

ISOLAMENTO E OCORRÊNCIA DE *Cryptococcus neoformans* EM INTESTINO DE POMBOS CAPTURADOS NA CIDADE DE PELOTAS – RS

CAROLINA DOS SANTOS BERMANN¹; CAROLINE QUINTANA BRAGA²;
CAROLINA CAETANO DOS SANTOS²; SARA PATRON DA MOTTA²; ANGELITA
MILECH²; DANIELA ISABEL PEREIRA BRAYER³

¹Universidade Federal de Pelotas – carolbermann@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas

³Universidade Federal de Pelotas – danielabrayer@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

As micoses oportunistas são causadas por fungos de baixa virulência, mas que se assumem de grande importância em indivíduos imunocomprometidos, como pode ser observado pelo aumento da prevalência dessas enfermidades ao longo dos anos (PARK et al., 2016). Para esse grupo de indivíduos, a criptococose é considerada a micose sistêmica mais importante em endemia no Brasil (COSTA et al., 2019).

A criptococose é causada pelo gênero *Cryptococcus*, sendo as espécies *C. neoformans* e *C. gattii* as de maior importância. Na medicina humana, é de grande relevância primariamente em pacientes imunodeprimidos como os portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), transplantados de órgãos sólidos e diabéticos (LI et al., 2017) e desenvolve-se principalmente como pneumonias, meningites e em menor frequência de forma cutânea (SIVARAJ et al., 2018). Esta micose tem importância também na medicina veterinária, onde há desenvolvimento da enfermidade principalmente nas vias respiratórias superiores nas espécies felina e canina (BOWLES & FRY, 2011).

O diagnóstico pode ser realizado mediante a coleta de fluidos corporais para cultura, exame direto e sorológico ou ainda pela análise histopatológica ou citológica de tecidos afetados, apresentando-se na cultura em ágar *Sabouraud* como colônias brancacentas ao creme, homogêneas, de aspecto mucoide e brilhante, quando incubadas a 25 -37°C/ 72 horas e em ágar *Niger* podem tomar uma coloração amarronzada devido a produção de melanina (MAZIARZ & PERFECT, 2016).

Micromorfologicamente se caracteriza principalmente pela presença de espessa cápsula de mucopolissacarídeo, que é o seu principal fator de virulência, envolvendo uma estrutura arredondada de até 6 µm que pode apresentar brotamentos. Essas estruturas são observadas no exame direto e é possível a visualização do fungo em tinta da China pela formação de halos esbranquiçados na região da cápsula em meio ao fundo escuro, sendo um método de identificação bastante utilizado pela sua praticidade, rapidez e baixo custo (MORAES, 2018).

Os pombos (*Columba livia*) apresentam importância epidemiológica na transmissão da criptococose. Estudos prévios evidenciaram a presença de *Cryptococcus neoformans* em 10-32% das fezes de pombos analisadas e as aves da família Columbidae são reconhecidas como enriquecedoras do solo pelas suas fezes, onde estão presentes as leveduras que, quando inaladas, são capazes de causar a doença em humanos e animais (FARIA et al., 2010; SOUZA et al., 2018; LIMA et al., 2015).

Na cidade de Pelotas-RS estes vetores incluem-se em grande parte da população de aves encontradas em áreas urbanas e estão dentre as quatro espécies de maior abundância relativa e com maior frequência de ocorrência, com variação sazonal insignificante (SACCO et al., 2013).

Levando em consideração a gravidade das infecções fúngicas em indivíduos imunocomprometidos e em animais, conhecer e estudar o *Cryptococcus* spp. torna-se essencial para que se possa buscar medidas de controle e prevenção, desbanalizando a proximidade das aves vetoras de diversas doenças com humanos e animais domésticos.

2. METODOLOGIA

Foram capturados 20 exemplares de pombo (*Columba livia*) por meio da utilização de rede de neblina na praça Coronel Pedro Osório (n=7) e nas proximidades do Hipermercado BIG (n=13) da cidade de Pelotas/RS onde são observadas aglomerações desses animais e acúmulos de suas fezes. Estes animais foram submetidos a eutanásia induzida por isoflurano embebido em algodão via inalatória e posteriormente realizada necropsia para coleta de intestino. O projeto possui aprovação pelo comitê de ética em experimentação animal (CEEA) número 61235-2 e SISBIO 23110.012860/2018-81.

Fragmentos do órgão com fezes foram macerados, transferidos para tubos tipo falcon contendo 9mL de solução salina a 0,9% em uma proporção aproximada de 1:9, agitados em vórtex e incubados a 37°C em estufa em agitação constante (150 rpm) durante 60 minutos. Após um descanso de 15 minutos, um volume de 100 µL do sobrenadante foi semeado em placas de ágar Niger, em duplicata e homogeneizados com auxílio de alça de Drigalski. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 25°C com acompanhamento diário durante 10 dias. As colônias com características similares as de *Cryptococcus* spp. foram submetidas ao exame direto com tinta da China e analisadas por microscopia óptica e, ao confirmar a presença de células leveduriformes envolvidas por ampla cápsula, foram repicadas para obtenção de culturas puras.

As culturas puras isoladas foram submetidas à identificação em nível de espécie sendo repicadas em tubos com meio CGB (canavanina-glicina-azul de bromotimol) e incubadas por até 5 dias a 25°C com acompanhamento diário da coloração do meio.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre os 20 Columbidae avaliados, sete amostras de intestino apresentaram crescimento de colônias cor creme, homogêneas e mucoides em ágar niger. O exame direto com tinta da China revelou células arredondadas em brotamento e circundadas por espessa cápsula. O resultado do meio CGB apontou bioquimicamente como *Cryptococcus neoformans* em todos os isolados, que representaram uma porcentagem de 35% de ocorrência nessa população. Desses, seis (6/7 – 85,7%) foram pombos coletadas da praça Coronel Pedro Osório e apenas um (1/13 – 7,7%) próximo ao hipermercado BIG.

Não há relatos na literatura sobre o isolamento de *Cryptococcus* spp. diretamente em intestino de aves e alguns estudos identificam a presença da levedura em excretas secas. Também demonstram que todos os isolados pertencem a variedade *neoformans* o que pode ser justificado pela distribuição cosmopolita e as fontes ambientais como solos enriquecidos naturalmente por

fezes de aves, destacando os pombos (REOLON et al., 2004). Contrapondo essa situação, o presente estudo conseguiu provar que os pombos não são apenas enriquecedores do solo, mas principalmente disseminadores, que veiculam o fungo através das fezes e são capazes de contaminar outros locais.

Em outro estudo realizado na cidade de Pelotas-RS por FARIA et al. (2010) as praças apresentaram a menor quantidade de fezes encontradas no ambiente e o resultado de 100% de *Cryptococcus neoformans* isolados pode estar relacionado às poucas amostras coletadas, assim deduz-se que ao aumentar o número de coletas, o resultado se aproximaria da informação obtida nesse trabalho já que não há discrepância marcante e demonstram que é provavelmente a área de maior risco para saúde pública. Nas proximidades do Hipermercado BIG os baixos isolamentos também se aproximam do estudo previamente publicado na cidade, o que sugere que existe pouca intervenção de fatores ambientais. Isso porque alguns autores como SOUZA et al. (2018) justifica que as fezes livres podem sofrer ações do ambiente e estão expostas a adversidades meteorológicas ou ainda condições de umidade altas que favorecem o crescimento das bactérias e acabam por suprimir o crescimento do agente em cultivo.

As análises realizadas foram capazes de prever um resultado mais fidedigno a respeito da ocorrência de *Cryptococcus neoformans* em pombos por diminuir a possibilidade de erros amostrais durante a coleta de fezes a campo como avaliação de excretas de um mesmo animal, gerando falsos-positivos ou falsos-negativos, além de diminuir o fator de variação ambiental no momento da coleta, o que justificaria a divergência percentual dentre estudos similares.

O isolamento dessas amostras em locais públicos foi alarmante principalmente na praça, onde a percentagem positiva foi bastante significativa em uma área de grande frequentaçāo do público pelotense. Além disso, demonstrando essas aves como disseminadores, pode-se sugerir que ao longo do tempo locais com baixo isolamento podem vir a sofrer contaminações em decorrência da migração dessas aves.

4. CONCLUSÕES

Com o trabalho foi possível avaliar a ocorrência de *Cryptococcus neoformans* em intestino de pombos (*Columba livia*) na cidade de Pelotas – RS e principalmente comprová-los como disseminadores do fungo por ser isolado diretamente do trato intestinal dos vetores, dessa forma são capazes de contaminar diversos locais ao longo da vida e infectar outros pombos. Estudos como esse são importantes para alertar a população e órgãos responsáveis ao risco da superpopulação desses animais em locais públicos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOWLES, D.B.; FRY, D.R. Nasal cryptococcosis in two dogs in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 57, n. 1, p. 53-57, 2009.
- COSTA, M.C. SÁ, N.P.; JOHANN, S.; SANTOS, D.A. Social, environmental and microbiologic aspects of endemic mycoses in Brazil. **New Microbes and New Infections**, v. 29, n. C, 2019.
- FARIA, R.O.; NASCENTE, P.S.; MEINERZ, A.R.M.; CLEFF, M.B.; ANTUNES, T.A.; SILVEIRA, E.S.; NOBRE, M.O.; MEIRELES, M.C.A.; MELLO, J.R.B. 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.
- LI, Y.; FANG, W.; JIANG, W.; HAGEN, F.; LIU, J.; ZHANG, L.; HONG, N.; ZHU, Y.; XU, XIAOGUANG, X.; LEI, X.; DENG, D.; XU, J.; LIAO, W.; BOEKHOUT, T.; CHEN, M.; PAN, W. Cryptococcosis in patients with diabetes mellitus II in mainland China: 1993- 2015. **Mycoses**, v. 60, p. 706-713, 2017.
- LIMA, C.T.; KLAFFKE, G.B.; XAVIER, M.O. Cryptococcus spp. em excretas de Columba livia (pombos domésticos) provenientes de um hospital universitário no Sul do Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 82, p. 1-4, 2015.
- MAZIARZ, E.K.; PERFECT, J.R. Cryptococcosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, p. 179-206, 2016.
- MORAES, G.Y.B.; RODRIGUES, A.G.; MORAES, T.I. Fisiopatologia da criptococose em pacientes com HIV/AIDS e o papel do biomédico. **Revista Saúde em Foco**, v. 10, p. 308-318, 2018.
- PARK, J.; CHO, S.; YOUN, S.; BAK, Y.; YU, Y.; KIM, Y.K. Epidemiological Characterization of Opportunistic Mycoses between the Years 2006 and 2010 in Korea. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 1, p. 145-150, 2016.
- SACCO, A.G., BERGMANN, F.B. & RUI, A.M. Bird assemblages in the urban area in the city of Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil. **Biota Neotropica**, v. 13, n. 2, p. 153-162, 2013. Disponível em: <http://www.biotaneotropica.org.br/v13n2/en/abstract?inventry+bn01113022013>
- SIVARAJ, V.; KULASEGARAM, R.; RICKABY, W.; DWYER, E. Rare presentation of cutaneous cryptococcosis in advanced HIV. **BMJ Case Reports**, v. 11, n. 1, p. 1-3, 2018.
- SOUZA, N.P.; VALIATTI, T.B.; NOVAIS, V.P.; ROMÃO, N.F.; SOBRAL, F.O.S. Avaliação De Cryptococcus Neoformans Em Excretas De Pombos (Columba Livia) No Perímetro Urbano Do Município De Ji-paraná, Rondônia, Brasil. **Saúde (Santa Maria)**, v. 44, n. 3, p. 1-7, 2018.