27°C. Results demonstrated that in the pigeon droppings of 50% of the studied localities presented *C. neoformans* proven by morphophysiological tests. Through the biotyping, all the isolated ones proved to belong to var. *neoformans*. This result suggests that pigeon dropping is a potential source of *C. neoformans*.

Key words: *Cryptococcus neoformans*, pigeon, droppings.

INTRODUÇÃO

Cryptococcus neoformans (Sanfelice) Vuillemin (1901) apresenta-se como um fungo patogênico, de larga distribuição geográfica, encontrado na natureza, geralmente associado a vegetais em decomposição e fezes de aves, principalmente de pombos (EMMONS, 1955; BERNARDO *et al.*, 2001; SIDRIM & ROCHA, 2004).

Este fungo tem a capacidade de colonizar a mucosa do papo de pombos comportando-se como um parasita natural dessas aves. Por conta disso, a principal fonte de

contaminação do fungo nos seres humanos são as fezes de pombos, onde o mesmo permanece viável para contágio por um período de até dois anos (PASSONI, 1999).

A universalidade e a peculiar adaptação dos pombos a centros urbanos relacionam-se com a ubiquidade destes agentes fúngicos, sendo facilmente isolados de fontes ambientais, inclusive de poeira doméstica (PASSONI *et al.*, 1998). Além disso, em busca de alimento, estas aves se aproximam do convívio humano tornando-se cada vez mais domesticadas; por isso é comum encontrar ninhos próximos às residências humanas servindo como foco de

contaminação do fungo em questão (CAICEDO *et al.*, 1996; PAL, 1997; PASSONI *et al.*, 1998).

Locais de grande concentração de pombos tornam-se favoráveis a possíveis infecções humanas, visto que sua contaminação se dá pela inalação dessa levedura disponível no ambiente (EMMONS, 1960; NIGRO *et al.*, 1987; PAL, 1989; NOSANCHUK *et al.*, 1999; BERNARDO *et al.*, 2001; FILIÚ *et al.*, 2002).

Uma vez no organismo do indivíduo, este fungo pode infectar pulmões, coração, ossos longos, testículos, próstata, principalmente o cérebro e as meninges que são as formas clínicas mais importantes por estarem relacionadas com a mortalidade em casos de criptococose (ZAITZ *et al.*, 1998; PASSONI, 1999; SIDRIM & ROCHA, 2004).

Em Salvador, capital da Bahia, é comum observar a presença constante de bandos dessas aves pelas praças, ruas e avenidas, dividindo ambientes de lazer, trabalho ou moradia com as pessoas que ali vivem. Também é comum presenciar pessoas alimentando esses pombos e inclusive crianças em contato direto com os mesmos. Na Bahia, nos últimos dez anos, nenhuma investigação em nível de isolamento do *C. neoformans* de amostras ambientais foi realizada, sendo Salvador uma importante área de estudo devido à presença constante desses pombos no convívio humano. Além disso, trata-se de uma cidade turística que recebe visitantes de todas as partes do mundo, podendo ser um importante local para a disseminação da criptococose para diferentes áreas geográficas.

Sendo *C. neoformans* endosaprófita natural em pombos, faz-se necessário saber se estes organismos são mantenedores desse fungo nos ambientes que visitam. Desse modo, este estudo teve como objetivos: verificar a presença de *C. neoformans* em excretas de pombos no perímetro urbano da cidade de Salvador-Ba; caracterizar os isolados de *C. neoformans* com relação aos principais fatores de virulência *in vitro* – crescimento a 37°C, cápsula e uréase; e quimiotipar as variedades de *C. neoformans* isoladas.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada no perímetro urbano da cidade de Salvador, capital da Bahia, Nordeste do Brasil, que apresenta uma área de 706.799 Km² e população estimada em 2.440.828 habitantes (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2002).

Os locais de coleta foram selecionados mediante o preenchimento de critérios pré-estabelecidos: localidades visitadas por pombos; visualização de excretas de pombos secas expostas ao ambiente; lugares de grande concentração de pessoas. As áreas selecionadas foram: Avenida Joana Angélica; Largo do Farol da Barra; Largo Terreiro de Jesus; Praça Tomé de Souza; Praça da Piedade; Praça do Campo Grande; Praça Barão do Rio Branco; e Praça Visconde de Cairú (Fig. 1).

Foram realizadas duas coletas em cada localidade, totalizando 16 amostras. As excretas de pombo secas foram

removidas com auxílio de espátula e transferidas para sacos plásticos, ambos estéreis, que foram lacrados, identificados e acondicionados em caixa térmica contendo gelo. As excretas foram transportadas para a Universidade Estadual de Feira de Santana, onde foram processadas.

No Laboratório de Pesquisa em Microbiologia (LAPEM/UEFS), foi realizado um “pool” das amostras de cada localidade, que posteriormente foram maceradas, separadamente, em gral com pistilo. Foi pesado 1,0g de cada “pool” e suspensas em 10mL de solução fisiológica contendo cloranfenicol (500mg), em seguida levados para o agitador magnético por três minutos e deixados em repouso por 30 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, foi aspirado 0,1 mL do sobrenadante e semeado em cada placa de Petri em três meios diferentes, ágar Sabouraud e ágar Malte com cloranfenicol (0,2g/L) e meio de semente de niger (*Guizotia abyssinica*) incubadas à temperatura ambiente e a 37°C e observados diariamente por sete dias (EMMONS, 1955; BERNARDO *et al.*, 2001; FISHER & COOK, 2001).

Todas as colônias úmidas, cremosas, de aspecto mucóide, lisas e de coloração branca ou colônias com tons de marrom foram repicadas em ágar Sabouraud com cloranfenicol (500mg) em tubos e subcultivadas à temperatura ambiente. As colônias removidas de placas muito contaminadas passaram por um processo de purificação, onde foram diluídas em 2,0 mL de solução aquosa acrescida de cloranfenicol (500mg) e depois semeadas em ágar Sabouraud com cloranfenicol (500mg), e incubadas por cinco dias à temperatura ambiente e reisoladas. Depois, foram submetidas à identificação através de provas morfofisiológicas.

Todos os isolados com características de *C. neoformans* foram submetidos ao teste de termotolerância a 37°C, o qual consistiu no repique dos isolados em ágar Sabouraud com cloranfenicol (500mg) em tubos de ensaio, que posteriormente foram incubados a 37°C durante sete dias e observada a capacidade de crescimento.

Os isolados foram submetidos ao teste da urease. Como se trata de uma reação colorimétrica, a leitura foi feita de acordo com a mudança da cor do meio de cultura, de amarelo para rosa. Essa modificação de cor acontece devido à mudança de pH do meio provocado pela amônia, produto da hidrólise da uréia realizada pela urease. *C. neoformans* consegue degradar a uréia, apresentando um resultado positivo no teste (CHRISTENSEN, 1946).

Todos os isolados foram submetidos à análise microscópica com tinta da China (nanquim) para visualização da cápsula. A análise consistiu na homogeneização de uma parte mínima da colônia em uma gota de tinta da China entre lâmina e lamínula e observada em microscópio óptico (LACAZ *et al.*, 1998; LACAZ *et al.*, 2002).

Os isolados identificados como *C. neoformans* foram submetidos à quimiotipagem. As leveduras foram repicadas em tubos contendo o meio de Canavanina-glicina-azul-de-bromotimol (CGB) e incubados à temperatura ambiente para identificação da variedade.

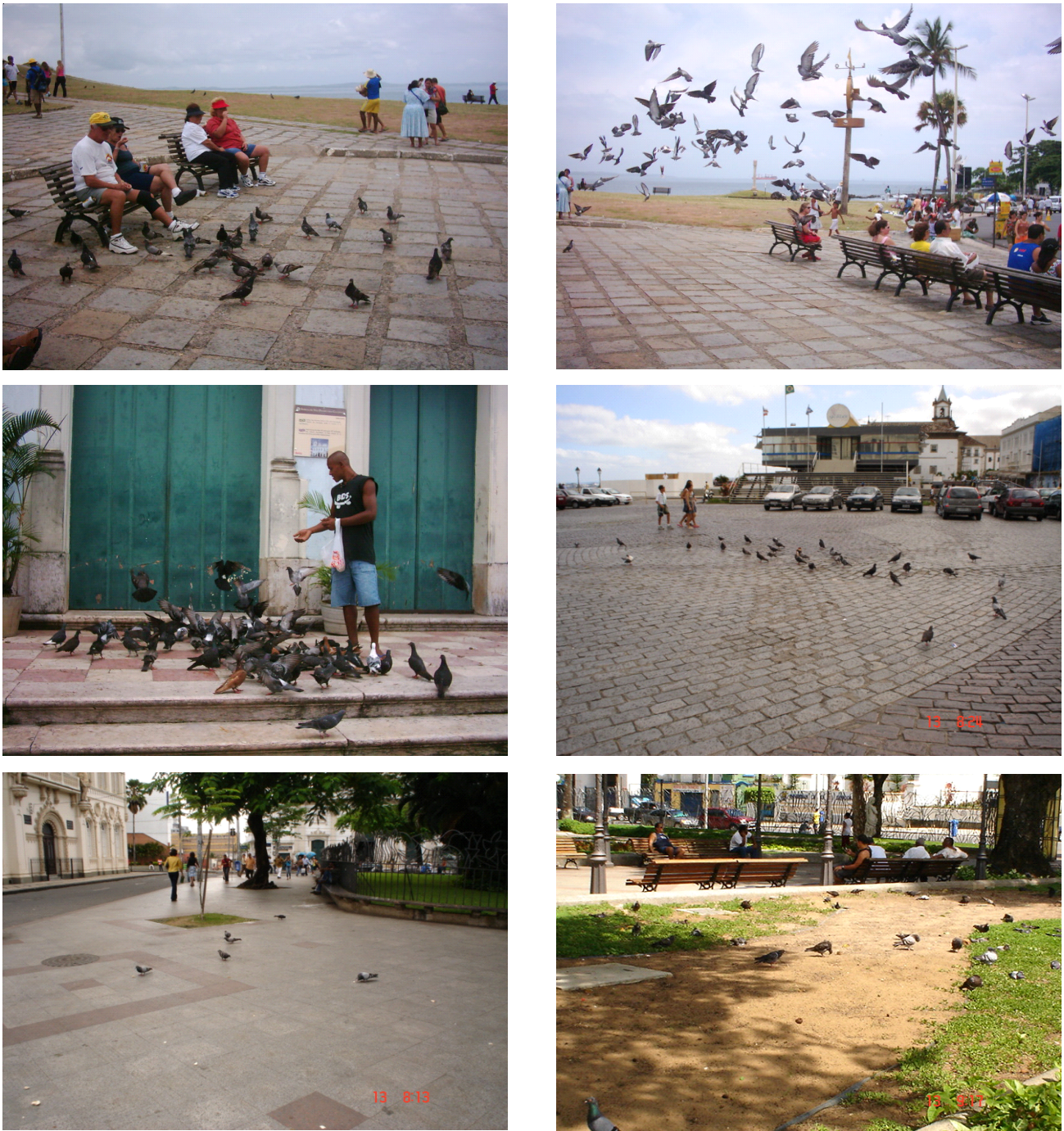


Fig. 1. Locais de coleta. A e B – Largo Farol da Barra; C – Largo Terreiro de Jesus; D – Praça Tomé de Souza; E – Praça da Piedade; F – Praça do Campo Grande.

A leitura foi feita de acordo com o crescimento ou não do fungo no meio de cultura e, conseqüentemente, a alteração na cor do meio. *C. neoformans* var. *neoformans* é extremamente sensível a glicina, não crescendo na presença deste; assim, no meio CGB observa-se o crescimento da variedade *gatti* através da viragem do indicador de pH, o qual altera a cor do meio para azul cobalto, demonstrando sua resistência a glicina presente neste meio (KWON-CHUNG & BENNETT, 1984).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das oito localidades estudadas, 50% obtiveram isolados do *Cryptococcus neoformans*: Largo do Farol da Barra, Largo Terreiro de Jesus, Praça Tomé de Souza e Avenida Joana Angélica (Tabela 1).

Dentre as localidades positivas para *C. neoformans*, a Praça Tomé de Souza foi a única em que as amostras das duas coletas foram positivas (Tabela 1), fator este explicado

Tabela 1. Resultados dos testes positivos e negativos de termotolerância, urease e microscopia para *C. neoformans* em excretas de pombos coletadas em diferentes localidades em Salvador-BA, 2004.

Localidade	Amostra	Colônia	Termotolerância (37°C)	Urease	Microscopia (cápsula)
Farol da Barra	A	A-1	+	-	-
		A-2	+	-	-
		A-3	+	-	-
	B	B-1	+	-	-
		B-2	+	-	-
		B-3	+	-	-
		B-4	+	-	-
	B-5	++	++	++	
Terreiro de Jesus	A	A-1	+	-	-
		A-2	+	-	-
		A-3	+	-	-
		A-4	+	-	-
	B	B-1	++	++	++
		B-2	+	-	-
		B-3	++	++	++
	B-4	+	-	-	
Tomé de Souza	A	A-1	++	++	++
		A-2	++	++	++
	B	B-1	++	++	++
		B-2	++	++	++
		B-3	++	++	++
Visconde de Cairú	A	A-1	+	-	-
		A-2	+	+	-
	B	B-1	+	-	-
Praça da Piedade	A	A-1	+	-	-
		A-2	+	-	-
	B	B-1	+	-	-
Joana Angélica	A	A-1	+	+	-
	B	B-1	++	++	++
		B-2	+	-	-
	B-3	++	++	++	
Campo Grande	A	A-1	+	-	-
		A-2	+	-	-
	B	B-1	+	-	-
Barão do Rio Branco	A	A-1	+	-	-
	B	B-1	+	-	-

(++) = Amostras confirmadas como *C. neoformans*

(+) = Amostras positivas, mas não confirmadas como *C. neoformans*

(-) = Amostras negativas

pela grande quantidade de excretas de pombos acumuladas no solo e pela alta densidade dessas aves na localidade, corroborando com EMMONS (1955) e CAICEDO *et al.* (1996) que afirmam que esses fatores explicam a permanência de *C. neoformans* nessas localidades.

Durante o cultivo das amostras foi possível

observar a dificuldade de isolamento do *C. neoformans* devido à presença de fungos contaminantes, os quais crescem com mais velocidade que o fungo de interesse. PAL (1997) afirma que essa dificuldade é proveniente das próprias amostras, pois são naturalmente contaminadas, e também devido aos meios de cultura que são utilizados,

ricos em nutrientes que possibilitam o crescimento tanto do fungo de interesse como de outros fungos ali presentes.

Das 16 amostras de excretas de pombos cultivadas, foram isoladas 36 colônias com características macroscópicas similares a de *C. neoformans*. Estas colônias foram submetidas às provas morfofisiológicas de termotolerância a 37°C, produção de urease e formação de cápsula polissacarídica para confirmação da espécie (Tabela 1).

No teste da termotolerância, no qual apenas a espécie *C. neoformans* é capaz de crescer a 37°C, todos os 36 isolados cresceram bem até os sete dias de incubação. No teste da produção de urease, dos 36 isolados apenas 12 apresentaram urease positiva, que foi confirmado pela reação colorimétrica devido à mudança de pH do meio provocado pela amônia, produto da hidrólise da uréia realizada pela urease, mudando o meio de amarelo para rosa. Essa característica é evidente para a espécie *C. neoformans* (Tabela 1).

Na análise microscópica utilizando o contraste com a tinta nanquim para observação da cápsula polissacarídica, observou-se que das 12 colônias que apresentaram urease positiva, 10 formaram cápsulas, as quais foram identificadas como *C. neoformans* (Fig. 2).

Das 10 colônias de *C. neoformans* submetidas à quimiotipagem para identificação da variedade, obteve-se um resultado de 100% para *C. neoformans* var. *neoformans*, comprovando assim a incapacidade desta variedade de crescer na presença de glicina.

Estes resultados consistem nos achados de outros investigadores que afirmam que é predominante *C. neoformans* var. *neoformans* em excretas de pombos (EMMONS, 1955; EMMONS, 1960; KWON-CHUNG & BENNETT, 1984; NIGRO *et al.*, 1987; BERNARDO *et al.*, 2001).

A relação ecológica de *C. neoformans* foi descrita pela primeira vez por EMMONS (1955), através do isolamento dessa levedura em excrementos de pombos nos Estados Unidos. Subseqüentemente, muitas investigações em diferentes regiões do mundo confirmaram este achado (CAICEDO *et al.*, 1996; PAL, 1997; BERNARDO *et al.*, 2001).

Estudos demonstraram uma correlação significativa entre a existência de pombos próximas ao ambiente domiciliar e a probabilidade de contaminação dessas residências por *C. neoformans*. Conseqüentemente, pacientes com AIDS apresentavam risco aumentado de adquirir a doença quando residentes em domicílio positivo para o fungo (PASSONI *et al.*, 1998; PASSONI, 1999).

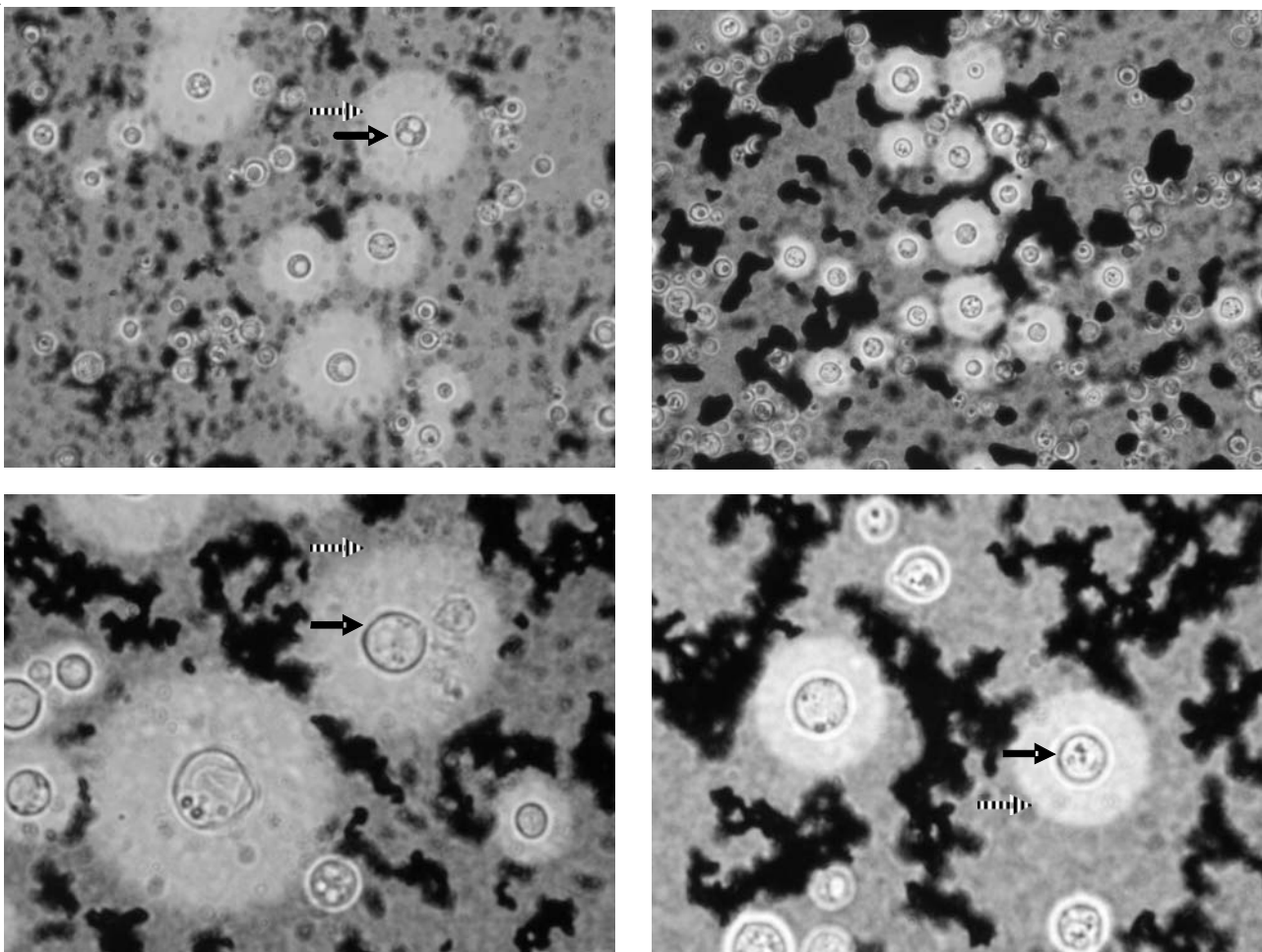


Fig. 2. Visualização microscópica de *C. neoformans* preparado com tinta nanquim. A e B – Células de levedura e cápsula de *C. neoformans* (40X); C e D - Células de levedura e cápsula de *C. neoformans* (100X). Seta preta levedura e seta malhada cápsula.

Os dados obtidos nesse estudo comprovam a importância dos pombos enquanto disseminadores do *C. neoformans* nas localidades que frequentam, bem como a potencialidade de seus excrementos como focos de contaminação do fungo, como referiu NOSANCHUK *et al.* (1999) aos resultados obtidos em sua pesquisa.

Na cidade de Salvador, as excretas dos pombos são fontes potenciais de contaminação. Faz-se necessário, assim, um trabalho de monitoramento dos locais de risco e implementação de medidas de higienização, evitando-se microfocos de *C. neoformans* em áreas públicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERNANDO FM, HM MARTINS & MG MARTINS. 2001. Fontes urbanas de *Cryptococcus* spp. – Lisboa. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias** 96: 157-160.
- Caicedo LD, MI Alvarez, CE Llanos & D Molina. 1996. *Cryptococcus neoformans* em excretas de palomas del perímetro urbano de Cali. **Colombia Méd.** 27: 106-109.
- CHRISTENSEN WB. 1946. Urea decomposition as a means of differentiating proteus and paracolon cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* typs. **J. Bact.** 52: 461-466.
- EMMONS CW. 1955. Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with the pigeon (*Columba livia*). **American Journal of Hygiene** 62: 227-232.
- EMMONS CW. 1960. Prevalence of *Cryptococcus neoformans* in pigeon habitats. **Public Health Reports** 75: 362-364.
- FILIÚ WFO, B WANKE, SM AGUENA, VO VILELA, RCL MACEDO & M LAZÉRA. 2002. Catifeiro de aves como fonte de *Cryptococcus neoformans* na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Rev. da Soc. Brasileira de Medicina Tropical** 35: 591-595.
- FISHER F & NB COOK. 2001. **Micologia: fundamentos e diagnósticos**. Rio de Janeiro: Reviente.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. 2002. **Censo de 2002**. Salvador: IBGE.
- KWON-CHUNG KJ & JE BENNETT. 1984. Epidemiologic differences between the varieties of *Cryptococcus neoformans*. **American Journal of Epidemiology** 120: 123-130.
- LACAZ CS, EM HEINS-VACCARI & NT MELO. 1998. **Guia para Identificação: fungos, actinomicetos, algas de interesse médico**. São Paulo: Sarvier.
- LACAZ CS, E PORTO, JEC MARTINS, EM HEINS-VACCARI & NT MELO. 2002. **Tratado de micologia médica**. 9ª ed. São Paulo: Sarvier, 2002.
- NIGRO NTM, AD PEREIRA, DW HUGGINS & CS LACAZ. 1987. Isolamento de *Cryptococcus neoformans* de fezes de pombos, do solo e ninhos de pombos. **Revista Brasileira de Medicina** 44: 6-9.
- NOSANCHUK JD, J RUDOLPH, AL ROSAS & A CASADEVALL. 1999. Evidence that *Cryptococcus neoformans* is melanized in pigeon excreta: implications for pathogenesis. **Infection and Immunity** 67: 5477-5479.
- PAL M. 1989. Environmental prevalence of *Cryptococcus neoformans* in avian habitats. **J. Anim. Sci.** 59: 225-228.
- PAL M. 1997. First report of isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* from avian excreta in Kathmandu, Nepal. **Rev. Iberoam. Micol.** 14: 181-183.
- PASSONI LFC, B WANKE, MM NISHIKAWA & MS LAZÉRA. 1998. *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** 36: 305-311.
- PASSONI LFC 1999. Wood, animals and human beings as reservoir for human *Cryptococcus neoformans* infection. **Rev. Iberoam. Micol.** 16: 77-81.
- SIDRIM JJC & MFG ROCHA. 2004. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- ZAITZ C, I CAMPBELL, SA MARQUES, LRB RUIZ & VM SOUZA. 1998. **Compêndio de Micologia Médica**. Rio de Janeiro: Medsi.